

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

**HERPESVIRUS BOVINO: ASPECTOS DA INTERAÇÃO VÍRUS-
HOSPEDEIRO**

Lillian Baptistioli
Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP
2018

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

**HERPESVIRUS BOVINO: ASPECTOS DA INTERAÇÃO VÍRUS-
HOSPEDEIRO**

Lillian Baptistioli

**Orientadora: Profa. Adjunta Tereza Cristina Cardoso da Silva
Co-orientadora: Profa. Adjunta Katia Denise Saraiva Bresciani**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

ARAÇATUBA – SP
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da FMVA / UNESP
Bibliotecária Responsável: Isabel Pereira de Matos - CRB8-5613

Batistiolli, Lillian

B222h Herpesvirus bovino: aspectos da interação vírus-hospedeiro
/ Lillian Baptistiolli. – Araçatuba: [s.n.], 2018.
73 f.

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

Orientadora: Profa. Adjunta Tereza Cristina Cardoso Silva
Co-orientadora: Profa. Adjunta Katia Denise Saraiva Bresciani

1.citometria de fluxo. 2. Herpesviridae. 3. potencial da membrana
mitocondrial. 4. reação em cadeia da polimerase. 5. técnicas de cultura
células. I. Título.

CDD 616.9364

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Herpesvirus bovino: aspectos da interação vírus-hospedeiro

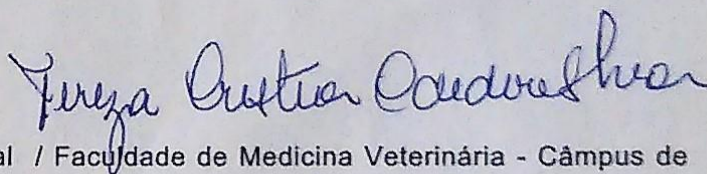
AUTORA: LILLIAN BAPTISTIOLLI

ORIENTADORA: TEREZA CRISTINA CARDOSO DA SILVA

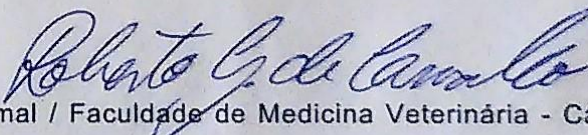
COORIENTADORA: KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

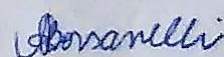
Profa. Dra. TEREZA CRISTINA CARDOSO DA SILVA
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp



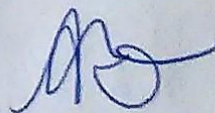
Prof. Dr. ROBERTO GAMEIRO DE CARVALHO
Departamento de Apoio Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp



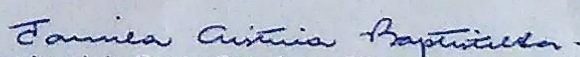
Pós-doutoranda ANA CAROLINA BORSANELLI
Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp



Profa. Dra. ANDRÉA FONTES GARCIA
Cursos de Farmácia e Nutrição / Centro Católico Auxilium - UNISALESIANO/Araçatuba



Profa. Dra. JAMILA CRISTINA BAPTISTELLA
Curso de Medicina Veterinária / Sociedade Educacional de Santa Catarina - Câmpus de Joinville



Araçatuba, 01 de agosto de 2018.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LILLIAN BAPTISTIOLLI – Natural de Osvaldo Cruz, São Paulo, nascida em 15 de setembro de 1989, filha de Sueli Conceição Baptistiolli. Em 2007, ingressou no curso de Medicina Veterinária das Faculdades Adamantinenses Integradas, onde se graduou como Médica Veterinária em janeiro de 2011 com Trabalho de Conclusão de Curso intitulado “Pancreatite aguda canina” sob orientação da Prof. José Antônio Marciano. No ano seguinte ingressou no curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas pela Universidade Metropolitana de Santos, graduando em 2013. Em março de 2013, ingressou no curso de Mestrado em Ciência Animal, área de concentração Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, na Faculdade de Medicina Veterinária, Unesp, Campus de Araçatuba-SP, obtendo bolsa de mestrado vinculada à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Em 2014 obteve o título de Mestre e em 2015 ingressou no curso de Doutorado do mesmo programa de pós-graduação, o qual obteve bolsa de pesquisa vinculada ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) sob orientação da Profa. Adjunta Tereza Cristina Cardoso e da co-orientação da Profa. Katia Denise Saraiva Bresciani, na área de concentração intitulada de Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal.

Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem sucedidos. Pois, muitos são os planos no coração do homem, mas o que prevalece é o propósito do Senhor (Bíblia Sagrada, Provérbios).

*Com muito orgulho dedico esse trabalho à minha **família**, às pessoas de luz que encontrei ao longo da minha jornada (**Professoras Katia e Tereza**), ao meu amor **Luiz** e em especial à minha querida e saudosa **avó Rosa Garcia Baptistioli**.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente e principalmente à Deus, pelas oportunidades oferecidas, pela orientação e proteção.

À minha família, minha mãe Sueli, meu irmão Jhonny, minha tia Fátima, meus tios Paulo, Reginaldo, meus padrinhos Luis Carlos e Silvia e meus primos Raphael e Natália, por sempre acreditarem em mim e pelas orações e boas vibrações transmitidas.

Ao meus anjos da guarda: avó Rosa e avô José que lá do céu zelam por mim.

Ao meu amor Luiz Fernando Ortega por todo seu apoio, paciência e amor.

À minha orientadora Profa. Adjunta Tereza Cristina Cardoso Silva e minha co-orientadora Profa. Adjunta Katia Denise Saraiva Bresciani pela oportunidade, confiança, apoio, orientação, dedicação, pelo caráter, profissionalismo e ética. Meus sinceros agradecimentos à vocês professoras, por transmitirem em suas atitudes o amor à profissão e o comprometimento com o ensino e aprendizagem do aluno.

À todos os pesquisadores envolvidos nesse projeto: Dr. Roberto Gameiro (Assistente do Departamento de Apoio Produção e Saúde Animal, Universidade Estadual Paulista), Dra. Helena Lago Ferreira (Professora Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo - USP), Dr. Eduardo Furtado Flores (Professor Associado do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Setor de Virologia, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria) e a aluna Carolina Utiyke Fabri (graduanda do curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de doutorado com vigência do primeiro ao

terceiro ano do curso, a qual somente foi possível pela excelência atuação da Professora Adjunta Juliana Regina Peiró que na época atuava na instituição como coordenadora da pós-graduação e demonstrou sua grande dedicação e competência para com os alunos. À você professora Juliana meu muito obrigada!

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, pela oportunidade oferecida para a realização do curso de Doutorado.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram na execução dessa pesquisa, sem vocês nada disso seria possível!

Meus sinceros agradecimentos!

Sumário

	Página
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	14
1 Contextualização do problema	14
2 Objetivos específicos	14
3 Revisão de literatura	15
3.1 Considerações gerais sobre o Herpesvirus bovino.....	15
3.2 Patogênese do BHV5	19
3.2.1 Infecção aguda causada pelo BHV5.....	19
3.2.2 Infecção latente causada pelo BHV5.....	24
3.3 Reposta imunológica na infecção por BHV5	26
3.4 Principais componentes da resposta imune inata e adaptativa em infecção por BHV5.....	30
REFERÊNCIAS	33
CAPÍTULO 2 – BOVINE HERPESVIRUS 5 PROMOTES MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION IN CULTURED BOVINE MACROPHAGES WHICH DOES NOT AFFECT VIRUS REPLICATION	51
Abstract	52
1 Introduction	53
2 Materials and methods	54
2.1 General information, monocyte isolation and macrophage generation	54
2.2 Infection and virus quantification of cultured macrophages	56
2.3 Viability assay and viral growth kinetics.....	57
2.5 Viral nucleic acid detection by quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR).....	58
2.4 Determination of nitric oxide production and apoptosis	59
2.5 Mitochondrial membrane potential, complex I and ROS evaluation	60
2.6 ROS evaluation, ATP levels and oxygen consumption.....	61
2.7 Statistical analysis	61
3 Results	61
3.1 Cell survival and virus replication	62

3.2 Macrophage apoptosis, NO production and mitochondrial dysfunction ...	64
4 Discussion	66
5 Conclusion	69
References	70

HERPESVIRUS BOVINO: ASPECTOS DA INTERAÇÃO VÍRUS-HOSPEDEIRO

RESUMO – O Brasil é o segundo maior produtor mundial de carne bovina. Entretanto diversas patologias podem acometer o rebanho bovino e causar significativas perdas econômicas. Diante deste cenário, a infecção por Herpesvirus bovino 5 (BHV5) possui grande importância epidemiológica neste setor, sendo o BHV5 conhecido pelo desenvolvimento de meningoencefalite. Esse vírus possui como características a rápida replicação lítica em cultura de células e a capacidade de estabelecer latência nos gânglios sensoriais do hospedeiro. Assim, essa cepa viral está relacionada à habilidade do BHV5 de invadir, replicar-se no sistema nervoso central (SNC) e causar enfermidade neurológica. É de conhecimento científico que infecções virais estimulam ou inibem a resposta imunológica com objetivo de impedir a replicação e disseminação viral. Entretanto, pouco se sabe sobre o desenvolvimento da resposta imunológica do BHV5 no curso da infecção aguda ou latente. Assim, muitos conceitos sobre a patogênese do BHV5 acabam sendo extrapolados do Herpesvirus bovino 1 (BHV1). Diante deste contexto, faz-se necessário a busca pelo conhecimento da relação entre os vírus e as células de defesa do hospedeiro. Esses achados irão contribuir para um melhor entendimento da patogênese da doença, bem como para o possível desenvolvimento de vacinas mais específicas e eficazes.

Palavras-Chave: citometria de fluxo, *Herpesviridae*, potencial da membrana mitocondrial, reação em cadeia da polimerase, técnicas de cultura células

HERPESVIRUS BOVINE: ASPECT OF VIRUS-HOST INTERACTION

SUMMARY – Brazil is the second largest producer of beef in the world. However several pathologies can affect the bovine herd and cause significant economic losses. In view of this scenario, bovine herpesvirus 5 infection (BHV5) is of great epidemiological importance in this sector, and BHV5 is known for the development of meningoencephalitis. This virus is characterized by rapid lytic replication in cell culture and the ability to establish latency in host sensory ganglia. Thus, this viral strain is related to the ability of BHV5 to invade, replicate in the central nervous system (CNS) and cause neurological disease. It is scientifically known that viral infections stimulate or inhibit the immune response in order to prevent viral replication and dissemination. However little is known about the development of the BHV5 immune response in the course of acute or latent infection. Thus, many concepts about the pathogenesis of BHV5 end up being extrapolated from bovine herpesvirus 1 (BHV1). In this context, it is necessary to search for knowledge about the relationship between viruses and host defense cells. These findings will contribute to a better understanding of the pathogenesis of the disease, as well as to the development of more specific and effective vaccines.

Keywords: flow cytometry, *Herpesviridae*, membrane potential mitochondrial, polymerase chain reaction, cell culture techniques

Capítulo 1

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 Contextualização do problema

O Brasil é o segundo maior produtor de carne bovina enquanto que as infecções causada pelo Herpesvirus bovino 5 (BHV5) representam uma das principais patologias capaz de causar grandes perdas econômicas.

Evidências recentes apontam que após a penetração viral nas células epiteliais há o ciclo de replicação lítica e conseqüentemente o processo de apoptose por intermédio de macrófagos sem que um processo inflamatório necessariamente ocorra. Sabe-se também que as glicoproteínas participam ativamente no processo de penetração viral e também no estímulo de proliferação de linfócitos. Entretanto, ainda não se conhece o mecanismo da resposta imunológica do BHV5 no curso da infecção aguda ou latente, assim como há pouco entendimento sobre a patogênese desta infecção. Neste sentido torna-se essencial realizar estudos controlados que permitam avaliar a patogênese e a resposta imunológica do BHV5 de modo a promover uma melhor compreensão sobre essas patologias e no futuro viabilizar e contribuir para o desenvolvimento de vacinas capazes de minimizar ou mesmo evitar a infecção pelo Herpesvirus bovino.

Diante desse cenário, a hipótese deste estudo é que o BHV5 se relaciona de distintas formas com os monócitos e macrófagos, e que portanto a regulação da infecção na fase aguda da doença ocorra a partir de diferentes mecanismos.

2 Objetivos específicos

1) Identificar se os macrófagos bovinos são alvos da infecção *in vitro* por BHV 5 (SV507/99) pela:

1.1) Detecção, por imunofluorescência, do antígeno viral e pelo acompanhamento da cinética da viabilidade e crescimento viral nos períodos 24, 48 e 72 horas pós-infecção (p.i.)

- 1.2) Detecção de ácido nucleico viral por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) em macrófagos infectados e não infectados;
- 2) Determinar se a infecção de macrófagos, *in vitro*, por BHV 5 (SV507/99) nos períodos 24, 48 e 72 horas p.i. tem efeito direto:
 - 2.1) Na atividade da bioenergética mitocondrial segundo o ensaio de toxicologia baseado em formação de formaldeído;
 - 2.2) No potencial de membrana mitocondrial pela quantificação do corante JC-1 por citometria de fluxo acústica;
 - 2.3) Na produção de atividade do complexo I da mitocondrial conforme comparação da inclinação da curva antes e depois da adição de rotenona;
 - 2.4) Na produção de estresse oxidativo pelo formação de óxido nítrico;
- 3) Identificar se a infecção de macrófagos, *in vitro*, por BHV 5 (SV507/99) nos períodos 24, 48 e 72 horas p.i. está associado ao desenvolvimento de apoptose pela mensuração dos fenótipos de apoptose para apoptose necrose (BrdU+/PI-), necroptóticas (BrdU-/PI+), necróticas secundárias (BrdU+/PI+) e células viáveis (BrdU-/PI-).

3 Revisão de literatura

3.1 Considerações gerais sobre o Herpesvirus bovino

Diante do crescente cenário econômico da bovinocultura e com a liderança brasileira nas exportações de carne somado ao início da comercialização internacional do produto lácteo com o Japão (BRASIL, 2018); as doenças virais causadas pelos membros da família *Herpesviridae* são preocupantes devido aos grandes prejuízos econômicos que acarretam para a criação de bovinos (CAMPOS et al., 2009; D'ARCE et al., 2002; FINO et al., 2012; KAZIYAMA; FERNANDES; SIMONI, 2012; ROLA et al., 2015).

A bovinocultura é afetada principalmente pelo Herpesvirus 5 (BHV5) (WILD et al., 2005); sendo considerado um agente etiológico primário (BISWAS et al., 2013; FINO et al., 2012; ROLA et al., 2015; STATHAM; RANDALL; ARCHER, 2015). Tal cepa viral é capaz de causar diminuição nos

índices produtivos e reprodutivos, além de apresentar como característica da doença, a alta mortalidade (FRANCO; ROEHE; VARELA, 2017; STATHAM; RANDALL; ARCHER, 2015).

BHV5 faz parte da família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* (CARDOSO et al., 2015; DAVISON et al., 2009; FLORES, 2017), gênero *Varicellovirus* (DAVISON, 2010; DAVISON et al., 2009; FLORES, 2017). A partícula viral é composta por quatro estruturas: núcleo, capsídeo, tegumento (entre o capsídeo e o envelope) e envelope (FLORES, 2017; THIRY et al., 2006; WILD et al., 2005). Enquanto o núcleo contém uma molécula de DNA de fita dupla protegido por um capsídeo icosaédrico, na superfície do envelope há glicoproteínas virais responsáveis pela interação entre o vírus e suas células hospedeiras (THIRY et al., 2006; WILD et al., 2005) Figura 1.

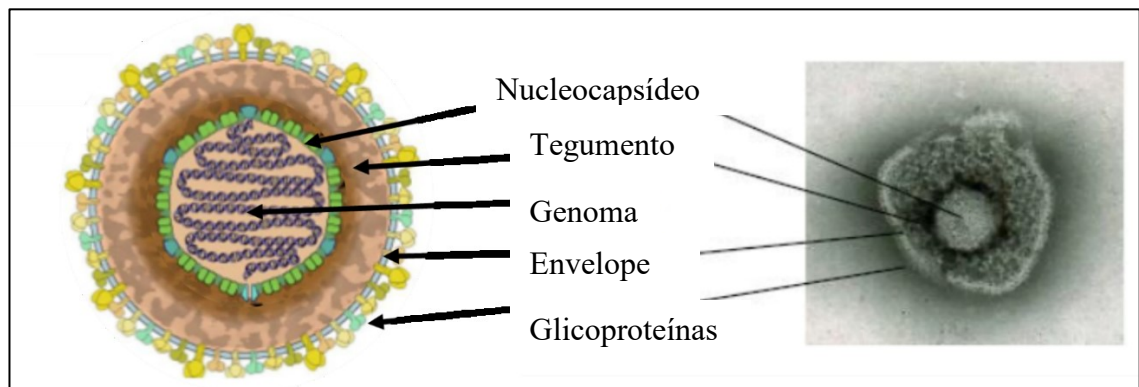


Figura 1 - Morfologia de um vírion da família *Herpesviridae* (Modificado de THIRY et al., 2006 e SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS, 2018).

BHV5 apresentam semelhanças em suas estruturas genômicas com o BHV1 o que dificulta sua diferenciação e posterior classificação taxonômica (KUNRATH et al., 2004). Entretanto, uma diferença marcante entre ambos os tipos virais, é a capacidade do BHV5 causar doença neurológica (CARDOSO et al., 2015; QUEIROZ et al., 2018) por invadir e se replicar no sistema nervoso central (BELKNAP et al., 1994; FLORES, 2017; STUDDERT et al., 1989).

Ainda semelhante ao BHV1, o BHV5 tem como característica um ciclo de replicação curto e rápido associado à capacidade de induzir latência ao se

alojar nos gânglios sensoriais e autonômicos (ACKERMANN; PETERHANS; WYLER, 1982; FLORES, 2017; ROIZMAN; KNIPE, 2001) após a infecção aguda, persistindo por toda a vida do animal (BARBOSA et al., 2005; JONES, 2003). Por sua vez, a reativação dos membros da subfamília *Alphaherpesvirinae* pode ocorrer devido ao estresse durante o parto, ao transporte, a vacinações (ACKERMANN; PETERHANS; WYLER, 1982; ROIZMAN; PELLETT, 2001) ou mesmo por tratamento prolongado com corticóides (ACKERMANN; PETERHANS; WYLER, 1982; CARDORE et al., 2011; VOGEL et al., 2004; ROIZMAN; PELLETT, 2001). Essa reativação viral resulta na excreção e transmissão de vírus (BARBOSA et al., 2005; JONES, 2003). Essas infecções causadas pelo BHV5 possuem alta mortalidade (ISERNHAGEN et al., 2011; NANDI et al., 2009).

Os vírus da família *Herpesviridae* acometem animais adultos e preferencialmente bovinos jovens (GRAHAM, 2013) enquanto os animais sadios também podem ser infectados (JONES; CHOWDHURY, 2008). Sabe-se que o tipo viral é o responsável por determinar a sintomatologia clínica do animal (FRANCO et al., 2002; TAKIUCHI et al., 2005), de forma que a maioria dos animais acometidos por essa infecção têm sinais clínicos inaparentes e apresentam esporadicamente episódios de reexcreção viral, o que os tornam, potenciais transmissores (JONES, 2003).

O BHV5 é conhecido por possuir característica neurotrópica e neuroinvasiva (CARDOSO et al., 2015), assim, após invadir o sistema nervoso central do hospedeiro (PEREZ et al., 2002) o vírus é capaz de causar meningoencefalite em bovinos (CARDOSO et al., 2015; ISERNHAGEN et al., 2011; LUNARDI et al., 2009; QUEIROZ et al., 2018) devido a um grave processo inflamatório nas meninges cerebrais e parênquima (QUEIROZ et al., 2018) acarretando em depressão, excitação, opistótono (CHOWDHURY et al., 1997; SILVA et al., 1999), tremores, incoordenação, bruxismo e convulsões levando o animal ao óbito (CHOWDHURY et al., 1997; MEYER et al., 2001; PEREZ et al., 2002; SILVA et al., 1999). Tal infecção em bovinos é caracterizada por ser esporádica e frequentemente possuir elevada

mortalidade (FRANCO et al., 2002; FRENCH, 1962; STUDDERT et al., 1989). Entretanto, o BHV5 também pode ser capaz de induzir sinais de doença respiratória (HÜBNER et al., 2005; SCHUDEL et al., 1986) e ou doenças no sistema reprodutor (ESTEVES et al., 2003; KIRKLAND et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011). Estudos demonstram que além do tecido neural, também outros tecidos, podem ser potenciais alvos ou sítios de latência durante a infecção (LUNARDI et al., 2009).

A prevenção, assim como o controle das infecções de origem viral, se faz com a utilização de vacina (FLORES, 2017; FRANCO et al., 2002), as quais são capazes de diminuir a sintomatologia da doença (ACKERMANN; ENGELS, 2006; DEL FAVA et al., 1998; FLORES, 2017) e a excreção viral (FLORES, 2017; MOREIRA et al., 2001). Fundamentados na situação epidemiológica do local, na severidade e prevalência da doença, as estratégias de controles são determinadas (FLORES, 2017; FRANCO et al., 2002). Dessa forma, programas de controle e erradicação são realizados baseados na vacinação compulsória, identificação (ANZILIERO et al., 2015; RADOSTITS et al., 2007) e descarte dos animais portadores (ANZILIERO et al., 2015; FLORES, 2017; RADOSTITS et al., 2007). Porém, muitos animais soropositivos também são descartados, uma vez que a vacina não é capaz de impedir a latência e eliminação do vírus já instalado (ACKERMANN; ENGELS, 2006; DEL FAVA et al., 1998).

A vacinação no Brasil é realizada com vírus inativado (DEL FAVA, 2001) e apesar de tal ação ser voluntária, essa medida profilática tem crescido durante os últimos tempos (ANZILIERO et al., 2015). Entretanto, estudos apontam que na primo-infecção de bezerros amamentados com o colostro de vacas imunizadas durante a gestação, a vacinação realizada com o vírus inativado não demonstrou eficácia (MOREIRA et al., 2001). A vacinação contra o BHV1 pode proteger também contra BHV5 (ANZILIERO et al., 2011; BELTRÃO et al., 2000; DEL MÉDICO ZAJAC et al., 2006) de modo que as estratégias de controle para o BHV1 são extrapoladas para o BHV5 uma vez que há muita similaridade genômica e epidemiológicas entre os dois tipos virais (ANZILIERO et al., 2011; CAMPOS et al., 2011).

3.2 Patogênese do BHV5

A transmissão do Herpesvirus bovino pode ocorrer por inalação de aerossóis contaminados devido ao contato direto com secreções nasais (FLORES, 2017; MARS et al., 2000; MUYLKENS et al., 2007; WYLER et al., 1989) e oculares de animais infectados (FLORES, 2017; MUYLKENS et al., 2007; WYLER et al., 1989) ou pelo sêmen (KATHIRIYA et al., 2018; WRATHALL; SIMMONS; VAN SOOM, 2006) durante o coito (MARS et al., 2000), durante a inseminação artificial (KATHIRIYA et al., 2018; PHILPOTT, 1993), na fertilização *in vitro* ou transferência de embriões (GONÇALVES et al., 2015) por meio de fômites (MUYLKENS et al., 2007; WYLER et al., 1989). Este tipo viral também já foi observado no fluido folicular (GONÇALVES et al., 2015; WEBER et al., 2013) e em oócitos bovinos (BIELANSKI; DUBUC, 1994; GONÇALVES et al., 2015; TANGHE et al., 2005). A porta de entrada para a infecção ainda pode ser o contato com a água e alimentos contaminados (MUYLKENS et al., 2007; WYLER et al., 1989).

Todas as formas de transmissão são consideradas importantes na disseminação do vírus em rebanhos criados sob condições de confinamento (VAN DONKERSGOED; BABIUK, 1991). Assim como no BHV1, no BHV5 a porta de entrada são as células epiteliais do trato respiratório superior e ou genital (CARDOSO et al., 2015; FLORES, 2017; MARS et al., 2000), locais preferidos para a replicação viral primária (CARDOSO et al., 2015).

3.2.1 Infecção aguda causada pelo BHV5

A infecção causada por esses tipos virais pode ser aguda ou também denominada de produtiva e ser desencadeada pelo ciclo lítico do vírus assim como a infecção pode ser latente (FRANCO; ROEHE; VARELA, 2017; FLORES, 2017). Na infecção aguda há a expressão de todos os genes virais, replicação do genoma (FRANCO; ROEHE; VARELA, 2017) que compreende no reconhecimento e interação vírus-célula, fusão do envelope viral com a membrana plasmática do hospedeiro (ROIZMAN; KNIPE, 2001), penetração do nucleocapsídeo viral no citoplasma da célula hospedeira (HUSHUR et al.,

2004; ROIZMAN; KNIPE, 2001), transporte do nucleocapsídeo e proteínas virais para o núcleo celular do hospedeiro (ROIZMAN; KNIPE, 2001; MURATA et al., 1999), transcrição, replicação e síntese de DNA e proteínas virais (DÖHNER et al., 2002; ROIZMAN; KNIPE, 2001), montagem (FRANCO; ROEHE; VARELA, 2017; ROIZMAN; KNIPE, 2001) e liberação da progênie viral (DÖHNER et al., 2002; ROIZMAN; KNIPE, 2001) Figura 2.

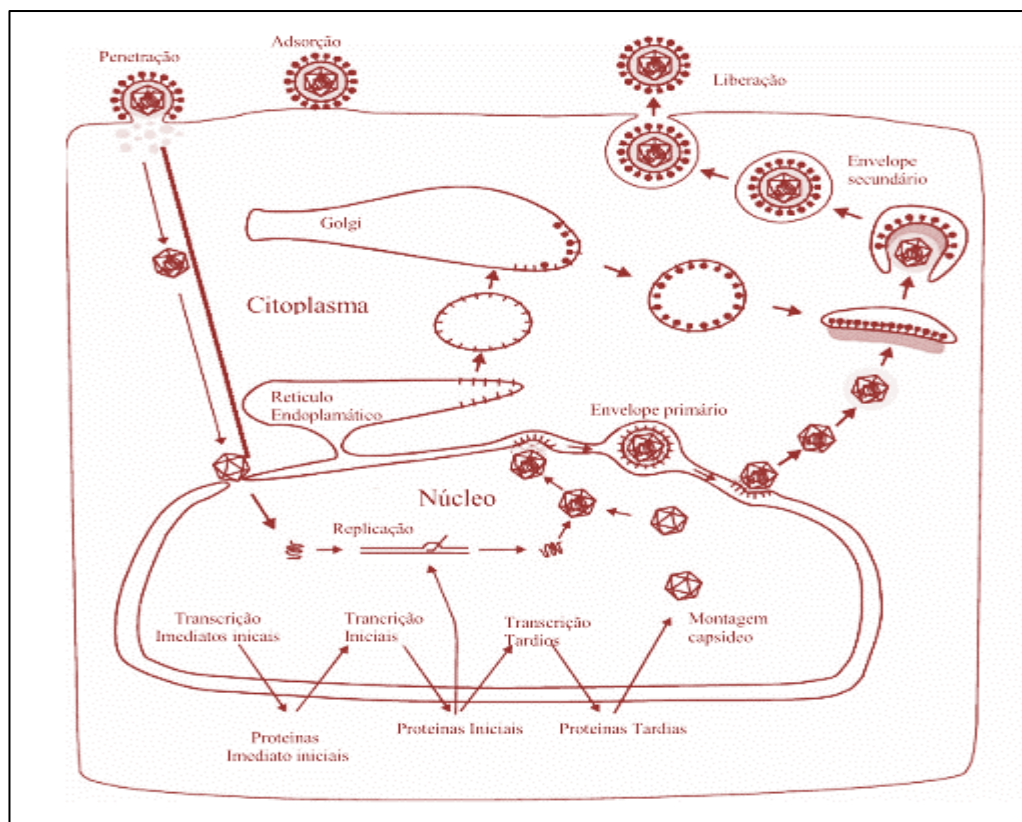


Figura 2 - Ciclo replicativo dos herpesvírus (Adaptado de METTENLEITER, 2004).

Dessa forma, uma vez que o vírus seja capaz de invadir o sítio primário da infecção e se replicar, há a disseminação viral de célula à célula capaz de produzir infecção localizada ou causar infecção sistêmica, quando as novas partículas virais formadas saem para o meio extracelular (BARANOWSKI et al., 1996; ENGELS; ACKERMANN, 1996). Enquanto no BHV5, após o vírion por via intranasal adentrar o hospedeiro, o vírus é carregado dos nervos regionais terminais ao bulbo olfatório (CHOWDHURY et al., 1997; DIEHL et al., 2005) e

ponte (FLORES, 2017). Nesses locais, há a replicação viral e a disseminação para outras áreas do SNC (CHOWDHURY et al., 1997; DIEL et al., 2005; FLORES, 2017), podendo atingir o córtex cerebral (FLORES, 2017). Como consequência dessa intensa replicação e propagação viral para diversas áreas do SNC, há o desenvolvimento visível de sinais neurológicos (CHOWDHURY et al., 1997).

A replicação viral dos *Alphaherpesvirus* é rápida (OHMANN; BABIUK, 1996a; ENGELS; ACKERMANN, 1996; RISSI et al., 2007) e embora haja poucos trabalhos sobre a patogênese da infecção causada pelo BHV5 em bovinos (CARDOSO et al., 2010), estudos sugerem que o BHV5 tenha a cinética parecida com o BHV1 (OHMANN; BABIUK, 1996b; ENGELS; ACKERMANN, 1996; RISSI et al., 2007). Contudo, para Cardoso et al. (2015), diferentes cepas do Herpesvirus bovino podem influenciar na patogênese devido a diferencial modulação da resposta imune do hospedeiro frente a esses agentes infecciosos.

A interação das glicoproteínas localizadas no envelope viral com receptores específicos presentes na superfície celular é necessária para iniciar o processo de infecção (RASHEED et al., 2018; ROIZMAN; KNIPE, 2001) por meio da adsorção (RASHEED et al., 2018) o qual o vírus é capaz de infectar as células hospedeiras (MURATA et al., 1999; RASHEED et al., 2018). Por sua vez, esses receptores celulares iniciam a infecção (FRANCO et al., 2002; RASHEED et al., 2018) com a participação das glicoproteínas gB, gC e gD (RASHEED et al., 2018; SCHWYZER; ACKERMANN, 1996).

Ao menos dez genes de um total de 70 glicoproteínas são responsáveis por codificar essas glicoproteínas. Assim, seis destes genes são observados na região UL e codificam gK (UL53), gC (UL44), gB (UL27), gH (UL22), gM (UL10), gL (UL1); os últimos quatro são situados na região US e codificam: gG (UL4), gI (US9), gD (UL6) e gE (US8) (REBORDOSA et al., 1996; SCHWYZER; ACKERMANN, 1996). Essas dez glicoproteínas estão envolvidas em várias etapas do ciclo viral como adsorção, penetração, maturação e liberação do vírion da célula infectada (DELHON et al., 2003; THIRY et al., 2005), além de

constituírem um importante alvo para a resposta imune (THIRY et al., 2005) são também utilizadas como constituintes na produção de vacinas e de testes diagnósticos (DELHON et al., 2003; FRANCO et al., 2012; RASHEED et al., 2018). No BHV5, as glicoproteínas além das funções acima citadas, possuem características ligadas à neurovirulência (CHOWDHURY et al., 2000; SILVA et al., 2009). Dessa maneira, a maioria dos *alfaherpesvirus* neutrópicos possuem conservadas as glicoproteínas gC e gD (SPEAR, 2004).

Como consequência da replicação viral há um efeito citopático, entretanto fisiológico (CARDOSO et al., 2015; GARCIA et al., 2013; STEUKERS et al., 2011) ativo (FABIAN; KOPPEL; MADDOX-HYTTEL, 2005) denominado de apoptose celular (CARDOSO et al., 2015; GARCIA et al., 2013; ELMORE, 2007; MACHADO et al., 2004; STEUKERS et al., 2011). A apoptose é considerada um mecanismo de defesa do hospedeiro (GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007; HAY; KANNOURAKIS, 2002) sendo ativado sempre que houver uma invasão por microrganismos patogênicos (FLORES, 2017; GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007) ou quando o DNA for danificado (GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007). Porém, ainda não estudos capazes de esclarecer se o processo de apoptose tem efeito direto na replicação viral ou se age por mecanismos indiretos como, por exemplo, na liberação de citocinas pró-apoptóticas (BORDI et al., 2006). Há conhecimento também de que a interação de algumas citocinas com seus respectivos receptores são capazes de desencadear ou mesmo inibir o processo de apoptose ao passo que também pode afetar o sistema imune (PESTKA et al., 2004).

A ativação de alguns mediadores antiapoptóticos faz-se necessária para promover a sobrevivência celular e continuar o processo de replicação viral (GRIFFIN; VERWEIJ; WIERTZ, 2010). Por exemplo, a produção de ATP oriunda da respiração mitocondrial também tem um feed back positivo na replicação viral (TIEDE et al., 2011), porém, as infecções virais são capazes de levar a apoptose celular pela via mitocondrial (HAY; KANNOURAKIS, 2002) ao

mesmo tempo que a apoptose também pode ser inibida devido ao desenvolvimento de estresse oxidativo (TIEDE et al., 2011).

A produção de espécie reativa de oxigênio como no caso de óxido nítrico (NO) já têm sido observada no cérebro de coelhos infectados por BHV5, de modo que o aumento de tal substância foi correlacionado com a disseminação viral (DEZENGRINI et al., 2009; FLORES et al., 2009). Dessa forma, a habilidade de prevenir a apoptose pela via mitocondrial parece ser também um fator determinante para o sucesso na replicação de muitos vírus (SCOTT, 2010). Por sua vez, estudos demonstram que a presença em excesso de ATP sinaliza a ocorrência de dano celular que contribui para desencadear uma resposta inflamatória juntamente com os padrões moleculares associados a patógeno (MARIATHASAN; MONACK, 2007).

A apoptose celular ocorre, portanto, com a formação de corpos apoptóticos devido ao processo de condensação da cromatina, perda de volume celular, aderência da matriz extracelular e da fragmentação do DNA (ELMORE, 2007; FABIAN; KOPPEL; MADDOX-HYTTEL, 2005; GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007). Por fim há a formação dos corpos apoptóticos, constituídos por vesículas presentes na membrana, as quais são fagocitadas rapidamente por macrófagos e posteriormente são eliminadas sem que um processo inflamatório esteja instalado (FABIAN; KOPPEL; MADDOX-HYTTEL, 2005; GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007) Figura 3.

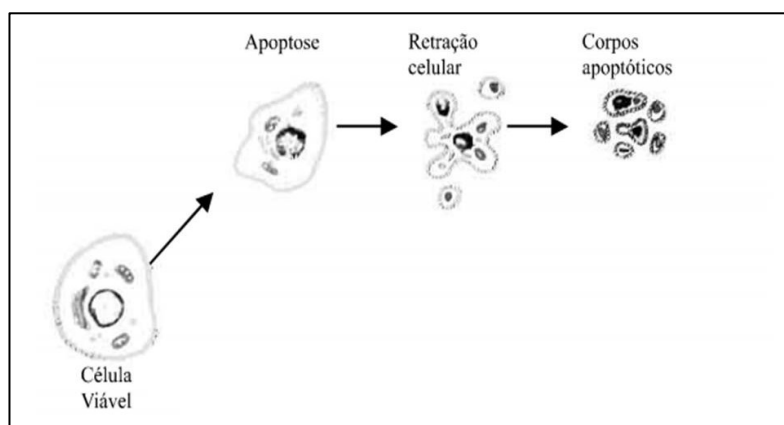


Figura 3 - Representação esquemática da apoptose (Modificado GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007).

3.2.2 Infecção latente causada pelo BHV5

Os vírus da família *Herpesviridae*, possuem como característica marcante, a habilidade de estabelecer latência (FAVIER et al., 2014; FLORES, 2017; FRANCO et al., 2002; THIRY et al., 2005; WORKMAN et al., 2018). Na infecção latente ao contrário da produtiva, não há destruição das células infectadas (NANDI et al., 2011), apresentação de antígenos (FLORES, 2017) e produção de novas partículas virais (ENGELS; ACKERMANN, 1996; FLORES, 2017; FRANCO et al., 2002; NANDI et al., 2011; ROCK, 1994), ficando o genoma viral inativo após a replicação da fase aguda (FLORES, 2017). Tais fatores dificultam a detecção da doença, já que essa infecção é totalmente subclínica, há ausência de sinais clínicos (FRANCO et al., 2002), e há a impossibilidade de detecção do vírus por análises virológicas usuais (ENGELS; ACKERMANN, 1996; JONES, 2003; ROCK, 1994) uma vez que não há anticorpos circulantes contra o vírus (OIE, 2017; FLORES, 2017). Desse modo, animais recentemente infectados ou em estado de latência prolongado podem ser diagnosticados com resultados negativos para infecções causadas pelo Herpesvirus Bovino, justamente pelos anticorpos serem detectados em níveis basais na circulação ou mesmo por não serem detectados (OIE, 2017).

Na forma latente da infecção, somente são expressos genes transcritos relacionados com a latência (HENDERSON et al., 2004; NANDI et al., 2011; PEREZ et al., 2005; WORKMAN et al., 2018). Consequentemente, há inibição do ciclo lítico e indução de um estado anti-apoptótico das células infectadas (HENDERSON et al., 2004). Assim, esses vírus aqui discutidos, são capazes de estabelecer latência em gânglios nervosos sensoriais - gânglios trigêmeos (FAVIER et al., 2014; JONES, 2003; ROIZMAN; PELLET, 2001), se a porta de entrada para a infecção ocorrer pela via respiratória e gânglios sacrais, se ocorrer por mucosa genital (JONES, 2003; ROIZMAN; PELLET, 2001).

Estudos recentes sugerem que o BHV5 pode estabelecer latência em tonsilas e leucócitos do sangue periférico e que tais sítios participam em todos os processos do ciclo viral, como por exemplo, na infecção primária e também na reativação (FAVIER et al., 2014). Entretanto, outros estudos sugerem que

as mucosas nasal e traqueal também podem ser sítios de latência de BHV5 (MEYER et al., 2001). Por sua vez, durante o período de latência, o DNA dessa cepa viral também tem sido detectado em várias áreas do SNC, especialmente no córtex, tálamos, mesencéfalo e ponte encefálica (MEYER et al., 2001; PEREZ et al., 2002; VOGEL et al., 2003).

O fato é que uma vez estabelecida a latência (JONES; CHOWDHURY, 2010), a infecção viral permanece por toda vida do animal e pode ser por eventualidade intercalada à episódios de reativação (FLORES, 2017; FRANCO; ROEHE; VARELA, 2017; JONES; CHOWDHURY, 2008; MUYLKENS et al., 2007). Tal fenômeno se dá devido a estímulos estressantes (parto, desmame, transporte), induzidos (tratamento com corticosteróides) (ACKERMANN; PETERHANS; WYLER, 1982; MEYER et al., 2001; ROIZMAN; PELLETT, 2001) e vacinações (ACKERMANN; PETERHANS; WYLER, 1982; ROIZMAN; PELLETT, 2001). Sendo assim, a reativação ocorre de maneira aguda, contudo o período da excreção viral frequentemente é menor em relação aos que ocorrem na infecção aguda em si (FLORES, 2017).

Uma vez reativado, o vírus é transportado pela mesma via nervosa de volta ao sítio de infecção primária (FLORES, 2017; FRANCO; ROEHE; VARELA, 2017). Após, o vírus replica-se de forma rápida tornando novamente o hospedeiro um disseminador da doença (FLORES, 2017; MÉDICI; ALFIERI; ALFIERI, 2000; RADOSTITS et al., 2007) Figura 4.

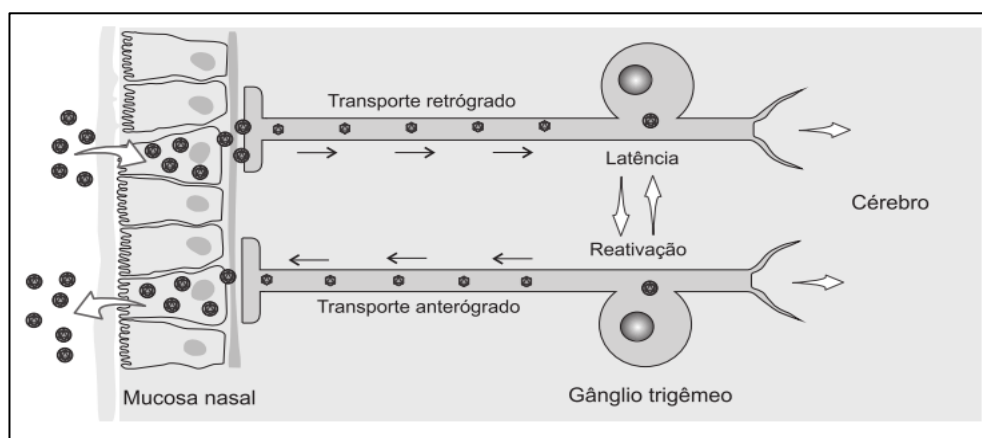


Figura 4 - Patogenia da infecção latente dos *Alphaherpesvirus* (FLORES, 2017).

Assim, o animal pode excretar o vírus via secreção nasal, ocular e genital, sem que o mesmo apresente sinais clínicos da infecção. A identificação de animais disseminadores é o principais alvo em um programa de controle e erradicação (FLORES, 2017; RADOSTITS et al., 2007). Entretanto, se a reativação viral for concomitante com a presença de sinais clínicos, frequentemente essa sintomatologia é mais branda que àquelas resultantes da infecção aguda. Esse último evento denomina-se recorrência ou recrudescência (FLORES, 2017; FRANCO et al., 2002) e por ser casos isolados, pode explicar o fato de apenas um ou poucos animais do rebanho adoecem (RISSI et al., 2007).

3.3 Reposta imunológica na infecção por BHV5

A compreensão da patogênese das doenças infectoparasitárias e das diversas habilidades do hospedeiro e do parasita é facilitada pelo estudo da reposta imune frente aos agentes infecciosos (MACHADO et al., 2004). Sabe-se que o sistema imune possui a capacidade de impedir a replicação viral e evitar a evolução da infecção viral (LORENZI; COELHO-CASTELO, 2011) devido à cooperação entre muitos elementos estruturais, moleculares e celulares os quais participam na ação de defesa do sistema imunológico (MACHADO et al., 2004).

O sistema imune tem, portanto a função de conferir proteção contra microrganismos infecciosos (LORENZI; COELHO-CASTELO, 2011; CRUVINEL et al., 2010; MESQUITA JÚNIOR et al., 2010). Diante desse contexto, a imunidade inata se destaca por ser a primeira linha de defesa, estando presente antes mesmo de uma infecção estar instalada e sendo capaz de responder rapidamente (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015) independentemente de um estímulo prévio (CRUVINEL et al., 2010; FLORES, 2017; MESQUITA JÚNIOR et al., 2010).

Na imunidade inata há a resposta por meio de mecanismos celulares e bioquímicos que reagem aos produtos dos agentes patogênicos e das células agredidas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Esse é o primeiro mecanismo

de defesa natural do hospedeiro, o qual é formado pela barreira física, química (ABBAS et al., 2015), biológica, pelos componentes celulares e pelas moléculas solúveis (CRUVINEL et al., 2010; MESQUITA JÚNIOR et al., 2010). Os elementos que formam tais barreiras são constituídos por pele, pêlo, muco, enzimas, peptídeos antivirais e antibacterianos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015), assim como as defensinas e as proteínas expressas por células epiteliais (LORENZI; COELHO-CASTELO, 2011). Também há a participação de células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos), outras células linfóides inata, proteínas sanguíneas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015) incluindo membros do sistema complemento (SC), células dendríticas (DC) e células natural killer (NK) e outros mediadores da inflamação (FLORES, 2017; ABBAS et al., 2015) como por exemplo a participação especial do Interferon tipo I (IFN-I) (FLORES, 2017) Figura 5.

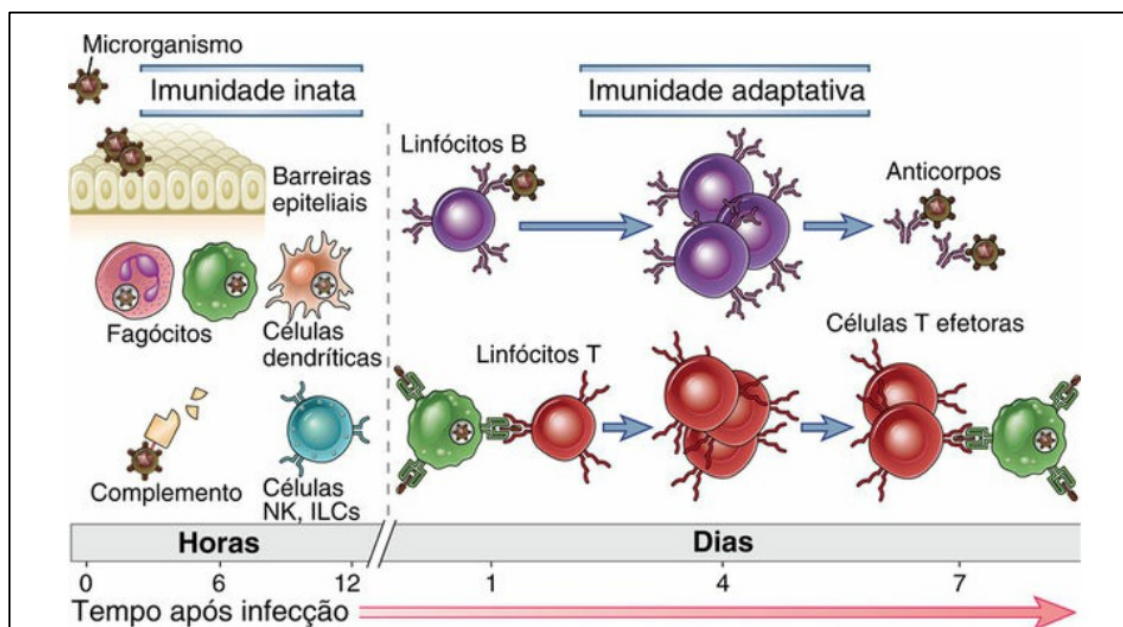


Figura 5 - Mecanismo de ação da Imunidade inata e adaptativa (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015)

A imunidade inata atua em conjunto com a imunidade adaptativa (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; CRUVINEL et al., 2010; FLORES, 2017; MESQUITA JÚNIOR et al., 2010) no processo da formação da imunidade

contra infecções virais e qualquer outro tipo de agente infeccioso (FLORES, 2017). Os principais componentes celulares responsáveis pela conexão entre a imunidade inata e adaptativa são as DC (FLORES, 2017; LORENZI; COELHO-CASTELO, 2011) e macrófagos (LORENZI; COELHO-CASTELO, 2011). As DC circulam pelos tecidos periféricos e ao capturar os antígenos se dirigem aos órgãos linfóides secundários, onde estimulam as células linfóides (FLORES, 2017).

A imunidade inata é, portanto, o principal mecanismo de ação na degradação das células infectadas sendo responsável pelo reconhecimento dos vírus por meio de receptores das células imunes (LORENZI; COELHO-CASTELO, 2011). Enquanto na imunidade adaptativa há maior especificidade no reconhecimento de diferentes agentes patogênicos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; LORENZI; COELHO-CASTELO, 2011; IWASAKI; MEDZHITOV, 2010) pelos linfócitos T e B (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; FARBER et al., 2016) ou anticorpos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015) e a habilidade de formar memória da infecção (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; FARBER et al., 2016). Isso se deve ao fato de que nesse tipo de resposta há a produção de anticorpos neutralizantes (LORENZI; COELHO-CASTELO, 2011) pelos linfócitos B (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; MACHADO et al., 2004) e de células específicas capazes de impedir a disseminação da infecção (LORENZI; COELHO-CASTELO, 2011) devido ao fato de serem capazes de se ligarem aos vírus que se encontram no meio extracelular, impedindo que penetrem em uma célula não infectada (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; MACHADO et al., 2004).

Anticorpos do tipo IgA, presentes na mucosa respiratória e intestinal são importantes para a neutralização de vírus que infectam o hospedeiro por tais vias. IgG e IgM presentes no plasma agem nos episódios de reinfecção e viremia secundária (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Além disso, os anticorpos podem se ligar à células infectadas, viabilizando a ação das células NK (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; MACHADO et al., 2004). Por fim os

anticorpos também podem ativar a via clássica do complemento levando a lise das cápsulas virais (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

De maneira diferente da resposta inata, a resposta adaptativa ocorre via complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (FARBER et al., 2016). Desse modo, há apresentação de antígeno (APC) pelos macrófagos, linfócitos B e pelas DC, via MHC I ou MHC II, os quais conseqüentemente ativam linfócitos T (TIKOO; CAMPOS; BABIUK, 1995). A imunidade adaptativa é, portanto ativada quando a infecção persiste (IWASAKI; MEDZHITOV, 2010). Entretanto, estudos recentes relatam a capacidade dos herpesvirus em driblar o sistema imune do hospedeiro ao inibir a via de processamento de apresentação do antígeno MHC classe I, do hospedeiro, na superfície da célula infectada (GRIFFIN; VERWEIJ; WIERTZ, 2010). Assim, nota-se que há uma grande capacidade adaptativa por parte dos vírus que possibilitam os mesmos a ultrapassarem essa resposta imune, evoluindo para um curso crônico da doença (LORENZI; COELHO-CASTELO, 2011) e no caso do herpesvirus bovino, a evolução se dá para a forma latente da doença (FLORES, 2017; FRANCO; ROEHE; VARELA, 2017; GRIFFIN; VERWEIJ; WIERTZ, 2010; HENDERSON et al., 2004; NANDI et al., 2011; PEREZ et al., 2005; WORKMAN et al., 2018).

A imunidade adaptativa pode ser subdividida em duas diferentes formas de respostas: a humoral e a mediada por células. Os linfócitos B participam da resposta humoral ao secretarem anticorpos que se ligam a microrganismos extracelulares e suas toxinas auxiliando em sua eliminação por fagocitose e ligação e ativação da liberação de mediadores inflamatórios das células. Já os linfócitos T auxiliares e T citotóxicos, complementam a resposta imune celular ao passo que os primeiros são responsáveis por ativar macrófagos para exterminar os microrganismos fagocitados e os segundos por destruir diretamente a células infectadas e eliminar o reservatório de infecção (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

3.4 Principais componentes da resposta imune inata e adaptativa em infecção por BHV5

Componentes do sistema prurinérgico parecem influenciar na permeabilidade da barreira hematoencefálica através da indução de NO e de quimiocinas (essas ao ativarem as células gliais) (HAYNES et al., 2006). Diante desse contexto, a secreção de nucleotídeos e nucleosídeos por leucócitos, plaquetas e células danificadas, funciona como mediadores com habilidades para modular o processo inflamatório, a resposta imune, assim como a trombose vascular (SITKOVSKY; OHTA, 2005).

Por sua vez, um vasto grupo de proteínas, classificadas como citocinas, secretadas por muitas células do sistema imune com diversificadas estruturas e funções também regulam e coordenam grande parte da resposta imune inata e adaptativa (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). As citocinas (ou interleucinas [ILs]) são peptídeos produzidos por uma variedade de células que moderam e influenciam a função de outras células do sistema imunológico (FLORES, 2017). Essas moléculas são responsáveis pelo crescimento e diferenciação de todas as células imunes, pela ativação de funções efetoras dos linfócitos e fagócitos e pelo movimento de células imunes do sangue para os tecidos e dentro destes (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Assim, durante o processo de replicação viral as citocinas se encontram em níveis elevados na circulação (SAINZ; HALFORD, 2002).

Células infectadas e não infectadas são capazes de produzir citocinas de primeiro evento: interferon alfa e beta (IFN- α e IFN- β , respectivamente), as quais são detectáveis dentro de cinco horas após a infecção (OHMANN; BABIUK, 1996a). Essas células estão associadas à receptores que induzem um estado antiviral no hospedeiro. Essa ação biológica é uma das mais importantes atividades antivirais na resposta imunológica inata. Isso se deve ao fato de que em células não infectadas, interferon do tipo I induzem a expressão de genes os quais resultam em produtos capazes de interferir na replicação viral e contribuir para o estado antiviral do hospedeiro (SCHINDLER; LEVY; DECKER, 2007). Enquanto em células infectadas, há a indução e expressão de

genes cujos produtos têm ação nos linfócitos T citotóxicos (CTL) a fim de torná-los mais suscetíveis à destruição (ACKERMANN; DERSCHEID; ROTH, 2010; SCHINDLER; LEVY; DECKER, 2007).

Os IFN- α e IFN- β assim como os macrófagos e as células NK são responsáveis pela proteção na fase inicial da infecção (CHADHA et al., 2004). Interferon é a mais importante citocina envolvida na defesa antiviral (CHASE; ELMOWALID; YOUSIF, 2004). Os IFN-I são citocinas essenciais do sistema imune inato (PESTKA et al., 2004). Esses elementos são fundamentais para a diferenciação, amplificação e regulação da resposta imune (OHMANN; BABIUK, 1996a). Essas células contribuem para o aumento da expressão de MHC I, da apresentação de antígenos, assim como colaboram na ativação de DC, macrófagos e linfócitos NK (FLORES, 2017).

Em comum com outros vírus do herpes, o herpesvirus bovino gera forte resposta de células T CD8, apesar de haver poucas informações sobre a especificidade antigênica das células T respondentes à infecção viral (HART et al., 2017). Porém, sabe-se que os linfócitos T CD8⁺ (citotóxicos) são estimulados pelos interferons (OHMANN; BABIUK, 1996a) e células NK, que lisam células infectadas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; LORENZI; COELHO- CASTELO, 2011; OHMANN; BABIUK, 1996b), enquanto outras citocinas ativam linfócitos T CD4⁺ (auxiliares), que liberam IFN γ e promovem a síntese de anticorpos pelos linfócitos B (OHMANN; BABIUK, 1996a).

Estudos demonstram que receptores do tipo Toll também possuem papéis importantes na resposta imunológica primária, uma vez que internalizam antígenos virais e produzem IFN- α , IFN- β , TNF- α e IL-12, que agem como fonte de conexão entre o sistema imunológico inato e adaptativo (BARCET; CELLA; COLONNA, 2005; REIZIS et al., 2011). Esses receptores estão presentes principalmente em macrófagos, neutrófilos e DCs (CRUVINEL et al., 2010).

A ativação dos linfócitos T CD4⁺ via MHC II são responsáveis e fundamentais para o clearance viral (JOHNSON; CHU; MILLIGAN, 2008). Essa ativação de TCD4⁺ também colabora com a produção de anticorpos pelas

células B (MACHADO et al., 2004). Os padrões, de resposta imune adaptativa, mais conhecidos são Th1, Th2, Th17, Th0. A maioria das infecções virais induz a produção de IFN pelas células NK, esse fato leva a uma preferência para ativação do padrão Th1 (LORENZI; COELHO-CASTELO, 2011). A resposta do Th1 frente a infecção viral ocorre essencialmente pela produção de IFN-gama (McNAB et al., 2015) pelo fato de possuir diversas funções antivirais como a ativação de macrófagos, aumento no fluxo de linfócitos e regulação do reconhecimento do patógeno e da maneira de processar os antígenos (JAIME-RAMIREZ et al., 2011; SCHOENBORN; WILSON, 2007).

A ativação de células T CD8₊ exercem um efeito citotóxico nas células alvo, devido ao reconhecimento de peptídeos virais via MHC classe I. Posteriormente há liberação de granzima e de perforinas com lise das células infectadas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; SALTI et al., 2011; LORENZI; COELHO- CASTELO, 2011) e também dos vírus (SALTI et al., 2011; MACHADO et al., 2004). Essas enzimas são responsáveis por ativar a apoptose celular (PARDO et al., 2004), assim como o Fas (CD95), uma molécula de superfície encontrada nesses linfócitos (HART; MACHUGH; MORRISON, 2011; MESQUITA JÚNIOR et al., 2010). Entretanto a determinação do status da infecção depende também de produção de outras células e citocinas pró e anti-inflamatória (RISALDE et al., 2011).

A célula hospedeira possui um imenso arsenal imunológico contra a infecção causada pelo BHV de forma que estes são capazes de se defender a partir de diversas estratégias de evasão, as quais iludem e retardam a resposta imune do hospedeiro (WHITE; SUZANNE BEARD; BARTON, 2012). A resposta imunológica tem papel essencial na defesa contra agentes patogênicos (JANEWAY JÚNIOR, 2001). Assim, a interação que ocorre entre BHV e o hospedeiro é essencial para a compreensão dos fatores relacionados à latência, transmissão, infecção e demais processos da infecção em si (WHITE; SUZANNE BEARD; BARTON, 2012).

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 8 ed. Elsevier, 2015. 544p.

ACKERMANN, M.; PETERHANS, E.; WYLER, R. DNA of bovine herpesvirus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. **American Journal of Veterinary Research**, v. 43, n. 1, p. 36–40, 1982.

ACKERMANN, M.; ENGELS, M. Pro and contra IBR-eradication. **Veterinary Microbiology**, v. 113, n. 3–4, p. 293–302, 2006.

ACKERMANN, M. R.; DERSCHEID, R.; ROTH, J. A. Innate immunology of bovine respiratory disease. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 26, n. 2, p. 215–228, 2010.

ANZILIERO, D. et al. A recombinant bovine herpesvirus 5 defective in thymidine kinase and glycoprotein E is immunogenic for calves and confers protection upon homologous challenge and BoHV-1 challenge. **Veterinary Microbiology**, v. 154, n. 1–2, p. 14–22, 2011.

ANZILIERO, D. et al. Resposta sorológica aos herpesvirus bovino tipos 1 e 5 e vírus da diarreia viral bovina induzida por vacinas comerciais. **Ciência Rural**, v. 45, n. 1, p. 58–63, 2015.

BARANOWSKI, E. et al. Structural and functional analysis of bovine herpesvirus 1 minor glycoproteins. **Veterinary Microbiology**, v. 53, n. 1–2, p. 91–101, 1996.

BARBOSA, A. C. V. DA C.; BRITO, W. M. E. D. DE; ALFAIA, B. T. Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) no Estado de Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1368–1373,

2005.

BARCHET, W.; CELLA, M.; COLONNA, M. Plasmacytoid dendritic cells - Virus experts of innate immunity. **Seminars in Immunology**, v. 17, n. 4, p. 253–261, 2005.

BELKNAP, E. B. et al. Experimental Infection of Neonatal Calves with Neurovirulent Bovine Herpesvirus Type 1.3. **Veterinary Pathology**, v. 365, p. 358–365, 1994.

BELTRÃO, N. et al. Infecção e enfermidade neurológica pelo herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5): Coelhos como modelo experimental. **Pesquisa Veterinária eira**, v. 20, n. 4, p. 144–150, 2000.

BIELANSKI, A.; DUBUC, C. In vitro fertilization and culture of ova from heifers infected with bovine herpesvirus-1 (BHV-1). **Theriogenology**, v. 41, n. 6, p. 1211–1217, 1994.

BISWAS, S. et al. Bovine herpesvirus-1 (BHV-1) - a re-emerging concern in livestock: a revisit to its biology, epidemiology, diagnosis, and prophylaxis. **Veterinary Quarterly**, v. 33, n. 2, p. 68–81, 2013.

BORDI, L. et al. Bcl-2 inhibits the caspase-dependent apoptosis induced by SARS-CoV without affecting virus replication kinetics. **Archives of Virology**, v. 151, n. 2, p. 369–377, 2006.

BRASIL. **Ministério da Agricultura. Bovinos e Bubalinos**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. Acesso em: 15 de janeiro de 2018.

CAMPOS, F. S. et al. 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. et al. Efficacy of an inactivated, recombinant bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) vaccine. **Veterinary Microbiology**, v. 148, n. 1, p. 18–26, 2011.

CADORE, G. C. et al. Reativação e distribuição do DNA latente do herpesvírus bovino tipo 5 no encéfalo de ovinos infectados experimentalmente. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 12, p. 1090–1096, 2011.

CARDOSO, T. C. et al. Immunohistochemical approach to the pathogenesis of clinical cases of Bovine Herpesvirus type 5 infections. **Diagnostic Pathology**, v. 5, n. 1, p. 57, 2010.

CARDOSO, T. C. et al. Comparative analysis of the replication of bovine herpesvirus 1 (BHV1) and BHV5 in bovine-derived neuron-like cells. **Archives of Virology**, v. 160, n. 11, p. 2683–2691, 2015.

CHADHA, K. C. et al. Interferons and interferon inhibitory activity in disease and therapy. **Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)**, v. 229, n. 4, p. 285–290, 2004.

CHASE, C. C. L.; ELMOWALID, G.; YOUSIF, A. A. A. The immune response to bovine viral diarrhea virus: A constantly changing picture. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 95–114, 2004.

CHOWDHURY, S. I. et al. Bovine herpesvirus 5 glycoprotein E is important for neuroinvasiveness and neurovirulence in the olfactory pathway of the rabbit. **Journal of virology**, v. 74, n. 5, p. 2094–2106, 2000.

CHOWDHURY, S. I. et al. Neuropathology of Bovine Herpesvirus Type 5 (BHV-5) Meningo-encephalitis in a Rabbit Seizure Model. **Journal of Comparative Pathology**, v. 117, n. 4, p. 295–310, 1997.

CRUVINEL, W. D. M. et al. Sistema imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434–461, 2010.

D'ARCE, R. C. F. et al. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. **Veterinary Microbiology**, v. 88, n. 4, p. 315–324, 2002.

DAVISON, A. J. Herpesvirus systematic. **Veterinary Microbiology**, v. 143, n. 1, p. 52–69, 2010.

DAVISON, A. J. et al. The order *Herpesvirales*. **Archives of Virology**, v. 154, n. 1, p. 171–177, 2009.

DEL FAVA, C. et al. Erradicação do herpesvírus bovino - 1 (BHV-1) de um rebanho bovino leiteiro em manejo semi-intensivo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n. 2, p. 65–68, 1998.

DEL FAVA, Claudia. Índices reprodutivos e características de desempenho em bovinos de corte infectados e não infectados pelo Herpesvírus bovino tipo 1 (HVB-1). 2001. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

DELHON, G. et al. Genome of bovine herpesvirus 5. **Journal of Virology**, v. 77, n. 19, p. 10339–10347, 2003.

DEL MÉDICO ZAJAC, M. P. et al. BHV-1 vaccine induces cross-protection

against BHV-5 disease in cattle. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 3, p. 327–334, 2006.

DEZENGRINI, R. et al. Bovine herpesvirus 5 induces an overproduction of nitric oxide in the brain of rabbits that correlates with virus dissemination and precedes the development of neurological signs. **Journal of Neurovirology**, v. 15, n. 2, p. 153–163, 2009.

DIEL, D. G. et al. O Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) pode utilizar as rotas olfatória ou trigeminal para invadir o sistema nervoso central de coelhos, dependendo da via de inoculação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 164–170, 2005.

DÖHNER, K. et al. Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, n. 8, p. 2795–2809, 2002.

ELMORE, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.

ENGELS, M.; ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Veterinary Microbiology**, v. 53, n. 1–2, p. 3–15, 1996.

ESTEVES, P. A. et al. Bovine herpesvirus type 5 in the semen of a bull not exhibiting clinical signs. **Veterinary Record**, v. 152, n. 21, p. 658–659, 2003.

FARBER, D. L. et al. Immunological memory: Lessons from the past and a look to the future. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 2, p. 124–128, 2016.

FABIAN, D.; KOPPEL, J.; MADDOX-HYTTEL, P. Apoptotic processes during mammalian preimplantation development. **Theriogenology**, v. 64, n. 2, p. 221–

231, 2005.

FAVIER, P. A. et al. Latency of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) in tonsils and peripheral blood leukocytes. **Veterinary Journal**, v. 202, n. 1, p. 134–140, 2014.

FINO, T. C. M. et al. Infecções por herpesvirus tipo 1 (BoHV-1) e suas implicações na reprodução bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 2, p. 122–127, 2012.

FLORES, E. F. **Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**. 3. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2017.

FLORES, E. F. et al. Neuropatogênese experimental da infecção pelo herpesvírus bovino tipo 5 em coelhos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 1–16, 2009.

FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M.; VARELA, A.P.M. *Herpesviridae*. In: Flores, E.F., **Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**, Santa Maria: Editora UFSM, 2017, cap. 19.

FRANCO, A. C. et al. Construction and characterization of a glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus type 1.2 strain isolated in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 274–278, 2002.

FRENCH, E. L. A specific virus encephalitis in calves: isolation and characterization of the causal agent. **Australian Veterinary Journal**, v. 38, n. 4, p. 216–221, 1962.

GARCIA, A. F. et al. Bovine herpesvirus type 5 infection regulates Bax/BCL-2 ratio. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 3, p. 3897–3904, 2013.

GONÇALVES, R. F. et al. In vitro interaction of bovine herpesvirus 1 with uterine tube epithelial cells and oocytes. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, p. 1–6, 2015.

GRAHAM, D. A. Bovine herpes virus-1 (BoHV-1) in cattle—a review with emphasis on reproductive impacts and the emergence of infection in Ireland and the United Kingdom. **Irish Veterinary Journal**, v. 66, n. 1, p. 1–15, 2013.

GRIFFIN, B. D.; VERWEIJ, M. C.; WIERTZ, E. J. H. J. Herpesviruses and immunity: The art of evasion. **Veterinary Microbiology**, v. 143, n. 1, p. 89–100, 2010.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancrologia**, v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007.

HART, J. et al. Identification of immediate early gene products of bovine herpes virus 1 (BHV-1) as dominant antigens recognized by CD8 T cells in immune cattle. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 7, p. 1843–1854, 2017.

HART, J.; MACHUGH, N. D.; MORRISON, W. Theileria annulata-transformed cell lines are efficient antigen-presenting cells for in vitro analysis of CD8 T cell responses to bovine herpesvirus-1. **Veterinary Research**, v. 42, n. 1, p. 119, 2011.

HAY, S.; KANNOURAKIS, G. A time to kill : viral manipulation of the cell death program. **Journal of General Virology**, v. 38, n. 7, p. 1547–1564, 2002.

HAYNES, S. E. et al. The P2Y₁₂ receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. **Nature Neuroscience**, v. 9, n. 12, p. 1512–1519, 2006.

HENDERSON, G. et al. The latency-related gene encoded by bovine herpesvirus 1 can suppress caspase 3 and caspase 9 cleavage during productive infection. **Journal of Neurovirology**, v. 10, n. 1, p. 64–70, 2004.

HUSHUR, O. et al. Restriction of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) growth in non-permissive cells beyond the expression of immediate early genes. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, n. 4, p. 453–455, 2004.

ISERNHAGEN, A. J. et al. Asymptomatic encephalitis in calves experimentally infected with bovine herpesvirus-5. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 52, n. 12, p. 1312–1318, 2011.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. **Science**, v. 327, n. 5963, p. 291–295, 2010.

JAIME-RAMIREZ, A. C. et al. IL-12 Enhances the Antitumor Actions of Trastuzumab via NK Cell IFN- γ Production. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 6, p. 3401–3409, 2011.

JANEWAY JÚNIOR, C. A. How the immune system protects the host from infection. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 13, p. 1167–1171, 2001.

JOHNSON, A. J.; CHU, C.; MILLIGAN, G. N. Effector CD4⁺ T-cell involvement in clearance of infectious herpes simplex virus type 1 from sensory ganglia and spinal cords. **Journal of Virology**, v. 82, n. 19, p. 9678–9688, 2008.

JONES, C. Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 1, p. 79–95, 2003.

JONES, C.; CHOWDHURY, S. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex

and development of improved vaccines. **Animal Health Research Reviews**, v. 8, n. 2, p. 187–205, 2008.

JONES, C.; CHOWDHURY, S. Bovine herpesvirus type 1 (bHV-1) is an important cofactor in the bovine respiratory disease complex. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 26, n. 2, p. 303–321, 2010.

KATHIRIYA, J. et al. Seroprevalence of infectious bovine rhinotracheitis (bHV-1) in dairy animals with reproductive disorders in saurashtra of Gujarat , India. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, n. 3, p. 1371–1376, 2018.

KAZIYAMA, V. M.; FERNANDES, M. J. B.; SIMONI, I. C. Atividade antiviral de extratos de plantas medicinais disponíveis comercialmente frente aos herpesvírus suíno e bovino. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 3, p. 522–528, 2012.

KIRKLAND, P. D. et al. Infertility and venereal disease in cattle inseminated with semen containing bovine herpesvirus type 5. **The Veterinary Record**, v. 165, n. 4, p. 111–113, 2009.

KUNRATH, F. C. et al. Soroneutralização e imunofluorescência utilizando anticorpos monoclonais no diagnóstico rápido de infecções pelo herpesvírus bovino tipos 1 e 5 (BHV-1 e BHV-5). **Ciência Rural**, v. 34, n. 6, p. 1877–1883, 2004.

LORENZI, J. C. C.; COELHO-CASTELO, A. A. M. Resposta imune contra infecções virais. **Scire Salutis**, v. 1, n. 2, p. 35–44, 2011.

LUNARDI, M. et al. Neurological and epidemiological aspects of a BoHV-5 meningoencephalitis outbreak. **Brazilian Archives of Biology and**

Technology, v. 52, n. Special Number, p. 77–85, 2009.

MACHADO, P. R. et al. Immune response mechanisms to infections. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 6, p. 647–664, 2004.

MARIATHASAN, S.; MONACK, D. M. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 1, p. 31–40, 2007.

MARS, M. H. et al. Airborne transmission of bovine herpesvirus 1 infections in calves under field conditions. **Veterinary Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 1–13, 2000.

MCNAB, F. et al. Type I interferons in infectious disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 2, p. 87–103, 2015.

MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1, decorrente de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 347–350, 2000.

MESQUITA JÚNIOR, D. et al. Sistema imunitário – Parte II fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 5, p. 552–580, 2010.

METTENLEITER, T. C. Budding events in herpesvirus morphogenesis. **Virus Research**, v. 106, n. 2, p. 167–180, 2004.

MEYER, G. et al. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. **Archives of Virology**, v. 146, n. 4, p. 633–652, 2001.

MOREIRA, S. P. G. et al. Monitoração de anticorpos neutralizantes para o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina em bezerros. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 3, p. 127–130, 2001.

MURATA, T. et al. Growth behavior of bovine herpesvirus-1 in permissive and semi-permissive cells. **Virus Research**, v. 61, n. 1, p. 29–41, 1999.

MUYLKENS, B. et al. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Research**, v. 38, n. 2, p. 181–209, 2007.

NANDI, S. et al. Serological evidences of bovine herpesvirus-1 infection in bovines of organized farms in India. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 58, n. 2, p. 105–109, 2011.

NANDI, S. et al. Bovine herpes virus infections in cattle. **Animal Health Research Reviews**, v. 10, n. 1, p. 85–98, 2009.

OHMANN, H. B.; BABIUK, L. A. Alteration of some leukocyte functions following in vivo and in vitro exposure to recombinant bovine alpha- and gamma-interferon. **Journal of Interferon Research**, v. 6, n. 2, p. 123–136, 1986a.

OHMANN, H. B.; BABIUK, L. A. Alteration of alveolar macrophage functions after aerosol infection with bovine herpesvirus type 1. **Infection and Immunity**, v. 51, n. 1, p. 344–347, 1986b.

OIE – World organization for animal health. Infectious bovine rhinotracheitis/ infectious pustular vulvovaginitis. In: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2017**. [s.l.] World organization for animal health, 2017. p. 1–19.

OLIVEIRA, M. T. et al. Detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in semen from

Brazilian bulls. **Theriogenology**, v. 75, n. 6, p. 1139–1145, 2011.

PARDO, J. et al. Apoptotic pathways are selectively activated by granzyme A and/or granzyme B in CTL-mediated target cell lysis. **Journal of Cell Biology**, v. 167, n. 3, p. 457–468, 2004.

PEREZ, S. E. et al. Primary infection, latency, and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. **Veterinary Pathology**, v. 39, n. 4, p. 437–444, 2002.

PEREZ, S. et al. Latency-related gene encoded by bovine herpesvirus 1 promotes virus growth and reactivation from latency in tonsils of infected calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 393–401, 2005.

PESTKA, S. et al. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 22, p. 929–979, 2004.

PHILPOTT, M. The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. **British Veterinary Journal**, v. 149, n. 4, p. 339–369, 1993.

QUEIROZ, G. R. et al. Cerebrospinal fluid changes in cattle with rabies or with BoHV-5 meningoencephalitis and its correlation with the severity of CNS inflammatory process. **Research in Veterinary Science**, v. 118, n. 2018, p. 389–394, 2018.

RADOSTITS, O. M. et al. **Veterinary Medicine: a textbok of the diseases of cattle, sheep, goats, pigs and horses**, 10th. Philadelphia: Saunders-Elsevier, 2007.

RASHEED, M. A. et al. Prediction of conserved sites and domains in glycoproteins B, C and D of herpes viruses. **Microbial Pathogenesis**, v. 116, p.

91–99, 2018.

REBORDOSA, X. et al. Glycoprotein E of bovine herpesvirus type 1 is involved in virus transmission by direct cell-to-cell spread. **Virus Research**, v. 45, n. 1, p. 59–68, 1996.

REIZIS, B. et al. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. **Annual Review of Immunology**, v. 29, p. 163–183, 2011.

RISALDE, M. A. et al. Response of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in calves with subclinical bovine viral diarrhea challenged with bovine herpesvirus-1. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 144, n. 1–2, p. 135–143, 2011.

RISSI, D. R. et al. Meningoencefalite por herpesvírus bovino bovino-5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 7, p. 251–260, 2007.

ROCK, D. L. Latent infection with bovine herpesvirus type 1. **Seminars in Virology**, v. 5, p. 233–240, 1994.

ROIZMAN, B.; KNIPE, D. Herpes simplex viruses and their replication. In: KNIPE, D.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins Publishers, 2001. v. 4, p. 2399–2460.

ROIZMAN B.; PELLETT P.E. The family *Herpesviridae*: A brief introduction. In: KNIPE, D.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**, Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins Publishers, 2001. v. 4, p. 2381–2398..

ROLA, J. G. et al. Association between antibody status to bovine herpesvirus 1 and quality of milk in dairy herds in Poland. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 2, p. 781–789, 2015.

SALTI, S. M. et al. Granzyme B regulates antiviral CD8+ T cell responses. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 12, p. 6301–6309, 2011.

SAINZ, B.; HALFORD, W. P. Alpha/Beta interferon and gamma interferon synergize to inhibit the replication of herpes simplex virus type 1. **Journal of Virology**, v. 76, n. 22, p. 11541–11550, 2002.

SCHINDLER, C.; LEVY, D. E.; DECKER, T. JAK-STAT signaling: From interferons to cytokines. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 28, p. 20059–20063, 2007.

SCHOENBORN, J. R.; WILSON, C. B. Regulation of interferon- γ during innate and adaptive immune responses. **Advances in Immunology**, v. 96, n. 07, p. 41–101, 2007.

SCHUDEL, A. A. et al. Infections of calves with antigenic variants of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurological disease. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 33, n. 1–10, p. 303–310, 1986.

SCHWYZER, M.; ACKERMANN, M. Molecular virology of ruminant herpesviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 53, n. 1–2, p. 17–29, 1996.

SCOTT, I. The role of mitochondria in the mammalian antiviral defense system. **Mitochondrion**, v. 10, n. 4, p. 316–320, 2010.

SILVA, A. D. A. et al. Experimental infection of rabbits with a recombinant bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) gI, gE and US9-negative. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 11, p. 913–918, 2009.

SILVA, A. M. DA et al. Pathogenesis of meningoencephalitis in rabbits by bovine herpesvirus type-5 (BHV-5). **Revista De Microbiologia**, v. 30, n. 1, p.

22–31, 1999.

SITKOVSKY, M. V.; OHTA, A. The “danger” sensors that STOP the immune response: The A2 adenosine receptors? **Trends in Immunology**, v. 26, n. 6, p. 299–304, 2005.

SPEAR, P. G. Herpes simplex virus: Receptors and ligands for cell entry. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 5, p. 401–410, 2004.

STATHAM, J. M. E.; RANDALL, L. V.; ARCHER, S. C. Reduction in daily milk yield associated with sub-clinical Bovine Herpes Virus 1. **Veterinary Record**, v. 177, n. 13, p. 339, 2015.

STEUKERS, L. et al. Comparative analysis of replication characteristics of BoHV-1 subtypes in bovine respiratory and genital mucosa explants: A phylogenetic enlightenment. **Veterinary Research**, v. 42, n. 1, p. 33, 2011.

STUDDERT, M. J. et al. Bovine encephalitis herpesvirus. **Veterinary Record**, v. 125, n. 22, 1989.

TAKIUCHI, E. et al. Bovine herpesvirus type 1 abortions detected by a semi-nested PCR in Brazilian cattle herds. **Research in Veterinary Science**, v. 79, n. 1, p. 85–88, 2005.

TANGHE, S. et al. Inhibition of bovine sperm-zona binding by bovine herpesvirus-1. **Reproduction**, v. 130, n. 2, p. 251–259, 2005.

THIRY, J. et al. Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. **Veterinary Research**, v. 37, n. 2, p. 169–190, 2006.

THIRY, E. et al. Recombination in alphaherpesviruses. **Reviews in Medical**

Virology, v. 15, n. 2, p. 89–103, 2005.

TIEDE, L. M. et al. Oxygen matters: Tissue culture oxygen levels affect mitochondrial function and structure as well as responses to HIV viroproteins. **Cell Death and Disease**, v. 2, n. 12, p. e246, 2011.

TIKOO, S. K.; CAMPOS, M.; BABIUK, L. A. Bovine herpesvirus 1 (Bhv-1): biology, pathogenesis, and control. In: MARAMOROSCH, K.; MURPHY, F. A.; SHATKIN, A. J. (Eds.). **Advances in Virus Research**. San Diego, California: Academic Press Limited, 1995. v. 45, p. 191–223.

VAN DONKERSGOED, JOYCE; BABIUK, L. A. Diagnosing and managing the respiratory form of infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Medicine (USA)**, v. 1, p. 86–94, 1991.

SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS. **Herpesviridae: Viralzone 2017**. Disponível em: < http://viralzone.expasy.org/all_by_species/176.html > Acesso em: 18 mai. 2018.

VOGEL, F. S. F. et al. Intrapreputial infection of young bulls with bovine herpesvirus type 1.2 (BHV-1.2): acute balanoposthitis, latent infection and detection of viral DNA in regional neural and non-neural tissues 50 days after experimental reactivation. **Veterinary Microbiology**, v. 98, n. 3–4, p. 185–196, 2004.

VOGEL, F. S. F. et al. Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 10, p. 4512–4520, 2003.

WEBER, M. N. et al. Evaluation of prenucleic acid extraction for increasing sensitivity of detection of virus in bovine follicular fluid pools. **Theriogenology**,

v. 79, n. 6, p. 980–985, 2013.

WHITE, D. W.; SUZANNE BEARD, R.; BARTON, E. S. Immune modulation during latent herpesvirus infection. **Immunological Reviews**, v. 245, n. 1, p. 189–208, 2012.

WILD, P. et al. Impairment of nuclear pores in bovine herpesvirus 1-infected MDBK cells. **Journal of Virology**, v. 79, n. 2, p. 1071–1083, 2005.

WORKMAN, A. et al. The Wnt signaling pathway is differentially expressed during the bovine herpesvirus 1 latency-reactivation cycle: evidence that two protein kinases associated with neuronal survival (Akt3 and bone morphogenetic protein receptor 2) are expressed at higher. **Journal of Virology**, v. 92, n. 7, p. e01937-17, 2018.

WRATHALL, A. E.; SIMMONS, H. A.; VAN SOOM, A. Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilisation with virus-infected semen. **Theriogenology**, v. 65, n. 2, p. 247–274, 2006.

WYLER, R.; ENGELS, M.; SCHWYZER, M. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV1). In: WYTTMAN, G., BECKER, I. (Eds.). **Herpesvirus diseases of cattle, horses, and pigs**. Boston, MA: Springer, 1989. p. 1-72.

Capítulo 2

**CAPÍTULO 2 – BOVINE HERPESVIRUS 5 PROMOTES MITOCHONDRIAL
DYSFUNCTION IN CULTURED BOVINE MACROPHAGES WHICH DOES
NOT AFFECT VIRUS REPLICATION**

Veterinary Microbiology

Short Communication

Tereza C. Cardoso^{1*}, Jamila C. Baptistella¹, Lucas O. Hidenori¹, Lilian Baptistioli¹, Helena L. Ferreira², Roberto Gameiro¹, Eduardo F Flores³

¹ UNESP- University of São Paulo State, College of Veterinary Medicine, Araçatuba, SP, Brazil

² Department of Veterinary Medicine, FZEA- USP- University of Sao Paulo, Pirassununga – SP, Brazil

³ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Setor de Virologia, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

* Corresponding author. Tel.: +55 1836361379

E-mail address: tcardoso@fmva.unesp.br (T.C. Cardoso).

Abstract

Bovine alphaherpesvirus 1 (BHV1) and 5 (BHV5) are known to establish latent infections mainly in trigeminal ganglion, yet leukocytes and tonsils have also been described as sites of latency in experimentally infected cattle. However, little information is available on which immune cells are susceptible to BHV5 infection and how the infection may affect cell bioenergy. The aim of this study was to determine whether primary bovine macrophages are target for BHV5 infection and to evaluate parameters such as cell survival, virus replication and nitric oxide (NO) production. In addition, production of reactive oxygen species and mitochondrial damage were also analyzed. BHV5 infected macrophages underwent low rates of apoptosis but activated mitochondrial membrane depolarization and complex I. Additionally, high levels of NO production upon macrophage infection did not interfere with the production of progeny virus. Overall, our findings revealed that macrophages support BHV5 replication in vitro and mitochondrial dysfunction apparently does not interfere with BHV5 replication.

Keywords: BHV5, innate immune cells, mitochondrion, cell bioenergy

Running title: Replication of BHV5 in bovine macrophages alters mitochondrial metabolism

1. Introduction

Bovine alphaherpesvirus 1 (BHV1) and 5 (BHV5) are genetically and antigenically related, belonging to the family *Herpesviridae*, subfamily *Alphaherpesvirinae*, genus *Varicellovirus* (Davison et al., 2009; Davison, 2010). An important biological property of these viruses is the ability to establish latent infections, mainly in sensory nerve ganglia, but also in peripheral blood leukocytes (Del Médico Zajac et al., 2010; Favier et al., 2014; Pérez et al., 2005; Winkler et al., 2000). These immune cells, including phagocytic and other cells expressing pathogen recognition receptors (PRRs), can recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) (Griffin et al., 2010), activating macrophages, peripheral blood mononuclear and dendritic cells (Griffin et al., 2010).

Apoptosis is a major mechanism used by vertebrates to combat viral infections, thereby leading to cell death and pathogen elimination (Elmore, 2007). Apoptosis is triggered in two ways: intrinsic and extrinsic pathways (Zhou et al., 2017). Extrinsic pathway activation depends on a variety of external factors, such as cytokines, toxins, or ligand binding to the death receptor on the cell surface. The intrinsic apoptosis pathway is triggered by cell stress, such as the presence of viral proteins, DNA damage or oxidative stress, leading to the activation of molecules on the mitochondrial membrane (El-Bacha and Da Poian, 2013; Zhou et al., 2017).

Mitochondria are directly implicated in several host-viral responses and represent organelles that participate in major early anti-viral immune responses through changes in their metabolism (Jin et al., 2017; Ohata and Nishiyama, 2011; West et al., 2011). The association among viral infection, mitochondrial dysfunction and apoptosis

has been investigated (Jin et al., 2017). Viral infection may interfere with mitochondria bioenergetics by affecting cellular respiratory function, and in some cases, viral proteins can be inserted in mitochondrial membranes leading to anti-and/or pro-apoptotic effects, directly affecting cell survival and/or death (Galluzzi et al., 2008; Jin et al., 2017; Ohata and Nishiyama, 2011; West et al., 2011).

This study investigated the susceptibility of bovine macrophages to BHV 5 infection, by studying cell viability and cell growth kinetics upon *in vitro* infection. In addition, characterization of cell survival, nitric oxide and production of reactive oxygen species (ROS) associated with mitochondrial dysfunction were analyzed.

2. Materials and methods

2.1. General information, monocyte isolation and macrophage generation

Chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, CA, USA) and Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). All culture dishes and flasks were purchased from BD Falcon (Bedford, MA, USA) unless otherwise specified.

Work involving animals was conducted in accordance with the recommendations in the institutional guidelines and approved animal care and use committee (FMVA – 154829-8) protocols at São Paulo State University. The other experiments were carried out in accordance with the COBEA approval.

Blood samples used for isolation of monocytes were collected from three healthy adult *Bos indicus* cows tested negative for BHV1 and 5. Peripheral blood mononuclear cells were isolated by centrifugation on a Percoll density gradient as described

(Bannantine et al., 2015). Briefly, blood was layered onto 50 mL conical tubes containing Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich), and following density gradient centrifugation (500 x g for 20 minutes) at room temperature, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were collected. Thereafter, PBMCs were washed twice and finally stored with sterile phosphate buffered saline (PBS; Invitrogen).

Monocytes were then isolated using microbeads conjugated with mouse anti-human CD14 antibody (isotype mouse IgG2a; Miltenyi Biotec Ltd., San Diego, USA), which has been shown to cross-react with bovine monocytes (Bannantine et al., 2015). The isolation was performed according to the manufacturers' instructions. The identity and purity of monocytes (>97%) was determined by flow cytometry and immunocytochemistry. The anti-CD14 mouse fluorescein-labeled antibody and anti-CD14 mouse Cy3.3-labeled antibody were used according to manufacturer's antibody (Sigma-Aldrich). Purified monocytes were seeded at 2×10^6 per well in 12-well tissue culture plates containing Dulbecco's Modified Eagle medium with high glucose (Invitrogen) with 10% heat inactivated fetal calf serum (Sigma-Aldrich), gentamicin (5 mg/ml; Sigma Aldrich), 100 ng/mL GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; Sigma-Aldrich) and 1mM β -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich). Subsequently, cells were incubated at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere and tested to ensure the absence of contamination with mycoplasmas using PCR with Vernor[®] GeM kit (Minerva Biolabs, Berlin, Germany) and BVDV using immunostaining assay (Bürge et al., 2018). After three consecutive passages, confluent macrophages were used in all described experiments. BHV5 strain used for macrophage infection, BHV5 SV507/99, was supplied by Prof. Eduardo Furtado Flores, UFSM,

Santa Maria, RS, Brazil. The cell suspension was washed as previously described, and after the final wash, cells were fixed with 4% paraformaldehyde. Data were acquired via an Attune™ acoustic focusing cytometer system (Applied Biosystems®) and at least 50,000 events were counted. The negative pattern was examined by applying the same cell suspension with the first incubation, and the result was included on the global compensation to exclude the auto fluorescence. A BL1-A (488 nm) filter was used in each analysis. The parameters used were as follows: 799 events/seconds, flow rate of 1 µL per min with a stop gate of 500.000 total cells, BL1-A voltage of a 488 laser and SSC threshold of 300.

2.2. Infection and virus quantification of cultured macrophages

Bovine macrophages were grown to 80% confluence in Lab-Tek® chambers slides (BD Falcon™) and inoculated with 100 µl of BHV suspension ($10^{3.2}$ TCID₅₀/ml), corresponding to a multiplicity of infection (m.o.i.) of approximately 0.1. Viral suspensions were allowed to adsorb for 1h at 38.5°C, followed by inoculum removal and addition of culture medium. Infected and uninfected cells were visualized under phase-contrast using an Olympus IX-70 microscope (Olympus, Tokyo, Japan). Approximately 10 fields were analyzed in each condition and photographs were taken at 200 x magnification by cell Sens™ software (Olympus).

Infected cells were harvested at 24, 48 and 72h p.i, by treatment with 0.25% trypsin (Sigma-Aldrich), washed in PBS and incubated for 18 h at 4 °C with BHV-5 monoclonal antibody 2F9 (Cardoso et al., 2015). After incubation with primary antibody at 1:50, cells were washed three times with PBS plus 0.1% Triton X-100.

Next, a 1:50 dilution of the secondary antibody was added to 100 μ l of cell suspension, and was then incubated at 37 °C for 30 min.

Monolayers were fixed at 48h p.i with 4% paraformaldehyde for 15 min in Lab-Tek[®] chamber slides (BD Falcon). The cells were permeabilized for 10 min at room temperature in 0.4% Triton X-100 diluted in phosphate buffered solution (PBS). Fixed macrophages cells were incubated overnight at 4°C with each of the primary antibodies described for virus quantitation. 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, 1 mg/ml of DAPI (4'-6-diamino-2-phenylindole; Sigma-Aldrich) 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 viral antigen detection. Uninfected cells were submitted to the same staining procedure and served as controls.

2.3. Viability assay and viral growth kinetics

Cell proliferation analysis was performed using an *In Vitro* Toxicology Assay[®] Kit, an MTT ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) - based assay in both infected and non-infected neuron-like cells at 24, 48 and 72h post-infection (p.i.) (TOXI-1 Kit; Sigma-Aldrich). For each time point, the culture supernatant was removed and 2ml of MTT (tetrazolium salts) was 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 triplicate samples. One-step growth curve of virus replication in neuron-like cells was assayed in a multiplication kinetics experiment, followed by infection at 80% of monolayer confluence at m.o.i of 0.1. Adsorption was allowed for 90 min at 38.5 °C, the inoculum was removed and fresh medium was added. The macrophages were incubated for different time intervals (24, 48 and 72h p.i). After incubation, both supernatant and lysed cells were harvested and assayed for virus infectivity by infecting Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cells as described previously (Cardoso et al., 2015). All experiments were performed in four different time points. Infectious titres were calculated according to the Spearman-Kärber method and expressed as Log₁₀ TCID₅₀/ml as described previously (Cardoso et al., 2015).

2.5. Viral nucleic acid detection by quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR)

Upon harvesting at 24, 48 and 72h p.i., total DNA from inoculated cell cultures was extracted using DNAzol™ according to manufacturer's instructions (Invitrogen). An average of 100 ng of genomic DNA was used for qPCR as described previously (Silva-Frade et al., 2014). The primers and respective probes used were BHV5 forward 5'-GGTACTTCTTCTTGGTGATG-3'; BHV5 reverse 5'-CGGTCTTCGTCAAGTTC-3'; BHV5 probe FAM-AGGTCTTCTCGCACTC-MGB as described previously (Diallo et al., 2011; Silva-Frade et al., 2014). The reaction was carried out and analyzed by the software on a StepOnePlus™ real time instrument (Applied Biosystems). The data were obtained from three replicates of each sample.

The expression of the housekeeping Histone 2a gene (*H2A*) was also quantified in a similar way for normalization (Cardoso et al., 2016). The viral DNA level at corresponding time point in infected and uninfected cells was quantified in comparison to the housekeeping gene. The comparative delta-delta *Ct* method was used to analyze the results.

2.4. Determination of nitric oxide production and apoptosis

After 24, 48 and 72h of BHV5 infection, nitrite (i.e., the stable by-product of nitric oxide generated by phagocytes) was measured in macrophages culture supernatants. Fifty microliters of supernatant was mixed with 200 μ L of Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride, and 2.5% H_3PO_4) and incubated at 25°C for 10 min. Absorbance was determined at 540 nm, and absorbance readings were converted to μ M concentrations by comparing results for samples with results for a standard curve generated by use of concentrations ranging from 1.5 to 200 μ M of $NaNO_2$.

To evaluate apoptosis the same macrophage culture conditions were used. Flow cytometric analysis of apoptosis/necroptosis and ROS production were acquired using an Attune acoustic focusing cytometer system at 24, 48, and 72 h after BHV5 infection (Applied Biosystems). Apoptosis/necroptosis was measured using a double staining method APO-BrdU TUNEL Assay Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) according to manufacturer's instructions. The differentiation of early apoptotic, secondary necrotic, necroptotic, and viable cells was made according to their phenotype: BrdU +/PI- cells were considered early apoptotic, BrdU-/PI+ were

considered necroptotic, BrdU⁺/PI⁺ were considered secondary necrotic, and BrdU⁻/PI⁻ were considered viable cells. The results are expressed as Δ % of each cell phenotype.

2.5. Mitochondrial membrane potential, complex I and ROS evaluation

Cell mitochondria were isolated by procedure based on a previously described method (Da Silva et al., 2018). To perform the mitochondrial membrane potential assay, 2×10^6 infected and mock infected cells were incubated with 10 $\mu\text{g/ml}$ of JC-1 (5,5',6,6''-tetrachloro - 1,1',3,3'- tetrathylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide; Molecular Probes,) for 10 min at 37 °C and analyzed by acoustic flow cytometry performed in the dark as described by a previous study (Ferrarezi et al., 2013). The staurosporine (Sigma-Aldrich) was used as positive control to mitochondrial membrane depolarization as described previously (Cardoso et al., 2015). Mitochondrial complex I (NADH dehydrogenase) activity production by macrophages infected by BHV5 at 24, 48 and 72h was measured as previously described (Da Silva et al 2018). Briefly, complex I activity was determined in BHV5 infected-macrophage lysates in 24-well plates. In the presence of NADH, electrons are transferred from complex III to *cytochrome c* resulting in an increase in absorbance at 550 nm. This reaction was blocked by rotenone, a specific inhibitor of complex I activity. The activity of complex I was determined by comparison of the curve's slope before and after the addition of rotenone.

2.6. ROS evaluation, ATP levels and oxygen consumption

ROS levels were determined using the Amplex Red Hydrogen peroxide/Peroxidase kit (Invitrogen®). In the presence of horseradish peroxidase, Amplex red reagent reacts with hydrogen peroxide released by the BHV5 infected cells. The product of this reaction, resofurin, was detected by measuring absorbance at 560 nm after 2h of incubation of the 96-well plate at 37 °C. Levels of ATP were determined using the firefly luciferin– luciferase assay system according to ATP determination Kit (Molecular Probes™) following the manufacturer’s recommendation. Bioluminescence was measured using Lucetta™ Luminometer (Lonza Inc, Alpharetta, GA, USA). Oxygen consumption was measured using 5 mM succinate (+ 5 nM rotenone) or 5 mM pyruvate + 5 mM malate as respiratory substrates in the absence (state-4 respiration) or presence (state-3 respiration) of 400 nmol ADP. CCCP (m-chlorophenyldrazone) was used at 1 µM of as an uncoupler.

2.7. Statistical analysis

All experiments were performed at least in quadruplicate. Descriptive statistics include the mean ± standard deviation (s.d.). A *p*-value < 0.005 was considered significant. All statistical analyses were performed using Prism software (GraphPad®, CA, USA).

3. Results

3.1. Cell survival and virus replication

The purity of macrophage cell culture was monitored by inverted phase-contrast microscopy examination, which revealed rounded cells as a unique cell type after microbeads isolation (Fig 1A). Immunocytochemistry labelling CD14-Cy3.3 on fixed cells showed the macrophage phenotype in virtually 100% of the cells under first passage (Fig 1B). In addition, flow cytometer analysis demonstrated that 41.57 % of the cells were considered of low complexity and small size at the first passage *in vitro* (Fig 1C). After three consecutive passages, all cells were considered of macrophage phenotype and virus inoculation was then performed. Positive fluorescence in the cytoplasm of infected cells, in comparison to uninfected cells, was observed at 72h after BHV5 infection (Fig 1D and E). The percentage of infected cells measured by flow cytometer demonstrated an increase of positive fluorescent signals according to subsequent periods after infection (Fig 1F). However, the viability of infected cells decreased at the same p.i. points (Fig 1G), in contrast with BHV5 titres which increased reflecting the production of progeny virus (Fig 1H). These results indicated productive replication of BHV-5 in bovine macrophages *in vitro*, leading to loss of cell viability. Decrease of cell viability, however, seemed not to interfere with the virus replicative cycle.

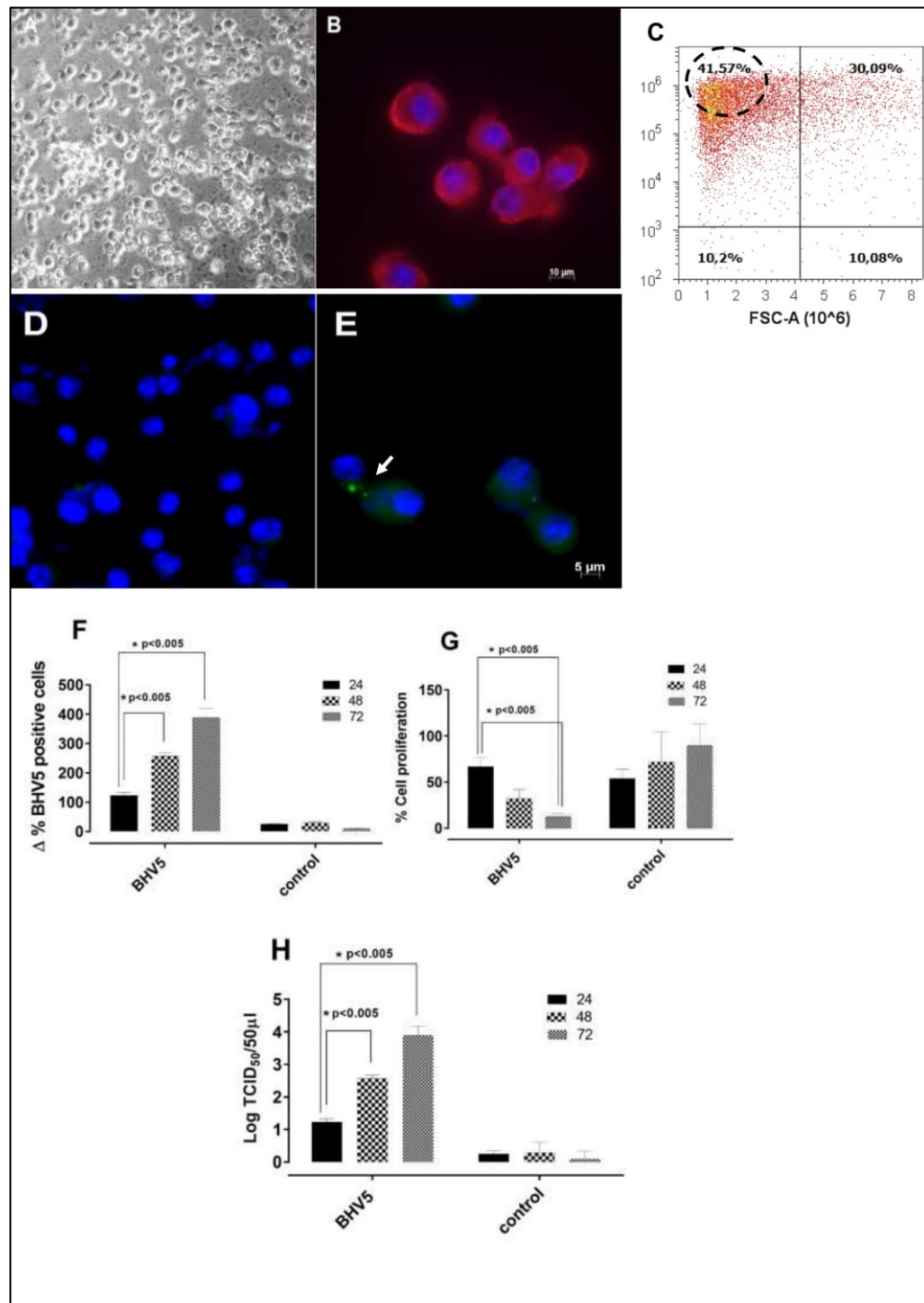


Figure 1. Parameters of productive replication of BHV-5 in bovine macrophages *in vitro*. Rounded cells observed by purity of macrophage cell culture in inverted phase-contrast microscopy (A); Phenotype of macrophage virtually 100% in labeling performed by immunocytochemistry CD14-

Cy3.3 (B); 41.57% of the cells were low complexity and small size in the first passage in vitro (Fig. 1C); Cytoplasm of infected and uninfected cells showing positive fluorescence at 72 hr by BHV5 (D and E); Increase (F, H) and decrease (G) in percentage of infected cells and positively labeled by fluorescence.

3.2. Macrophage apoptosis, NO production and mitochondrial dysfunction

The APO-BrdU TUNEL Assay was applied in attempts to characterize the effects of BHV5 infection in macrophage survival and death. The results in Table 1 show that the number of early apoptotic cells did not differ statistically at different post-infection periods.

Table 1. Proportion of BrdU/PI labeled macrophage cells after 24, 48 and 72 h of BHV5 strain infection.

	Dead (% ± sd) (BrdU-/PI+)	Secondary necrotic (% ± sd) (BrdU+/PI+)	Early apoptotic (% ± sd) (BrdU++/PI-)	Viable (% ± sd) (BrdU-/PI-)
24 h	1.7 ± 3.8	3 ± 1.0	6.6 ± 6.0	88.7 ± 1.3
48 h	1.2 ± 1.5	1.3 ± 2.9	5.8 ± 4.7	91.7 ± 3.6
72 h	6.8 ± 4.9	9 ± 0.9	7.4 ± 3.9	76.8 ± 7.9
control	5.6 ± 1.2	0.5 ± 0.1	5.0 ± 0.6	88.9 ± 7.8
staurosporine	70 ± 9.7	16 ± 2.3	10.7 ± 2.7	3.3 ± 1.7

On the other hand, at 72h p.i, the percentage of dead and secondary necrotic cell increased in comparison with uninfected cells used as controls, but lower than macrophages exposed to staurosporine used as positive control (Table 1). Therefore, the

set of experiments described next were performed to evaluate alterations on mitochondrial function.

The mitochondrial membrane depolarization measured by detection of JC-1 complex revealed an increase, according to the progression of infection, similarly to the results observed by the use of staurosporine (Fig 2A). Complex I activity was intense at all three post-infection points (Fig 2B). The same phenomenon was observed when ROS and ATP content were quantified (Fig 2C and D), contrasting with oxygen consumption, which decreased from 24 to 72h p.i. (Fig 2E). Macrophage activity was measured by NO production, which showed an increase according to the time post-infection (Fig 2F). These experiments confirm that BHV5 replication induces macrophage early, secondary and necrotic apoptosis damage at 72h p.i. followed by NO production, affecting probably mitochondrial membrane depolarization, activation of complex 1 from respiratory chain and consumption of ATP followed by ROS release.

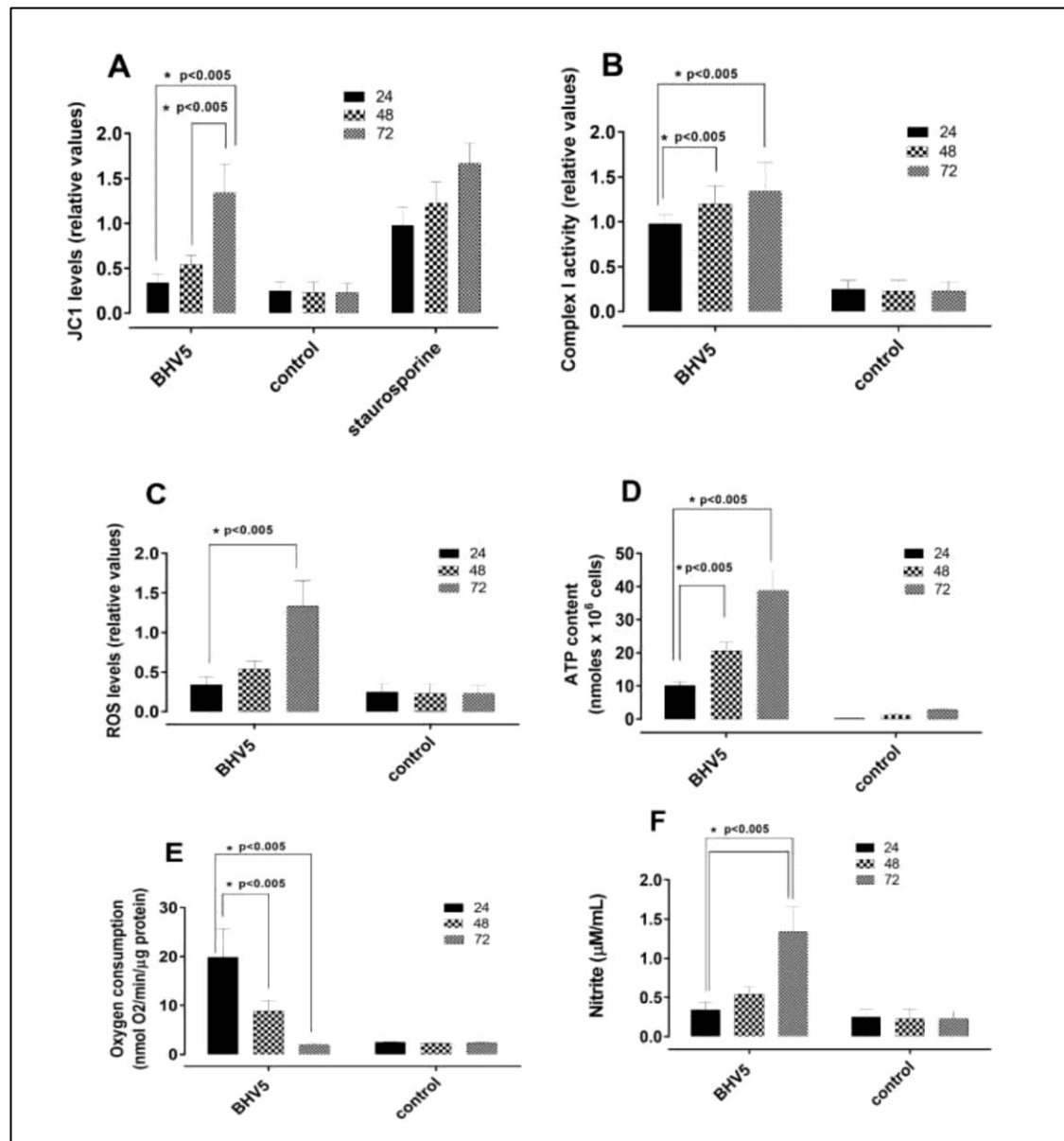


Figure 2. Mitochondrial membrane activity

Mitochondrial membrane depolarization (A). Complex I activity (B, C, D and E). Increase of NO production by macrophage activity (F).

4. Discussion

Tonsils are lympho-epithelial immunocompetent tissues strategically located in areas surrounding the main local of penetration of BHV1 and 5 in natural infections

(Pérez et al., 2005; Favier et al., 2014). However, there is no information available regarding to the target immune cells susceptible to virus infection. Macrophages are among the most important antigen presenting cells and participate in the early, primary response against virus infection. Bomac cells, a bovine transformed macrophage lineage have been used as an *in vitro* model to study host-pathogen interactions (Bürigi et al., 2018). However, primary bovine macrophages present an obvious advantage for such studies since they probably better mimetize *in vitro* situation, are more convenient to work with, display less variability and are not genetically manipulated (Bürigi et al., 2018). Thus, primary bovine macrophages were chosen to evaluate BHV5 replication and interference on cell metabolism.

Apoptosis is a major way of programmed cell death following virus infection and may be elicited by virus infection with negative and positive influence on replication (Zhou et al., 2017). Previously, it has been demonstrated that BHV5 can induce different levels of apoptosis depending on the cell type (Brenner et al., 2012; Garcia et al., 2013; Silva-Frade et al., 2014; Cardoso et al., 2015; Cardoso et al., 2016). The present study demonstrates that BHV5 is able to productively infect *in vitro* cultured bovine macrophages. In addition, the percentage of dead, secondary necrotic and early apoptotic macrophages were less than $\approx 10\%$ in comparison with 76.8% of viable cells. These findings suggest that BHV5 infection leads to a block or delay in apoptosis in bovine macrophages, probably as a means to produce sufficient progeny and establish successful viral replication. Similar results were found when *in vitro* produced bovine embryos were exposed to BHV5 (Brenner et al., 2012; Silva-Frade et

al., 2014). However, when neuron-like cells were infected by BHV5, apoptosis was evident during infection (Cardoso et al., 2015).

Regarding to mitochondrial function, our results showed that membrane depolarization was synchronous with BHV5 replication and NO and ROS production. In addition, ROS is mainly originated from NADPH oxidases and mitochondria (Jin et al., 2017). Overproduced cellular ROS or oxidative stress are factors that influence disease outcome. BHV1 infection in MDBK (Madin-Darby bovine kidney) cells increased ROS production, which seems to be crucial for virus replication (Zhu et al., 2016). Previously, high ROS production was also observed in neuronal and glial-derived tumor cells infected by BHV5 (Cardoso et al, 2016).

It is conceivable that mitochondria is potential targets for some viruses that are able to induce damage to complex I (NADH dehydrogenase). To our knowledge, our data are the first to demonstrate that BHV5 infection of immune cells activates mitochondrial membrane depolarization, complex I activity, ROS levels and ATP content. One of the main functions of mitochondria is to synthesize ATP from dietary sugar or amino acids by ATP synthase in the electron transport chains (ETC). The ATP produced relies upon an intact and efficient ETC, the activity of four key proteins that make up the redox carrier, named complex I-IV, and the surface area of cristae (El-Bacha and Poian, 2013). Membrane potential ($\Delta\Psi_m$) is also critical for the generation of ATP and loss of $\Delta\Psi_m$ leads to ATP depletion within the cell thereby contributing to cell death.

The results obtained herein using mitochondria energized with pyruvate (electron donors to complex I) showed that BHV5 replication inhibits state-3

respiration, which involves mitochondria, ADP, and a respiratory substrate; and the speed of ADP phosphorylation is the limiting factor of the process. The activation observed in the complex I indicates that BHV5 replication has a direct action on the electron transport chain in infected macrophage cells; however, it cannot be ruled out that virus replication events interacts with the oxidative phosphorylation system (F_0F_1 ATPase and/or ADP/ATP translocator). Complex I (NADH ubiquinone oxidoreductase) accepts electrons from reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), while complex II (succinate dehydrogenase) accepts electrons from reduced Flavin adenine dinucleotide ($FADH_2$). Complex III (ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase) is responsible for electron transfer between ubiquinone to *cytochrome c*. Finally, complex IV (cytochrome oxidase) promotes oxidation of *cytochrome c* and reduction of molecular oxygen to water. The energy derived from the electrons transfer is related to complex I, II and IV that produce cell energy. Based on this, it may be speculated that BHV5 infection may impair the electron transfer by high activating complex I producing reactive oxygen species in excess but not activating apoptosis and/or necrosis at high levels. Further studies should be performed to investigate the interaction by macrophage mitochondria regulation and innate and inflammatory network during BHV 5 infection.

5. Conclusion

BHV5 replication in cultured bovine macrophages apparently does not alter the tested parameters in comparison to untreated cell with staurosporine. The percentage of viable cells was close to the controls in spite of high levels of mitochondrial damage,

especially activation of complex I. Indeed, the results obtained in this *in vitro* study support the implication of BHV5 infection on mitochondrial metabolism and the ability of the virus to keep on replication during the process.

Funding informations

Fundação Amparo à Pesquisa Estado de São Paulo (Grant 2012/16715-6). Ethical approval: All applicable national for care and use animals were followed. TC Cardoso and EF Flores are recipient of CNPq (Brazilian Council for Research) fellowships and funding.

Conflict of interest statement

All authors declare no conflicts of interests.

Acknowledgments

The authors wish to thank laboratory technicians. The authors also want to thank Silvia H V Perri for her help on statistical analyses.

References

Bannantine, J., Stabel, J.R., Laws, E., Cardieri, M.C.D., Souza, C.D., 2015. Mycobacterium avium sbspecies paratuberculosis recombinant proteins modulate antimycobacterial functions of bovine macropahges. Plos ONE 10 6: e0128966.

- Cardoso T.C, Ferreira H.L, Okamura L.H, Oliveira, B.R, Rosa, A.C., Gameiro, R., Flores, E.F., 2015. Comparative analysis of the replication of bovine herpesvirus 1 (BHV1) and BHV5 in bovine-derived neuron-like cells. *Arch. Virol.*160, 2683-91
- Cardoso, T.C., Ferrari, H.F., Garcia, A.F., Bregano, L.C., Andrade, A.L., Nogueira, A.H., 2010. Immunohistochemical approach to the pathogenesis of clinical cases of bovine herpesvirus type 5 infections. *Diag. Pathol.* 5, 57.
- Cardoso, T.C., Ferreira, H.L., Okamura, L.H., Giroto, T.P., Oliveira, B.R., Fabri, C.U., Gameiro, R., Flores, E.F., 2016. Cellular response markers and cytokine gene expression in the central nervous system of cattle naturally infected with bovine herpesvirus 5. *Vet J.* 218:71-77
- Cardoso, T.C., Silva-Frade, C., Taparo, C.V., Okamura, L.H., Flores, E.F., 2013. Validation of a reference control for an SYBR-Green fluorescence assay-based real-time PCR for detection of bovine herpesvirus 5 in experimentally exposed bovine embryos. *Mol. Cell. Probes* 27, 237-242.
- Chowdhury, S.I, Lee, B.J, Moiser, D., Sur, J.H., Osorio, F.A., Kennedy, G., Weiss, M.L., 1997. Neuropathology of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) meningoencephalitis in a rabbit seizure model. *J. Comp. Pathol.* 117, 295-310.
- Da Silva, S.E.L, Ferreira, H.L., Garcia, A.F., Silva, F.E.S., Gameiro, R., Fabri, C.U.F., Vieira, D.S., Cardoso, T.C., 2018. Mitochondrial bioenergy alterations in avian HD11 macrophages infected with infectious bronchitis virus. *Arch. Virol.* 163, 1043-104.
- Davison, A.J., 2010. Herpesvirus systematics. *Vet. Microbiol.* 143, 52-69.
- Davison, A.J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G.S., McGeoch, D.J., Minson, A.C., Pellett, P.E., Roizman, B., Studdert, M.J., Thiry, E., 2009. The order Herpesvirales. *Arch. Virol.* 154, 171-177.
- Del Medico Zajac, M.P., Ladelfa, M.F., Kotsias, F., Muylkens, B., Thiry, J., Thiry, E., Romera, S.A., 2010. Biology of bovine herpesvirus 5. *Vet. J.* 184, 138-145.
- Dezengrini, R., Weiss, M., Torres, F.D., Oliveira, M.S., Furian, F., Mello, C.F., Weiblen, R., Flores, E.F., 2009. Bovine herpesvirus 5 induces an overproduction

- of nitric oxide in the brain of rabbits that correlates with virus dissemination and precedes the development of neurological signs. *J. Neurovirol.* 15, 153-163.
- Diallo, I.S., Corney, B.G., Rodwell, B.J., 2011. Detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 using a multiplex real-time polymerase chain reaction. *J. Virol. Meth.* 175, 46-52.
- El-Bacha, T., Da Poian A.T., 2013. Virus-induced changes in mitochondrial bioenergetics as potential targets for therapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 41-6.
- Favier, P.A., Marin, M.S., Moran, P.E., Odeon, A.C., Verna, A.E., Perez, S.E., 2014. Latency of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) in tonsils and peripheral blood leukocytes. *Vet. J.* 202, 134-140.
- Ferrarezi M.C., Curci, V.C, Cardoso, T.C., 2013. Cellular vacuolation and mitochondrial-associated factors induced by *Clostridium perfringens* epsilon toxin detected using acoustic flow cytometry. *Anaerobe* 24:55-9
- Galluzzi, L., Brenner, C., Morselli, E., Zahia, T., Kroemer, G., 2008. Viral control of mitochondrial apoptosis. *PLoS Pathog.* 4(5): e1000018.
- Griffin, B.D., Verweij, M.C., Wiertz, E.J.H.J., 2010. Herpesviruses and immunity: The art of evasion. *Vet. Microbiol.* 143, 89-100.
- Jin, H.S., Suh, H.W., Kim, S.J., Jo, E.K., 2017. Mitochondrial control of innate immunity and inflammation. *Immune Netw.* 17, 2-77.
- Kammouni, W., Wood, H., Jackson, A.C., 2017. Lyssavirus phosphoproteins increase mitochondrial complex 1 activity and levels of reactive oxygen species. *J. Neurovirol.* 23, 756-762.
- Livak, K., Schmittgen, T., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods* 25, 402-408.
- Pérez, S., Inman, M., Doster, A., Jones, C., 2005. Latency-related gene encoded by bovine herpesvirus 1 promotes virus growth and reactivation from latency in tonsils of infected calves. *J. Clin. Microbiol.* 43, 393-401.

- Silva-Frade, C., Gameiro, R., Okamura, L.H., Flores, E.F., Cardoso, T.C., 2014. Programmed cell death-associated gene transcripts in bovine embryos exposed to bovine Herpesvirus type 5. *Mol. Cell. Probes* 28:113-7
- Winkler, M. T., Doster, A., Jones, C., 2000. Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in the tonsils of latently infected calves. *J. Virol.* 74, 5337-5346.
- Zhou, X., Jiang, W., Liu, Z., Liu S., Liang, X., 2017. Virus Infection and death receptor-mediated apoptosis. *Viruses* 9, 316.
- Zhu, l., Yuan, C., Ma, Y., Ding, X., Zhu, G., 2016. BHV-1 induced oxidative stress contributes to mitochondrial dysfunction in MDBK cells. *Vet. Res.* 47,47.