

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**HERPESVÍRUS BOVINO TIPOS 1, 2 E 5
SENSIBILIDADE A ANTIVIRAIS *IN VITRO*,
PATOGENIA E TERAPÊUTICA EXPERIMENTAL EM
COELHOS**

TESE DE DOUTORADO

Renata Dezengrini

**Santa Maria, RS, Brasil
2009**

**HERPESVÍRUS BOVINO TIPOS 1, 2 E 5: SENSIBILIDADE A
ANTIVIRAIS *IN VITRO*, PATOGENIA E TERAPÊUTICA
EXPERIMENTAL EM COELHOS**

por

Renata Dezengrini

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação
em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Fisiopatologia da
Reprodução da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),
como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Medicina Veterinária

Orientador: Prof. Eduardo Furtado Flores

Santa Maria, RS, Brasil.
2009

D532h Dezengrini, Renata, 1981-

Herpesvírus bovino tipos 1, 2 e 5 : sensibilidade a antivirais *in vitro* patogenia e terapêutica experimental em coelhos / Renata Dezengrini ; orientador Eduardo Furtado Flores. - Santa Maria, 2009.
129 f. ; il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, 2009.

1. Medicina veterinária 2. Herpesvírus 3. BoHV-1 4. BoHV-5 5. BoHV-2 6. Óxido nítrico 7. iNOS 8. nNOS 8. Coelhos 9. Patogenia 10. Antiviral 11. Foscarnet 12. Ganciclovir 13. Aciclovir I. Flores, Eduardo Furtado II. Título

CDU: 619:636.2

Ficha catalográfica elaborada por
Luiz Marchiotti Fernandes – CRB 10/1160
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais/UFSM

© 2009

Todos os direitos autorais reservados a Renata Dezengrini. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito do autor.

Endereço: Av. Roraima, prédio 20, sala 4200, Camobi, Santa Maria, RS, 97150-900

End. Eletr: renatadezengrini@yahoo.com.br

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**HERPESVÍRUS BOVINO TIPOS 1, 2 E 5: SENSIBILIDADE A
ANTIVIRAIS *IN VITRO*, PATOGENIA E TERAPÊUTICA
EXPERIMENTAL EM COELHOS**

Elaborada por
Renata Dezengrini

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA

Eduardo Furtado Flores, PhD
(Presidente/Orientador)

Rudi Weiblen, PhD (UFSM)

Sônia de Ávila Botton, Dr (UFSM)

Luizinho Caron, Dr. (EMBRAPA)

Valéria Maria Lara Carregaro, Dr. (autônoma)

Santa Maria, 16 de dezembro de 2009.

AGRADECIMENTOS

Aos professores Rudi Weiblen, Eduardo Furtado Flores e Luciane Terezinha Lovato pelos ensinamentos, disponibilidade irrestrita e criatividade fundamentais a este trabalho, e importantes também para minha formação e conhecimento.

Agradeço principalmente ao meu orientador, Eduardo Furtado Flores, pelas oportunidades profissionais durante o mestrado e doutorado, como participar da redação de seu livro de Virologia e pelos ensinamentos ao longo desses anos de trabalho conjunto.

Aos professores Carlos Fernando de Mello, Ana Flávia Furian e Mauro S. Oliveira pelas suas reflexões e criatividade sobre o estudo, disponibilidade em explicar, auxílio no delineamento e na realização dos experimentos.

À minha família: Irineu, Juraci e Rodrigo Dezengrini, e Juliano Rasquin Shessarenko, pelo apoio incondicional aos meus estudos, pela compreensão nos momentos de ausência no convívio familiar, pela educação, e por proporcionarem a continuidade dos meus estudos.

A elaboração de uma tese de doutorado é, sem dúvidas, um trabalho coletivo que envolve a participação de várias pessoas. Expresso minha gratidão aos meus colegas e ex-colegas de mestrado, doutorado e bolsistas de iniciação científica do Setor de Virologia, pelo companheirismo, disponibilidade e ajuda nos experimentos, discussões e correções, que contribuíram para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, por proporcionar minha formação acadêmica e científica. Ao Biotério Central da UFSM por sempre viabilizar a realização dos estudos com animais.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES - e ao Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq - que concederam as bolsas de doutorado e doutorado sanduíche, além do apoio financeiro para realização deste estudo.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

HERPESVÍRUS BOVINO TIPOS 1, 2 E 5: SENSIBILIDADE A ANTIVIRAIS *IN VITRO*, PATOGENIA E TERAPÊUTICA EXPERIMENTAL EM COELHOS

AUTOR: RENATA DEZENGRINI
ORIENTADOR: EDUARDO FURTADO FLORES
Santa Maria, 16 de dezembro de 2009.

Aspectos da patogenia da infecção neurológica pelo herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) e terapias experimentais contra o BoHV-1 e BoHV-5 foram estudados *in vitro* e em coelhos inoculados. O *capítulo 1* relata a investigação do papel do óxido nítrico (NO), um componente da imunidade inata contra patógenos, na doença neurológica produzida pelo BoHV-5 em coelhos. Espectrofotometria para os produtos de degradação do NO revelou um aumento significativo nos seus níveis em várias regiões do encéfalo de coelhos infectados ($F(4, 40)=3.33$; $P<0,02$). A quantificação do NO no encéfalo nos dias seguintes à inoculação viral revelou um aumento gradativo ($F(12, 128)=2.82$; $P<0,003$), correlacionado temporal e espacialmente com a invasão e disseminação viral, e precedendo o desenvolvimento de sinais neurológicos. Sugere-se, assim, que a produção aumentada de NO em resposta à infecção possa participar da patogenia dessa doença neurológica. No *capítulo 2*, investigou-se a atividade de três fármacos antivirais frente ao BoHV-1, BoHV-2 e BoHV-5 *in vitro* pelo teste de redução do número de placas. O Aciclovir foi moderadamente ativo frente aos três vírus; o Ganciclovir apresentou atividade moderada frente ao BoHV-2 e, em menor grau, contra o BoHV-5, sendo ineficaz frente ao BoHV-1. O Foscarnet (PFA) apresentou a atividade antiviral mais pronunciada, sendo o único fármaco que, na concentração de 100 µg/mL, inibiu completamente a produção de placas pelos três herpesvírus bovinos. No *capítulo 3*, investigou-se a atividade do PFA em coelhos inoculados com o BoHV-1 ou BoHV-5. Coelhos inoculados com o BoHV-5 e tratados com 100 mg/kg do PFA apresentaram índices de mortalidade (11/22; 50%) estatisticamente inferiores aos controles não-tratados (21/22; 93,7%) ($P<0,0008$). Uma redução significativa no título médio de vírus foi observada no dia 3 pi, pico da excreção viral [$F(9,108) = 2,23$; $P<0,03$]. Em coelhos inoculados no saco conjuntival com o BoHV-1 e tratados com o PFA, foram observadas reduções na excreção viral, na frequência, severidade comparando-se com o grupo controle. O período de incubação prolongado e a redução na duração do curso clínico no grupo tratado foi significativa ($P<0,005$ e $P<0,04$, respectivamente). A atividade antiviral do PFA *in vivo* contra o BoHV-1 e BoHV-5 abre a perspectiva para outras terapias experimentais. No *capítulo 4*, investigou-se o efeito da inibição da isoforma induzível da enzima óxido nítrico sintase (iNOS), associada ou não ao tratamento com o PFA, na infecção neurológica pelo BoHV-5 em coelhos. Grupos de coelhos inoculados com o BoHV-5 foram tratados com o inibidor da iNOS aminoguanidina (AG); com PFA; com ambos os fármacos; ou não receberam tratamento. Os índices de morbidade e mortalidade foram de 100% (6/6) nos grupos AG e controle; 66,7% (4/6) no grupo PFA e 83,3% (5/6) no grupo AG+PFA. O período de incubação foi significativamente menor ($P<0,05$) e os sinais neurológicos foram mais precoces e severos nos animais do grupo AG. Portanto, o tratamento com PFA reduziu a morbidade e mortalidade associadas com a infecção pelo BoHV-5; o tratamento com AG resultou no agravamento e na antecipação do quadro neurológico e no grupo tratado com ambos os fármacos observou-se um desenvolvimento mais tardio dos sinais neurológicos. Esses resultados contribuem para o conhecimento da patogenia da doença neurológica pelo BoHV-5 e abrem perspectivas para estudos adicionais de patogenia e terapêutica anti-herpesvírus.

Palavras-chave: óxido nítrico; iNOS; nNOS; BoHV-5; BoHV-1; coelhos; patogenia; antiviral; Foscarnet; Ganciclovir; Aciclovir.

ABSTRACT

Doctoral Thesis

Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária

Universidade Federal de Santa Maria

BOVINE HERPESVIRUSES 1, 2 AND 5: SENSITIVITY TO ANTIVIRALS *IN VITRO*, PATHOGENESIS AND EXPERIMENTAL THERAPY IN RABBITS

AUTHOR: RENATA DEZENGRINI

ADVISER: EDUARDO FURTADO FLORES

Santa Maria, December, 16th, 2009.

Aspects of bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) pathogenesis and experimental therapies against BoHV-1 and BoHV-5 were investigated *in vitro* and in inoculated rabbits. In *chapter 1*, we investigated the role of nitric oxide (NO), a component of innate immunity against pathogens, in the neurological disease by BoHV-5 in rabbits. Spectrophotometry for NO products revealed that NO levels were significantly increased in several regions of the brain of rabbits with neurological disease [$F(4, 40)=3.33$; $P<0.02$]. Quantification of NO levels in the brain at different time points after virus inoculation revealed a gradual increase [$F(12, 128)=2.82$; $P<0.003$], correlated spatially and temporally with virus dissemination within the brain and preceding the development of neurological signs. Thus, we propose that the overproduction of NO in the brain of BoHV-5-infected rabbits may participate in the pathogenesis of neurological disease. In *chapter 2*, the activity of three anti-herpetic drugs was tested against BoHV-1, BoHV-2 and BoHV-5 *in vitro* by plaque reduction assay. Acyclovir was moderately active against the three viruses; Gancyclovir was moderately effective against BoHV-2, and to a lesser extent against BoHV-5, being poorly active against BoHV-1. Foscarnet (PFA) exhibited the most pronounced antiviral activity, being the only drug that, at the concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$, completely inhibited plaque formation by all three viruses. In *chapter 3*, we report the activity of PFA in rabbits inoculated with BoHV-1 or BoHV-5. Rabbits inoculated with BoHV-5 and treated with 100 mg/kg of PFA presented mortality rates (11/22 or 50%) statistically lower than non-treated controls (21/22 ou 95.4%) ($P<0.0008$). A significant reduction in the mean virus titers was observed at day 3 pi, the peak of virus shedding [$F(9,108) = 2.23$; $P<0.03$]. Reduction in virus shedding, frequency, severity and duration of ocular signs were also observed in rabbits inoculated with BoHV-1 into the conjunctival sac, comparing to the controls. The prolonged incubation period and the reduction in the duration of the clinical course of the PFA-treated group was significant ($P<0.005$ and $P<0.04$, respectively). Therefore, the activity of PFA *in vivo* against BoHV-1 and BoHV-5 may be exploited in further experimental therapies. In *chapter 4*, we investigated the effect of the inhibition of the inducible isoform of nitric oxide synthase (iNOS), associated or not with PFA treatment, on neurological infection by BoHV-5 in rabbits. Groups of BoHV-5-inoculated rabbits were treated with the iNOS inhibitor aminoguanidine (AG); with PFA; with both drugs; or maintained as virus controls. Morbidity and mortality rates were 100% (6/6) in the groups AG and CV, 66.7% (4/6) in the group PFA and 83.3% (5/6) in the group AG+PFA. The incubation period was significantly lower ($P<0.05$) and the onset of neurological disease occurred earlier and was more severe in the group AG. These results demonstrate that treatment with PFA reduced morbidity and mortality rates associated to BoHV-5 infection, that AG treatment anticipated the development of neurological signs, and that the development of neurological disease was delayed in the group treated with both drugs. Taken together, these results contribute to the knowledge of the pathogenesis of BoHV-5 neurological disease and pave the way for other experimental pathogenesis and therapy studies.

Keywords: nitric oxide; iNOS; nNOS; BHV-5; rabbits; pathogenesis; antiviral activity; Foscarnet; Gancyclovir; Acyclovir.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

3 CAPÍTULO 2

FIGURA 1 (Figure 1) - Nitric oxide (NOx) levels in brain regions of rabbits with neurological disease associated with bovine herpesvirus 5 infection. * statistically significant $F(4, 40) = 3.33$; $P < 0.02$. OB/OC: olfactory bulb and cortex; AC: anterior cortex; DLC/VLC: parietal and ventrolateral cortices; HI/PC: hippocampus and posterior cortex; Th: thalamus. The bars represent the mean of NOx levels in the respective brain regions of the groups, composed by five animals each..... 53

FIGURA 2 (Figure 2) - Immunohistochemistry for bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) antigens and iNOS in sequential sections of the brain of rabbits with neurological disease associated with BoHV-5 infection. A) Anterior cortex of rabbit # 1: BoHV-5 antigens in cells with neuronal morphology (Δ); B) Olfactory bulb of rabbit # 5: iNOS reactivity in cells with astrocyte morphology (\blacktriangledown) and neuronal morphology (\blacktriangle); C) Anterior cortex of a control rabbit stained for BoHV-5 antigens and D) For iNOS..... 54

FIGURA 3 (Figure 3) - Nitric oxide (NOx) levels in brain regions of rabbits at different time points after intranasal inoculation of bovine herpesvirus 5. D.p.i.: day post-infection. OB/OC: olfactory bulb and cortex; AC: anterior cortex; DLC/VLC: parietal and ventrolateral cortices; HI/PC: hippocampus and posterior cortex; Th: thalamus. * Statistically significant $F(12, 128) = 2.82$; $P < 0.003$. The bars represent the means of NOx measurements in the respective brain region of each group. The groups were composed by four infected and four mock-infected rabbits..... 55

FIGURA 4 (Figure 4) - Sections of the brain of rabbits used for nitric oxide quantitation, bovine herpesvirus 5 isolation and immunohistochemistry for viral antigens and iNOS. 1) Olfactory bulb and cortex; 2) Anterior cortex; 3) Thalamus; 4) Hippocampus and posterior cortex and 5) Parietal and ventrolateral cortices. The top image represents a mediolateral view of a cross section, and the bottom shows a lateromedial view..... 56

4 CAPÍTULO 3

FIGURA 1 - Porcentagem de inibição da replicação viral in vitro pelo Aciclovir, Ganciclovir e Foscarnet frente aos herpesvírus bovino tipos 1 (BoHV-1), 2 (BoHV-2), 5 (BoHV-5) e herpes simplex tipo 1 (HSV-1). Os dados representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata..... 75

5 CAPÍTULO 4

FIGURA 1 - Excreção de vírus em secreções oculares dos coelhos inoculados no saco conjuntival (Experimento III) com o herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5), tratados com o Foscarnet (◇) ou mantidos como controles de vírus (■). Os pontos (◇,■) representam as médias dos títulos de vírus excretados, expressos em DICC50/mL, com os respectivos erros-padrão. Os títulos virais médios entre os dias 5 e 10 pi estão apresentados no gráfico menor. * Diferença significativa [$F(9,108) = 2,23$; $P < 0,03$]..... 96

FIGURA 2 - Excreção de vírus em secreções oculares de coelhos inoculados no saco conjuntival com o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), tratados com o Foscarnet (◇) ou mantidos como controles de vírus (■). Os pontos (◇,■) representam os títulos médios de vírus excretados, expressos em DICC50/mL, com o respectivo erro padrão. Os títulos virais médios entre os dias 5 a 10 pi estão apresentados no gráfico menor..... 98

FIGURA 3 - Fig 3. Sinais clínicos oculares de coelhos inoculados com o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) no saco conjuntival. Animal tratado com Foscarnet (grupo PFA) (A e B) e animal do grupo controle de vírus (C e D) no dia 5 pós-inoculação..... 99

FIGURA 4 - Escore clínico médio dos sinais clínicos oculares de coelhos inoculados com o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) no saco conjuntival e tratados com Foscarnet (grupo PFA) ou mantidos como controles de vírus (grupo CV). Os pontos representam as médias do escore clínico, com os respectivos erros-padrão. No gráfico menor é apresentado o somatório do escore clínico de cada grupo..... 100

6 CAPÍTULO 5

FIGURA 1 - Período de incubação da infecção neurológica em coelhos inoculados com o BoHV-5 e tratados com o inibidor da iNOS aminoguanidina (AG), com o antiviral Foscarnet (PFA), com ambos os fármacos (AG+PFA), ou mantidos como controles não-tratados (CV). Os dados são apresentados como medianas e seus respectivos intervalos interquartis (+) para grupos de seis animais (teste de Kruskal Whalis, seguido do teste comparativo múltiplo de Dunn). A redução na mediana do período de incubação do grupo AG é significativa (*; onde $P < 0,05$), quando comparada com a

mediana dos outros grupos..... 120

FIGURA 2 - Distribuição temporal da morbidade e mortalidade em coelhos inoculados com o herpesvírus bovino 5 que foram tratados com aminoguanidina (AG), Foscarnet (PFA), ambos os fármacos (AG+PFA) ou mantidos como grupo controle de vírus (CV). 121

LISTA DE TABELAS E QUADROS

3 CAPÍTULO 2

| | |
|---|----|
| TABELA 1 (Table 1) - Infectivity in different areas of the brain of rabbits inoculated intranasally with bovine herpesvirus 5 and euthanized approximately 12 h after the onset of neurological signs, between days 8 and 10 p.i. (Experiment # 1)..... | 50 |
| TABELA 2 (Table 2) - Clinical signs and histological findings in the brain of rabbits inoculated intranasally with bovine herpesvirus 5 and euthanized approximately 12 h after the onset of neurological signs (Experiment # 1)..... | 51 |
| TABELA 3 (Table 3) - Infectivity in different areas of the brain of rabbits inoculated intranasally with bovine herpesvirus 5 and euthanized at different intervals after virus inoculation (Experiment # 2)..... | 52 |

4 CAPÍTULO 3

| | |
|--|----|
| TABELA 1 - Susceptibilidade <i>in vitro</i> dos herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), tipo 2 (BoHV-2) e tipo 5 (BoHV-5) ao Aciclovir (ACV), Ganciclovir (GCV) e Foscarnet (PFA). | 74 |
|--|----|

5 CAPÍTULO 4

| | |
|--|----|
| QUADRO 1 - Critérios utilizados para quantificar as manifestações clínicas em coelhos inoculados com o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) no saco conjuntival..... | 94 |
| QUADRO 2 - Efeitos do Foscarnet em coelhos inoculados com o herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5)..... | 95 |
| QUADRO 3 - Efeitos do Foscarnet em coelhos inoculados no saco conjuntival com o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1)..... | 97 |

6 CAPÍTULO 5

| | |
|--|-----|
| TABELA 1 - Efeitos do tratamento com aminoguanidina (AG), Foscarnet (PFA), ambos os fármacos (AG+PFA) na doença neurológica produzida pelo herpesvírus bovino tipo 5.. | 119 |
|--|-----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC – anterior cortex

ACV - Aciclovir

AG - aminoguanidina

ANOVA - análise de variância

BoHV-1, BoHV-2 e BoHV-5 – Herpesvírus bovino tipo 1, tipo 2, tipo 5

BVDV – vírus da diarreia viral bovina

CC₅₀ – concentração citotóxica para 50% das células

cGMP – guanosina monofosfato cíclica

CNS – central nervous system

COX-2 – ciclooxigenase 2

CPE – cytophatic effect

CRIB – cells resistant to infection with BVDV

CV – controle de vírus

dGTP – deoxiguanosina trifosfato

DICC₅₀ – doses infectantes para 50% dos cultivos celulares

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA – ácido deoxiribonuclêico

Dpi - dia pós-inoculação

EC₅₀ – concentração que inibe em 50% a formação de placas virais

GCV - Ganciclovir

HCMV – citomegalovírus humano

H&E – hematoxilina e eosina

Hep-2 - human epidermoid cancer cells

HHV-6 – herpesvírus humano tipo 6

HI/PC – hippocampus and posterior cortex

Hpi – horas pós-inoculação

HSV-1 – herpes simplex humano tipo 1

IC – saco conjuntival

IFN- α , IFN- β , IFN- γ – Interferon α , β e γ

IHC – immunohistochemistry

IM – intramuscular

IN - intranasal

IP - intraperitoneal

L-NAME - L-nitro arginina metil-éster

L-NMMA - N^w-monomethyl-L-arginina

L-NA - L-nitroarginina

MANOVA - análise de variância de duas vias

MCF1, MCF2 - mean correction factor

MDBK – Madin Darby bovine kidney

MEM – meio essencial mínimo

MTT - 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NEDD - N-(1 naphthyl)-ethylene diamine diHCl

NO – óxido nítrico

NOS (eNOS, nNOS, iNOS) – óxido nítrico sintase, isoformas endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível (iNOS).

NO₂, NO₃ e NO_x – nitrito (NO₂), nitrato (NO₃) e ambas as moléculas (Nox)

OB/OC – olfactory bulb and cortex

PFA - Foscarnet

Pi – pós-inoculação

SC – subcutânea

SFB – soro fetal bovino

SE – soro equino

SNC – sistema nervoso central

SNK – Student Newman Keuls

TCID₅₀ – 50% tissue infectious dose

TK – Timidina quinase

Th – thalamus

VLC/DLC - ventro lateral and dorso lateral cortices

VZV – vírus da varicela zoster

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 CAPÍTULO 1. Revisão de Literatura | 16 |
| 1.1 Herpesvírus bovino | 17 |
| 1.2 Óxido nítrico | 19 |
| 1.3 Antivirais | 23 |
| 3 CAPÍTULO 2. Bovine herpesvirus 5 induces an overproduction of nitric oxide in the brain of rabbits which correlates with virus dissemination and precedes the development of neurological signs | 28 |
| Abstract | 29 |
| Introduction | 29 |
| Results | 33 |
| Discussion | 36 |
| Material and Methods | 41 |
| References | 45 |
| 4 CAPÍTULO 3. Atividade do Aciclovir, Ganciclovir e Foscarnet frente aos herpesvírus bovino tipos 1, 2 e 5 em células de cultivo | 57 |
| Resumo | 58 |
| Abstract | 58 |
| Introdução | 59 |
| Material e métodos | 62 |
| Resultados | 65 |
| Discussão | 66 |
| Conclusões | 69 |
| Fontes de Aquisição | 69 |
| Agradecimentos | 70 |

| | |
|---|------------|
| Referências..... | 70 |
| 5 CAPÍTULO 4. Atividade do Foscarnet sobre os herpesvírus bovino tipos 1 e 5 em coelhos..... | 76 |
| Abstract..... | 77 |
| Resumo..... | 78 |
| Introdução..... | 78 |
| Material e métodos..... | 80 |
| Resultados..... | 84 |
| Discussão..... | 87 |
| Comissão de ética e biossegurança..... | 90 |
| Agradecimentos..... | 91 |
| Referências..... | 91 |
| 6 CAPÍTULO 5. Efeito de um inibidor da enzima óxido nítrico sintase induzível e terapia antiviral em coelhos inoculados com o herpesvírus bovino tipo 5..... | 101 |
| Resumo..... | 102 |
| Abstract..... | 103 |
| Introdução..... | 104 |
| Material e métodos..... | 107 |
| Resultados..... | 109 |
| Discussão..... | 110 |
| Conclusão..... | 114 |
| Comissão de Ética e Biossegurança..... | 114 |
| Fontes de aquisição..... | 114 |
| Referências..... | 115 |
| 7 CONCLUSÕES..... | 122 |
| 8 REFERÊNCIAS..... | 123 |

1. INTRODUÇÃO

Os herpesvírus bovino tipos 1 (BoHV-1), 2 (BoHV-2) e 5 (BoHV-5) são classificados na subfamília *Alphaherpesvirinae*, e produzem perdas econômicas em rebanhos atingidos por diminuir os índices produtivos e reprodutivos e causar mortalidade de animais (ROIZMAN et al., 1992; FRANCO; ROEHE, 2007). Essas infecções ocorrem com frequência em rebanhos brasileiros (WEIBLEN et al., 1989; SALVADOR et al., 1998; COLODEL et al., 2002; RISSI et al., 2006; SILVA et al., 2007). O BoHV-1 é associado a várias manifestações clínicas, incluindo aborto, doença respiratória, genital e eventualmente neurológica (SILVA et al., 2007). Já o BoHV-2 produz mamilite herpética e o BoHV-5 é associado à enfermidade neurológica de curso geralmente fatal em bovinos jovens (VOGEL et al., 2003; FRANCO; ROEHE, 2007). Esses vírus têm sido alvo de estudos de patogenia, pela importância sanitária e econômica das infecções para rebanhos bovinos. Nesses estudos, coelhos têm sido utilizados como modelo experimental, pois quando inoculados pela via intranasal com o BoHV-5 apresentam doença neurológica, e pela via conjuntival com o BoHV-1 desenvolvem sinais oculares semelhantes aos observados em bovinos (ROCK; REED, 1982; SILVA et al., 1999; CARON et al., 2002).

A doença neurológica produzida pelo BoHV-5 em coelhos e em bovinos nem sempre é acompanhada de detecção abundante de antígenos no encéfalo e lesões histopatológicas, que justificassem a severidade das manifestações clínicas (RISSI et al., 2006). Por isso, acredita-se que outros mecanismos possam estar envolvidos na produção de sinais neurológicos durante a infecção por esse vírus (FLORES et al., 2009).

O óxido nítrico (NO) é sintetizado por três isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS), e regula funções fisiológicas, como a condução de estímulos nervosos e vasodilatação, além da imunidade inata contra patógenos (PACHER et al., 2007). Embora a atividade antimicrobiana do NO contra fungos e bactérias seja bem documentada e a atividade antiviral dessa molécula *in vitro* seja comprovada para o herpes simplex humano tipo 1 (HSV-1) (AKAIKE; MAEDA, 2000), a ocorrência de toxicidade durante a infecção por vírus neurotrópicos tem sido relatada (KOPROWSKI et al., 1993; ZHENG et al., 1993; FUJII et al., 1999; AKAIKE; MAEDA, 2000; UBOL et al., 2001; MEYDING-LAMADÉ et al., 2002). Quando sintetizado em excesso, o NO pode produzir neurotoxicidade e disfunção neuronal, sendo associado a diversas patologias (SPARROW, 1994; PACHER et al., 2007). Durante a

infecção pelo HSV-1, a resposta inflamatória intensa é implicada no desenvolvimento da encefalite fatal em camundongos (LUNDBERG et al., 2008). Essa resposta inflamatória não é suficiente para impedir a progressão da encefalite, e a presença de estresse oxidativo, relacionada à expressão de iNOS, também tem sido demonstrada no encéfalo de camundongos infectados (MARQUES et al., 2006; 2008). A toxicidade e participação do NO na patogenia de encefalites virais é atribuída à diminuição da síntese de ATP e interferência com a síntese de DNA nas células, S-nitrosilação de proteínas, além da modulação da resposta imune celular (AKAIKE; MAEDA, 2000). Por esse motivo, o NO, produzido após a estimulação da imunidade inata, é uma molécula candidata à participação na neuropatogenia do BoHV-5. Nesse sentido, o tratamento com inibidores da NOS, aliado à terapia antiviral, poderia elucidar a participação do NO na patogenia dessa infecção.

Dentre os fármacos que possuem ação inibitória sobre a replicação dos herpesvírus, destacam-se os análogos de nucleosídeos, como o Aciclovir (ACV) e Ganciclovir (GCV). Esses fármacos são ativados por fosfoproteínas virais - a timidina kinase (TK) ou a fosfotransferase (UL97) - e inibem a replicação da cadeia nascente de DNA por impedir a adição de outros deoxinucleotídeos trifosfatos (REID et al., 1988; WHITLEY; ROIZMAN, 2001; COEN; RICHMAN, 2007; HUSSEIN et al., 2008). O Foscarnet (PFA) é um análogo sintético do pirofosfato, e impede a conversão de nucleosídeos à nucleotídeos, consequentemente impedindo que a DNA polimerase complete o seu ciclo catalítico (ERIKSSON et al., 1982; DE CLERCQ, 2001). O PFA se constitui em uma alternativa terapêutica para o tratamento de infecções por mutantes do HSV-1, vírus da varicela zoster (VZV) e citomegalovírus humano (HCMV) resistentes ao ACV e/ou GCV (FIELD; BIRON, 1994).

Testes *in vitro* demonstraram resultados contraditórios sobre a atividade do ACV frente ao BoHV-1 (THIRY et al., 1983; GLOTOV et al., 2004). O PFA inibiu a replicação do BoHV-1 em células primárias (SCHWERS et al., 1980) e em células do *cumulus* co-cultivadas com embriões bovinos (MARLEY et al., 2006). No entanto, a atividade desses antivirais frente ao BoHV-2 e ao BoHV-5 *in vitro* não foi demonstrada. Além disso, não são relatados na literatura estudos *in vitro* com o GCV ou ainda *in vivo* com o ACV, GCV e/ou PFA frente aos herpesvírus de bovinos.

Portanto, nesta tese é relatada a investigação da participação do NO na patogenia do BoHV-5 em coelhos inoculados; da atividade antiviral do ACV, GCV e PFA frente ao BoHV-1, BoHV-2 e BoHV-5 *in vitro*; além de terapias experimentais contra o BoHV-1 e BoHV-5.

2. CAPÍTULO 1

Revisão de literatura

A família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, abriga vários patógenos de humanos e animais. Os membros dessa subfamília apresentam vírions com uma fita dupla e linear de DNA com 135-138kb, nucleocapsídeo icosaédrico envolto por envelope lipoprotéico, onde são inseridas as glicoproteínas virais (ROIZMAN et al., 1992). Entre o envelope e o nucleocapsídeo encontra-se o tegumento, uma substância amorfa que possui proteínas com funções regulatórias importantes, e que serve como diferencial para os membros dessa família (ROIZMAN et al., 1992; COEN; RICHMAN, 2007). Os herpesvírus codificam diversas enzimas, como a timidina quinase (TK) e a DNA polimerase, que são alvos para fármacos antivirais (COEN; RICHMAN, 2007). Uma característica importante dos membros dessa família é a capacidade de estabelecer e reativar infecções latentes em seus hospedeiros, propriedade mais importante do ponto de vista de controle da doença (ROCK et al., 1994).

No gênero *Simplexvirus*, são classificados os vírus do herpes simplex humano (HSV-1 e HSV-2), e o herpesvírus bovino tipo 2 (BoHV-2). Este é o agente da mamilite herpética, doença importante em rebanhos leiteiros (FRANCO; ROEHE, 2007). O HSV-1 e HSV-2 são associados a lesões nos lábios e na boca (herpes simplex), conjuntivite, infecções genitais e, eventualmente, o HSV-1 pode produzir encefalite (ROIZMAN et al., 1992; KENNEDY; CHAUDHURI, 2002).

Os herpesvírus bovino tipos 1 e 5 (BoHV-1 e BoHV-5), envolvidos em doença respiratória, neurológica, sistêmica e genital, são classificados no gênero *Varicellovirus*, juntamente com o vírus da varicela zoster (VZV) (ROIZMAN et al., 1992). O BoHV-5 produz meningoencefalite não-supurativa geralmente fatal em bovinos jovens. Esse vírus possui semelhanças genéticas e biológicas com o BoHV-1.1 e BoHV-1.2, e foi anteriormente designado BoHV-1.3 (ROIZMAN et al., 1992; BELKNAP et al., 1994). O BoHV-1 é associado com diversas manifestações clínicas, incluindo aborto, doença sistêmica em bezerros, enfermidade respiratória (rinotraqueíte infecciosa bovina, IBR) e genital (vulvovaginite e balanopostite infecciosa, IPV e IPB) (BAGUST; CLARK, 1972; BELKNAP et al., 1994).

2.1 Herpesvírus bovino

A rinotraqueíte viral bovina (IBR), produzida pelo BoHV-1.1, é uma enfermidade importante para rebanhos bovinos no mundo inteiro. Além de doença respiratória, esse agente é responsável aborto, conjuntivite e infecções sistêmicas em neonatos. As infecções respiratórias podem ser subclínicas ou ainda caracterizadas por febre, depressão, anorexia, dispnéia, taquicardia, tosse e descarga nasal, apresentando morbidade de até 100% e índices de mortalidade frequentemente baixos (<5%). O BoHV-1.2 é associado a doença genital, produzindo a vulvovaginite em fêmeas e a balanopostite pustular infecciosa em machos infectados (IPV/IBV). Essa doença é caracterizada por lesões vesiculares que ulceram e são recobertas por material fibrinoso, localizadas na vulva, pênis e prepúcio de bovinos. Ambos os agentes apresentam-se amplamente distribuídos no Brasil, com variações de prevalência entre 8 e 82% (FRANCO; ROEHE, 2007).

O BoHV-2 apresenta distribuição mundial, e no Brasil a infecção é relatada desde a década de 70 (ALICE, 1977). A prevalência de anticorpos de 24,5% indica a ampla distribuição deste agente em rebanhos bovinos de diferentes aptidões no Estado do Rio Grande do Sul. Esse agente é associado a duas formas clínicas, a *pseudo-lumpy skin disease* e a mamilite herpética bovina (BHM). A BHM é caracterizada por lesões vesiculares e erosivas nos tetos e úberes, predispondo a mastites e reduzindo a produção leiteira (GIBBS; RWEYEMAMU, 1977; TORRES et al., 2009).

O BoHV-5 produz meningoencefalite geralmente fatal em bovinos jovens. Embora o BoHV-1 também tenha sido implicado em doença neurológica em bovinos, a grande maioria dos casos da doença é associada ao BoHV-5 (SILVA et al., 2007). No Brasil existem relatos da ocorrência de surtos da infecção pelo BoHV-5 em vários Estados, incluindo o Rio Grande do Sul (RIET-CORRÊA et al., 1989; WEIBLEN et al., 1989), Mato Grosso (COLODEL et al., 2002), Mato Grosso do Sul, São Paulo (SALVADOR et al., 1998), Paraná (CLAUS et al., 2000), Rio de Janeiro (SOUZA et al., 2002) e Minas Gerais (GOMES et al., 2002). Acredita-se que esse vírus esteja amplamente distribuído entre os rebanhos bovinos do país. Contudo, informações sobre prevalência e distribuição geográfica são escassas pela reatividade sorológica cruzada com o BoHV-1 (SOUZA et al., 2002).

O BoHV-5 possui a capacidade de infectar e replicar em células epiteliais e invadir o sistema nervoso central (SNC) de bovinos, onde a infecção aguda produz a lise de neurônios e

outras células (CHOWDHURY et al., 1997; LEE et al., 1999). O neurotropismo e a neuroinvasividade constituem-se em importantes propriedades desse vírus, que utiliza as terminações nervosas regionais para, via axônios, atingir os núcleos dos neurônios bipolares do bulbo olfatório (via olfatória) (LEE et al., 1999). Do bulbo olfatório, o BoHV-5 se dissemina para o SNC, onde o vírus pode replicar e produzir lise ou estabelecer infecção latente (LEE et al., 1999; CARON et al., 2002; PEREZ et al., 2002; VOGEL et al., 2003). Essa via é preferencialmente utilizada pelo BoHV-5 durante a infecção aguda (CHOWDHURY et al., 1997; LEE et al., 1999). A via trigeminal também pode ser utilizada, pela qual o vírus se dissemina para os núcleos sensoriais da ponte, do bulbo e cerebelo; esta via parece ser mais importante para o estabelecimento de infecções latentes (LEE et al., 1999; SILVA et al., 1999; BELTRÃO et al., 2000).

Em estudos de patogenia pelo BoHV-5 (MEYER et al., 2001) ou em surtos de infecção natural em bovinos (RISSI et al., 2006) são relatadas lesões como meningoencefalite necrosante não-supurativa, hemorragia e malácia no SNC, hiperemia e edema nas meninges, ruptura da neurópila, infiltrado perivascular de células inflamatórias, corpúsculos de inclusão intranucleares basofílicos em astrócitos e neurônios, gliose focal ou difusa, necrose neuronal além de outras alterações. O córtex anterior apresenta lesões com maior frequência, seguido pelos núcleos da base, tálamo, mesencéfalo, ponte, bulbo, córtex parietal, córtex occipital, hipocampo e cerebelo (RISSI et al., 2006).

Coelhos jovens têm constituído um modelo adequado para o estudo da infecção pelo BoHV-5, podendo apresentar doença neurológica aguda e fatal, ou ainda estabelecer infecção latente após a inoculação experimental (SILVA et al., 1999; CARON et al., 2002; FLORES et al., 2009). Durante a infecção aguda ou após a reativação da infecção latente pela aplicação de dexametasona pode-se observar sinais neurológicos semelhantes aos apresentados por bovinos, caracterizados por depressão ou excitabilidade, tremores, incoordenação, opistótono, convulsões, bruxismo, andar em círculos, decúbito lateral, e o óbito ocorre geralmente 24 a 72 horas após o início das manifestações clínicas (CARON et al., 2002; FLORES et al., 2009). A cinética de replicação e distribuição do vírus e a rápida manifestação de sinais sugerem que o vírus atinge o encéfalo principalmente pela via olfatória (LEE et al., 1999). No entanto, as alterações histológicas encontradas no encéfalo em casos agudos da doença são geralmente leves, caracterizadas por focos raros de meningite não-supurativa, infiltrado perivascular e gliose focal

no córtex anterior e hemisfério ventral (CHOWDHURY et al., 1997). Essas lesões, associadas com a detecção de antígenos do vírus por imunoistoquímica, são pouco evidentes e não são correlacionadas com a severidade da doença aguda nessa espécie. Portanto, acredita-se que outros mecanismos podem estar envolvidos no desenvolvimento dos sinais neurológicos agudos na encefalite produzida pelo BoHV-5 em coelhos (FLORES et al., 2009).

A replicação lítica dos vírus no organismo ativa a resposta imune inata, com o objetivo de prevenir que o ciclo replicativo seja completado e limitar a disseminação da infecção, até que a imunidade específica seja montada (BABIUK et al., 1996; BREDER et al., 1988). A resposta inflamatória contra vírus no SNC é mediada por macrófagos e células da glia, que liberam citocinas como interferon (IFN) α e β , interleucinas (IL) 1 e 6 e fator de necrose tumoral α (TNF- α), além de IFN γ , constituindo a primeira linha de defesa do organismo. Os neurônios também podem sintetizar TNF- α e IL-1 (BREDER et al., 1988). As citocinas são fundamentais para a diferenciação, amplificação e regulação da resposta imune. Os interferons estimulam linfócitos T CD8⁺ (citotóxicos) e células *natural killer* (NK), que lisam células infectadas, enquanto que outras citocinas ativam linfócitos T CD4⁺ (auxiliares), que liberam IFN γ e promovem a síntese de anticorpos pelos linfócitos B (BABIUK et al., 1996).

2.2 Óxido nítrico

Células eucariotas sintetizam óxido nítrico (NO), uma molécula intercelular que em níveis basais regula processos vitais como o fluxo sanguíneo e a atividade neural (PACHER et al., 2007). O NO é um radical livre reativo que modula várias funções fisiológicas e é formado como um subproduto durante a conversão do aminoácido L-arginina em citrulina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (PERSICHINI et al., 2006). Essa molécula ativa a guanilato ciclase solúvel, que forma o GMP cíclico (cGMP), um segundo mensageiro em células como neurônios, células da musculatura lisa, monócitos e plaquetas, promovendo o relaxamento muscular e a vasodilatação (PERSICHINI et al., 2006; PACHER et al., 2007). O cGMP regula diversas funções intracelulares e a ativação da guanilato ciclase solúvel é a principal via de transdução de sinais nas células induzidas pelo NO (PACHER et al., 2007). O NO compartilha várias propriedades com o oxigênio, como a afinidade pelo heme e outros grupos de ferro-enxofre. Essa propriedade é importante para a ativação da guanilato ciclase e a inativação do NO pela hemoglobina (FELDMAN et al., 1993). A inativação do NO pelo heme da hemoglobina e/ou pela

oxidação a nitrito e nitrato resulta na excreção desses metabólitos pela urina (FELDMAN et al., 1993). No meio extracelular, essa molécula reage com o oxigênio e com a água para formar nitrito (NO_2) e nitrato (NO_3). Esse fator, aliado aos baixos níveis detectados em amostras biológicas, dificulta a mensuração de óxido nítrico, que é quantificado pela dosagem de metabólitos estáveis produzidos pela sua oxidação, o nitrito e nitrato (MIRANDA et al., 2001).

Existem três isoformas da enzima NOS, que diferem em propriedades bioquímicas, estruturais, quantidade de NO produzida, distribuição, regulação e função. As isoformas endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS) são constitutivas e possuem funções fisiológicas importantes (McCANN et al., 1998; PERSICHINI et al., 2006; PACHER et al., 2007). A eNOS é encontrada em células endoteliais e o NO produzido por ela regula o tônus e a adesão de células sanguíneas circulantes. A nNOS é expressa em neurônios e possui função na neurotransmissão e plasticidade sináptica. Os níveis de NO em condições fisiológicas são 20 vezes mais elevados no SNC do que na vasculatura, demonstrando sua importância na regulação da atividade neuronal (PACHER et al., 2007). Estudos demonstraram que uma redução na expressão de nNOS em áreas do SNC previamente à inflamação promoveria um aumento nos níveis do transativador de genes fator nuclear κB (NF- κB) e de citocinas, que ativam a produção da isoforma induzível da NOS (iNOS) (PERSICHINI et al., 2006). A iNOS não é detectada em condições fisiológicas, sendo expressa em inflamações por estímulo de citocinas, como o $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN-}\alpha$, $\text{IFN-}\beta$, $\text{IFN-}\gamma$ e a $\text{IL-1}\beta$, em macrófagos, neutrófilos, células da microglia e astrócitos ou diretamente por componentes microbianos (AKAIKE; MAEDA, 2000; PERSICHINI et al., 2006). A quantidade de NO sintetizado pela iNOS é 10 a 100 vezes superior à produzida pelas outras isoformas, e induz citotoxicidade em células infectadas por bactérias, protozoários, vírus ou em células tumorais (McCANN et al., 1998; AKAIKE; MAEDA, 2000).

O NO difunde-se facilmente entre células e interfere no metabolismo celular pela diminuição na síntese de ATP, interferência com a síntese de DNA, ou ainda pela toxicidade seletiva de células infectadas por S-nitrosilação de proteínas (AKAIKE; MAEDA, 2000; PACHER et al., 2007). Embora a atividade antimicrobiana do NO contra fungos e bactérias seja bem documentada, efeitos opostos são relatados em infecções virais, como pelo vírus da influenza e por vírus neurotrópicos (AKAIKE; MAEDA, 2000).

A síntese em níveis elevados de NO pela iNOS por longos períodos permite a geração de peroxinitrito, responsável por injúria tecidual oxidativa e nitrosilação de biomoléculas. Acredita-

se que os efeitos tóxicos durante as infecções por vírus neurotrópicos ocorram pela reação do NO com radicais superóxido (O_2^-), produzindo peroxinitrito ($ONOO^-$), um radical livre que fragmenta DNA, promove oxidação de lipídeos e proteínas, regula a ação de proteínas por S-nitrosilação, inativa metaloproteínas e induz a morte celular por necrose ou apoptose (BOGDAN, 1998; AKAIKE; MAEDA, 2000; GOODY et al., 2005). Outro mecanismo de toxicidade neuronal do NO seria resultando alterações na expressão da nNOS, produzindo disfunções elétricas no SNC e convulsões (ROYES et al., 2006). Portanto, a toxicidade do NO em encefalites poderia ser resultante de um mecanismo imunomediado (expressão da iNOS) de dano tecidual secundário (MEYDING-LAMADÉ et al., 2002), agravado pela desregulação na síntese de nNOS durante convulsões (ROYES et al., 2006). A produção de NO em infecções virais suprime a resposta por linfócitos T auxiliares tipo 1 (Th1), modulando a resposta para Th2 (AKAIKE; MAEDA, 2000). Linfócitos Th1 são essenciais para a resposta imune em infecções virais, mediando a síntese de $IFN\gamma$, de anticorpos neutralizantes e a ativação de linfócitos T citotóxicos, importantes para eliminação de células infectadas (BABIUK et al., 1996). Consequentemente, a troca de resposta de Th1 para Th2 em infecções virais leva a falhas na eliminação do agente do organismo, consistindo-se em um mecanismo de evasão da resposta imune por vírus (WEBER et al., 2001).

Alguns inibidores da iNOS são os corticosteróides, antioxidantes, as drogas anti-inflamatórias não-esteróides (AINES), as interleucinas 4 (IL-4) e 10 (IL-10) e o fator de crescimento semelhante à insulina β (IGF- β) (NATHAN, 1992; SAHA; PAHAN, 2006). Fármacos utilizados experimentalmente para a inibição da NOS incluem a N^w -monomethyl-L-arginina (L-NMMA), o L-nitro arginina metil-éster (L-NAME), L-nitroarginina (L-NA), 7-nitroindazol (7-NI), N-nitro-L-arginina (NNLA), monometil-L-arginina (NMLA), 1400W, L- N^6 -(1-iminoetil)lisina (L-NIL) e a aminoguanidina (AG), dentre outros. As doses destes inibidores são variáveis, dependendo da isoforma alvo da inibição (NATHAN, 1992). Essas drogas têm sido empregadas em estudos de terapias alternativas para doenças neurodegenerativas e circulatórias, infecções e outras enfermidades que envolvem a síntese excessiva de NO (PACHER et al., 2007).

Componentes da resposta imune têm sido implicados na patogenia das encefalites virais. Existem evidências de que a indução da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) em células gliais pode contribuir para dano neuronal (SPARROW, 1994). A síntese de NO mediada pela iNOS durante as infecções pelos herpes simplex humano tipo 1 (FUJII et al., 1999), vírus da imunodeficiência humana (TORRE et al., 2002), reovírus (GOODY et al., 2005), vírus da

pseudorraiva (SERRANO et al., 2002), herpesvírus bovino tipo 1 (GUPTA et al., 1999) e vírus da raiva (HOOPER et al., 1995) tem sido relatada.

A resposta neuroinflamatória no SNC de camundongos infectados com o HSV-1 é intensa e mediada por células da glia, porém não é suficiente para impedir a progressão da encefalite produzida por esse vírus (MARQUES et al., 2006). Estudos recentes demonstram a presença de estresse oxidativo e a expressão de iNOS no encéfalo de camundongos infectados com o HSV-1 (MARQUES et al., 2008). A encefalite fatal produzida pelo HSV-1 em camundongos é produzida pela resposta inflamatória intensa, observada no início da infecção, e relacionada à infiltração massiva de células da imunidade inata – neutrófilos e macrófagos - no SNC (LUNDBERG et al., 2008).

A síntese excessiva de NO e peroxinitrito foi relatada em regiões do SNC como o bulbo olfatório e tronco encefálico de ratos infectados com o HSV-1. O tratamento de ratos com o inibidor da NOS L-NMMA (100 mg/kg intraperitoneal) entre os dias três e sete após a inoculação com 10^5 PFU/mL do HSV-1 promoveu uma redução na gravidade dos sinais de paralisia e convulsões e nas taxas de morbidade e mortalidade (FUJII et al., 1999). Camundongos infectados pelo HSV-1 e tratados com L-NA, um inibidor seletivo da iNOS, ou com combinações de terapia de aciclovir e L-NA, ou metilprednisolona e aciclovir foram avaliados quanto aos níveis de mRNA da iNOS e de DNA viral (MEYDING-LAMADÉ et al., 2002). A expressão do mRNA da iNOS foi menor no grupo tratado com L-NA e aciclovir, enquanto que o número de cópias de DNA do HSV-1 foi menor nos grupos de combinação de terapia aciclovir /L-NA e aciclovir/metilprednisolona. Nos grupos não-tratado e tratado somente com aciclovir, a expressão de iNOS permaneceu elevada nas fases aguda e crônica da infecção (MEYDING-LAMADÉ et al., 2002).

O aumento na expressão das isoformas nNOS e iNOS no sistema nervoso de ratos inoculados com o vírus da pseudorraiva (PRV) foi demonstrado em locais onde ocorreu neuropatologia (SERRANO et al., 2002). O pico da expressão de nNOS ocorreu com o avanço da injúria celular e a perda da função de neurônios em estágios mais avançados da doença. Porém, o pico da expressão de iNOS foi detectado no início da infecção, em monócitos e/ou macrófagos que invadiram o SNC em resposta à infecção pelo PRV (SERRANO et al., 2002). Inicialmente, é provável que a resposta inflamatória seja estimulada para limitar a disseminação do PRV no encéfalo. Nesse sentido, o NO possuiria funções neuroprotetoras no início da infecção, mas em

estágios avançados da doença, após a disseminação do PRV para neurônios sinapticamente interligados, o aumento na concentração de NO promoveria neurotoxicidade (SERRANO et al., 2002). Um aumento na expressão da eNOS, nNOS e iNOS também foi demonstrado no SNC de suínos infectados com o PRV, principalmente às 48 e 72 horas após a inoculação viral (MARCACCINI et al., 2007).

O vírus da raiva induz um aumento na expressão da iNOS e uma redução na expressão de nNOS no encéfalo de camundongos infectados, relacionados com a gravidade da doença. A síntese de peroxinitrito durante a raiva está associada à ruptura da barreira hematoencefálica e neurotoxicidade (UBOL et al., 2001). A aplicação de um inibidor da iNOS, a AG (400 mg/kg ou 800 mg/kg) resultou no retardo do pico de replicação viral no SNC em 24 a 48 horas, no aumento do tempo de sobrevivência e em uma progressão mais lenta da morte neuronal por apoptose (UBOL et al., 2001). Pacientes com demência associada à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) possuem níveis aumentados de iNOS, IL-1 e caspase-1 em células da micróglia e astrócitos. Nesta enfermidade, o NO contribui para a patogênese da infecção via citotoxicidade, estresse oxidativo e principalmente por facilitar a lise de linfócitos T CD4⁺ infectados, suprimindo suas funções (ZHAO et al., 2001; TORRE et al., 2002).

Células mononucleares periféricas e monócitos podem sintetizar NO *in vitro* em resposta ao BoHV-1 (GUPTA et al., 1999). No entanto, o envolvimento dessa molécula na patogênese da rinotraqueíte infecciosa bovina ainda não é conhecido. As semelhanças genéticas e biológicas do BoHV-5 com o BoHV-1, HSV-1 e PRV indicam que, assim como nas infecções por esses herpesvírus, a síntese excessiva de NO em regiões do SNC de animais com infecção aguda pelo BoHV-5 também possa ocorrer. Nesse sentido, a inibição dessa síntese excessiva de NO poderia, juntamente com a aplicação de antivirais, se constituir em um alvo para a terapia dessa infecção.

2.3 Antivirais

As quinases e as polimerases de DNA dos herpesvírus se constituem nos principais alvos das terapias antivirais. Dentre os fármacos que possuem ação inibitória sobre a replicação dos herpesvírus, os mais utilizados em medicina humana são os análogos de nucleosídeos (COEN; RICHMAN, 2007; HUSSEIN et al., 2008). A atividade da enzima timidina quinase (TK) dos herpesvírus é a base molecular para a atividade seletiva dos nucleosídeos acíclicos, pois as quinases celulares são ativadoras fracas desses fármacos. Em consequência, células infectadas

por herpesvírus apresentam concentrações desses fármacos ativados 100 vezes superiores às encontradas em células não-infectadas (HUSSEIN et al., 2008). Tendo em vista o desenvolvimento de resistência viral contra os análogos de nucleosídeo, fez-se necessário o desenvolvimento de antivirais que inibissem a extensão da cadeia de DNA nascente pela DNA polimerase por outros mecanismos, ou seja, dos antivirais não-nucleosídeos (WHITLEY; ROIZMAN, 2001; COEN; RICHMAN, 2007).

O aciclovir (ACV) é um análogo de nucleosídeo que consiste em uma guanina associada a uma molécula semelhante a um açúcar acíclico, desenvolvido inicialmente como um inibidor da adenosina deaminase. As propriedades antivirais desse fármaco foram descobertas posteriormente por ELION et al. (1977). Em células infectadas, o ACV é fosforilado pela enzima TK do HSV-1 ou do VZV, produzindo o monofosfato-ACV, que é convertido a difosfato e trifosfato por enzimas celulares. Este inibe por competição a incorporação de deoxiguanosina-trifosfato (dGTP), sendo incorporado na cadeia nascente de DNA em oposição a resíduos de citosina. Esta incorporação impede a adição de outros deoxinucleotídeos trifosfatos, pois o ACV-trifosfato não possui um radical hidroxil livre na posição 3', necessário para a adição de novas bases pela DNA polimerase (COEN; RICHMAN, 2007). Esse antiviral atualmente é licenciado para o tratamento de infecções cutâneas e de mucosas pelo HSV-1 e VZV, além de infecções neurológicas pelo HSV-1 (FIELD; BIRON, 1994). Cepas do HSV resistentes ao ACV possuem mutações no gene da TK (COEN, 1994) ou ainda da DNA polimerase, que alteram a afinidade dessas enzimas pelo substrato, o ACV (FIELD; BIRON, 1994).

Porém, o ACV é pouco ativo na inibição da replicação do citomegalovírus humano (HCMV). Provavelmente essa ineficácia resulta da ausência de uma enzima do HCMV que fosforile o ACV com a mesma eficiência da TK do HSV-1 e VZV (FIELD; BIRON, 1994). Desta forma, surgiu a necessidade do desenvolvimento do ganciclovir (GCV), que é mais eficiente do que o ACV na inibição da replicação do genoma do HCMV. Esse fármaco é um análogo acíclico da guanosina, e também necessita de fosforilação e ativação a trifosfato para competir com a guanosina trifosfato pela sua incorporação na cadeia de DNA nascente (WHITLEY; ROIZMAN, 2001). O GCV possui uma hidroxila livre na posição 3', e sua fosforilação é realizada por uma enzima codificada pelo gene UL97. Portanto, não depende da presença da TK. Após incorporação do GCV na cadeia de DNA, a DNA polimerase ainda pode adicionar mais um nucleotídeo, antes de promover a terminação da cadeia (REID et al., 1988). A terapêutica de

infecções pelo HCMV é realizada tanto com o GCV quanto com o ACV, embora a ativação do ACV para esse vírus seja inferior aquela observada pelo HSV e VZV (FIELD; BIRON, 1994). Mutações no gene da DNA polimerase viral (UL54) ou no gene da fosfotransferase (UL97) conferem resistência a cepas do HCMV ao GCV (LURAIN et al., 1992; BALDANTI et al., 2002). Atualmente, antivirais licenciados para tratar infecções pelo HCMV incluem o GCV, Cidofovir e Foscarnet (BALDANTI et al., 2002).

O Foscarnet (PFA) é um análogo não-nucleosídeo sintético do pirofosfato, que não requer ativação por quinases virais. Após a ocupação do sítio do pirofosfato, previne que a polimerase complete o seu ciclo catalítico (ERIKSSON et al., 1982). Esse antiviral é um fosfonato, que não pode ser clivado por esterases. Consequentemente, não há conversão da forma de nucleosídeo para nucleotídeo, terminando assim a elongação da cadeia de DNA nascente (DE CLERCQ, 2001). A seletividade de atuação do PFA em células infectadas por vírus ocorre pelo fato de a DNA polimerase viral ser muito mais sensível à sua ação do que a DNA polimerase celular (COEN; RICHMAN, 2007). O PFA se constitui em uma alternativa terapêutica para o tratamento de infecções por mutantes do HSV-1, VZV e HCMV resistentes ao ACV e/ou GCV, que ocorrem com maior frequência em pacientes imunodeprimidos (FIELD; BIRON, 1994). Mutantes resistentes ao ACV apresentam resistência cruzada a outros análogos de nucleosídeo, como o Valaciclovir (forma oral do ACV), Penciclovir e sua forma oral, o Famciclovir. Portanto, o PFA se constitui em uma alternativa terapêutica para essas infecções (FIELD; BIRON, 1994). Terapias de associação também são descritas, e a resposta clínica positiva ao tratamento da encefalomielite severa produzida pelo herpesvírus humano tipo 6 (HHV-6) em adultos imunocompetentes com PFA e GCV é descrita (TROY et al., 2008). Já os mutantes do HCMV nos genes UL54 e UL97 são resistentes ao GCV, Cidofovir e PFA (JABS et al., 1998; BALDANTI et al., 2002). Mutações pontuais no gene da DNA polimerase dos herpesvírus são implicadas na resistência ao PFA e outros antivirais (FIELD; BIRON, 1994). Por essa razão, novos antivirais análogos da adenina (synadenol) e da guanina (synguanol) têm sido testados frente a estes mutantes multi-resistentes, apresentando-se como inibidores potentes da replicação de isolados clínicos do HCMV (BALDANTI et al., 2002).

A atividade antiviral do ACV e GCV foi testada frente aos herpesvírus felino tipo 1 (FeHV-1) e equino tipo 1 (EqHV-1). O GCV é considerado o fármaco de escolha para tratar as infecções por esses dois agentes. A concentração do ACV necessária para inibir em 50% a

replicação do EHV-1 *in vitro* (EC₅₀) é 20 vezes maior que a do GCV, e para o FeHV-1, 11 vezes maior (MAGGS; CLARKE, 2004; MEULEN et al., 2006; GARRÉ et al., 2007). Acredita-se que a baixa eficiência da TK do FeHV-1 na ativação do ACV seja responsável pela necessidade de elevadas concentrações desse fármaco para que se evidencie atividade antiviral contra esse vírus (HUSSEIN et al., 2008). O ACV inibiu com maior eficiência a replicação do FeHV-1 em células CRFK transfectadas com a TK do HSV-1 (HUSSEIN et al., 2008). O PFA apresenta atividade intermediária na redução do número de placas do FeHV-1 *in vitro*, se comparado com o GCV e com outros fármacos, como o Cidofovir. Frente ao EHV-1, a atividade do PFA na redução do número de placas foi dependente do isolado testado, apresentando valor limitado para o tratamento de infecções por esse vírus (MEULEN et al., 2006; GARRÉ et al., 2007).

Poucos trabalhos relatam testes de drogas antivirais contra os herpesvírus de bovinos. A maioria dos trabalhos disponíveis refere-se a extratos de plantas e óleos essenciais, ainda não disponíveis comercialmente, ou seja, não produzidos em larga escala. Testes *in vitro* frente ao herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) demonstraram que o ACV reduz os títulos virais em 100 vezes (GLOTOV et al., 2004). Porém, estudos prévios demonstraram que o ACV é pouco efetivo frente ao BoHV-1 *in vitro* (THIRY et al., 1983). O PFA foi testado *in vitro* quanto a sua capacidade de inibir a replicação do BoHV-1 em células primárias, apresentando inibição de 99,9% na presença de 500 µM do fármaco (SCHWERS et al., 1980). A inibição da replicação do BoHV-1 em células do *cumulus* co-cultivadas com embriões bovinos em quatro logaritmos frente a 200 µg/mL, e completa a 400 µg/mL (1333 µM) do fármaco foi demonstrada por MARLEY et al. (2006).

Assim, neste trabalho pretendeu-se investigar a expressão de iNOS e os níveis de NO no encéfalo de coelhos infectados experimentalmente pelo BoHV-5, previamente e após o desenvolvimento de sinais neurológicos, bem como determinar se essa molécula está relacionada à patogenia da doença neurológica nessa espécie. Nesse sentido, a inibição da síntese em níveis elevados de NO, aliada à terapia antiviral, poderia se constituir em uma alternativa terapêutica, além de elucidar mecanismos de patogenia relacionados à esta encefalite viral. Estudos que demonstrem a eficácia de antivirais disponíveis comercialmente contra os herpesvírus de bovinos são escassos, demonstrando a necessidade de testes *in vitro* e *in vivo* para a determinação de antivirais efetivos contra esses agentes. No capítulo 2, investigou-se os níveis de NO, expressão da enzima iNOS e antígenos virais, além da infectividade viral no encéfalo de coelhos inoculados com o BoHV-5; no capítulo 3 foram realizados testes *in vitro* com os antivirais ACV, GCV e

PFA frente ao BoHV-1, BoHV-2 e BoHV-5. No capítulo 4, investigou-se a atividade do PFA na redução da excreção de vírus e sinais clínicos produzidos pelo BoHV-1 e BoHV-5 em coelhos inoculados experimentalmente e por fim, no capítulo 5 foi investigada a atividade de um inibidor da iNOS, a aminoguanidina, associada ou não à terapia antiviral com PFA, na doença neurológica aguda produzida pelo BoHV-5 em coelhos.

3. CAPÍTULO 2

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

R Dezengrini,¹ M Weiss,¹ FD Torres,¹ MS Oliveira,² AF Furian,² CF Mello,² R Weiblen,¹ and EF Flores¹

1Setor de Virologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva; and 2Laboratório de Neurotoxicidade e

Psicofarmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM),

Santa Maria, Brazil.

(Journal of NeuroVirology, 15(2):153-163, 2009).

Address correspondence to E. F. Flores, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil 97105-900. E-mail: flores@ccr.ufsm.br.

The authors thank the Department of Pathology of the Federal University of Santa Maria, for their assistance in immunohistochemistry staining and veterinary students in the authors' laboratory for their assistance in animal handling and NOx measurements. The authors also thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico) for funding and fellowships to E.F.F., R.W., M.W., F.D.T., A.F.F., and C.F.M.; and CAPES (Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior) for fellowships to R.D. and M.S.O.

Received 18 June 2008; revised 11 September 2008; accepted 7 October 2008.

Summary

We herein report an investigation of nitric oxide (NO) levels, a candidate molecule for neuronal toxicity and dysfunction, in the brain of rabbits during experimental neurological infection by bovine herpesvirus 5 (BoHV-5). Spectrophotometry for NO products (NO₂ and NO₃) revealed that NO levels were significantly increased ($F(4, 40)=3.33$; $P<.02$) in several regions of the brain of rabbits with neurological disease, correlating with moderate to high BoHV-5 titers. Immunohistochemistry of brain regions revealed a group of cells with neuronal and astrocyte morphology expressing the enzyme inducible NO synthase (iNOS) close to virus antigen-positive neurons. In addition, the investigation of nitric oxide levels between 2 and 6 days post infection (d.p.i.) revealed an initial increase in NO levels in the olfactory bulb and cortex (OB/OC) and anterior cortex (AC) at day 3 p.i., correlating with the initial detection of virus. As the infection proceeded, increased NO levels - and infectivity - were progressively being detected in the OB/OC and AC at day 4 p.i. ($F(12, 128)=2.82$; $P<.003$); at day 5 p.i. in several brain regions ($P<.003$ in the OB/OC); and at day 6 p.i. in all regions ($P<.003$) but the thalamus. These results show that BoHV-5 replication in the brain of rabbits induces an overproduction of NO. The increase in NO levels in early infection correlated spatially and temporally with virus dissemination within the brain and preceded the development of neurological signs. Thus, the overproduction of NO in the brain of BoHV-5-infected rabbits may be a component of the pathogenesis of BoHV-5-induced neurological disease. *Journal of NeuroVirology* (2009) **15** (2):153-163.

Keywords: BoHV-5; rabbits; pathogenesis; nitric oxide

Introduction

Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) is an alphaherpesvirus associated with

meningoencephalitis, a disease generally fatal of cattle (Studdert, 1989). BoHV-5 is genetically and antigenically related to another important alphaherpesvirus of cattle, i.e., BoHV-1, the agent of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) and vulvovaginitis/balanoposthitis (IPV/IPB) (Kahrs, 2001). Neurological disease associated with BoHV-5 infection has been frequently reported in several countries, especially in Brazil, Argentina, and Uruguay, where numerous outbreaks are reported every year (Carrilo *et al*, 1983; Weiblen *et al*, 1989; Rissi *et al*, 2006).

Rabbits have been widely used to study several aspects of BoHV-5 neuropathogenesis, because they develop neurological infection and disease resembling that occurring in cattle (Meyer *et al*, 1996; Chowdhury *et al*, 1997; Silva *et al*, 1999). After intranasal inoculation, BoHV-5 is transported by terminal regional nerves to the olfactory bulb (OB), where it replicates and subsequently disseminates into other areas of the central nervous system (CNS) (Chowdhury *et al*, 1997; Diel *et al*, 2005). Viral invasion of the brain is generally followed by spread and massive replication in different areas, which is frequently accompanied by meningoencephalitis and the development of neurological signs (Chowdhury *et al*, 1997). The neurological signs developing upon BoHV-5 inoculation of weanling rabbits include depression, excitation, tremors, incoordination, bruxism, and opisthotonus, and these signs inevitably progress to seizures and death (Meyer *et al*, 1996; Chowdhury *et al*, 1997; Silva *et al*, 1999). Histologically, the neurological disease is characterized by leptomeningitis, focal gliosis, perivascular cuffing, and to a lesser extent, neuronal degeneration, mainly in the olfactory, parietal cortices, and hippocampus (Chowdhury *et al*, 1997). The brain of many rabbits developing early onset of neurological disease (6 to 9 days after virus inoculation), and also of cattle suffering from natural disease, do not show either histological changes of inflammatory reaction or a significant number of cells positive for BoHV-5 antigens (Silva *et al*, 1999; Rissi *et al*, 2006; E. F. Flores, unpublished observations).

Nitric oxide (NO), a signaling molecule involved in a wide range of physiologic activities, has been also involved in early antiviral responses in the CNS, in cytotoxicity, and in neuronal dysfunction (Harris *et al*, 1995; Chesler and Reiss, 2002; Serrano *et al*, 2002). Nitric oxide synthase (NOS), the enzyme that converts l-arginine in NO, has been identified in three isoforms: the endothelial (eNOS), neuronal (nNOS), and inducible (iNOS), encoded by different genes and expressed in distinct cell types (Cerqueira and Yoshida, 2002; Persichini *et al*, 2006). The isoforms eNOS and the nNOS are constitutive enzymes, expressed mainly in endothelial cells and neurons, respectively, both regulated by intracellular influx of calcium and by calmodulin (Cerqueira and Yoshida, 2002). The isoform iNOS is expressed in response to pathogens and their components, by the signaling of cytokines such as interleukin-1 β (IL-1 β) and interferon- γ (IFN- γ), through nuclear factor (NF)- κ B activity (Persichini *et al*, 2006). NO synthesized by iNOS plays an important role in the innate immune response against intracellular pathogens, and is expressed mainly by activated macrophages, microglia cells, and astrocytes recruited to sites of infection and inflammation in the CNS (Saha and Pahan, 2006). However, iNOS is responsible for a large burst of NO synthesis that greatly exceeds the amount produced by the constitutive eNOS and nNOS isoforms. This burst is likely responsible for the cytotoxic effects of NO during inflammation and neuronal dysfunction leading to seizures (Kiechele and Malinski, 1993; Wong and Marsden, 1996; Akaike and Maeda, 2000).

NO has been involved in the pathogenesis of many encephalitic viral infections, and neurotoxic effects have been attributed to this molecule during viral encephalitis (Harris *et al*, 1995; Fuji *et al*, 1999; Hooper *et al*, 2001; Ubol *et al*, 2001). Virus or viral components such as nucleic acids or proteins are strong inducers of iNOS in glial cells (Saha and Pahan, 2006). Increased expression of iNOS correlates in timing, location, and magnitude with those of virus propagation in the CNS of pigs infected with pseudorabies virus (PRV) (Serrano *et al*, 2002;

Marcaccini *et al*, 2007). Expression of iNOS has also been correlated with the severity of neurological signs and degree of inflammatory reaction during rabies virus infection in mice (Ubol *et al*, 2001). An increased NO synthesis was also observed in CNS regions of rats harboring active herpes simplex virus (HSV-1) replication (Fuji *et al*, 1999). Moreover, microglia cells have been considered the major source of iNOS synthesis in the brain of mice with HSV-induced brain oxidative stress (Marques *et al*, 2008).

In early phases of infection, NO is probably involved in limiting virus spread within the brain (Serrano *et al*, 2002). However, in later stages of infection, NO likely contributes to neurological dysfunction and neurotoxicity through the production of intermediary cytotoxic products, apoptosis, and necrosis (Cerqueira and Yoshida, 2002; Serrano *et al*, 2002). The formation of peroxynitrite (ONOO⁻), for example, results in lipid peroxidation, protein oxidation, and DNA damage, producing oxidation and nitration of several biomolecules (Bogdan, 1998; Hooper *et al*, 2001; Zaki *et al*, 2005). NO has also been implicated in mitochondrial respiratory chain inhibition, leading to mitochondrial damage (Stewart and Heales, 2003) and in the induction of electrical dysfunction and seizures in rats (Royes *et al*, 2005).

The neurological disease accompanying BoHV-5 replication in the brain of experimentally infected rabbits and occurring at early times after virus inoculation is not frequently associated with pronounced histological changes and/or the presence of a significant number of antigen-positive neurons. Thus, it is hypothesized that mechanisms other than a severe inflammatory reaction and/or a massive infection and destruction of neurons may contribute for the neurological signs observed during BoHV-5 infection in rabbits. Thus, the objective of this study was to investigate whether the levels of NO - a candidate molecule for neuronal toxicity and dysfunction - are increased in the brain of rabbits during neurological infection by BoHV-5.

Results

Experiment 1

Clinical signs, virus isolation, and quantitation

All inoculated rabbits excreted virus in nasal secretions until the last day of clinical monitoring, demonstrating active virus replication in the nasal mucosa. In all cases, the euthanasia for tissue collection was performed approximately 12 h after the initial manifestations of neurological disease (8 to 10 days p.i.). Three inoculated rabbits (1, 2, and 3) plus three mock infected controls were euthanatized at day 8 p.i. Inoculated rabbits 4 and 5 plus two controls were submitted to euthanasia at day 10 p.i. Brain regions collected individually were submitted to virus isolation and quantitation. Table 1 presents the viral titers in different brain areas of rabbits presenting neurological signs. Virus titers ranging from $10^{3.87}$ to $10^{5.6}$ TCID₅₀/g were detected in all brain areas collected from these rabbits. Higher titers were detected in the anterior cortex (AC), parietal/ventrolateral cortices (DLC/VLC), and hippocampus/posterior cortex (HI/PC) of rabbits 1, 3, and 4. The thalamus (Th) of the animals 2 and 3 and HI/PC of animal 5 were positive for infectious virus only in the second passage in cell culture.

NOx levels in the brain of rabbits with neurological disease

Colorimetric measurement of NO intermediary products (NO₂ and NO₃) showed that NOx levels were significantly increased ($F(4,40) = 3.33$; $P < .02$) in all examined regions of the brain collected from rabbits presenting neurological disease (Figure 1). In these animals, the AC presented the highest levels, followed by the olfactory bulb and cortex (OB/OC), DLC/VLC, HI/PC, and Th. The baseline levels of NOx in the controls remained fairly steady, with minor variations among the brain regions (Figure 1). As shown in Table 1, virus isolation and quantitation from tissues revealed the presence of moderate virus titers in all these areas. These results showed that the levels of NOx were significantly increased in several areas of the brain of rabbits presenting

neurological signs associated with BoHV-5 infection, and the increased NOx levels correlated spatially with virus replication.

Immunohistochemistry for BoHV-5 antigens and iNOS

Antigens of BoHV-5 were detected by immunohistochemistry (IHC) exclusively in cells with characteristic neuronal morphology, predominantly of the OB/OC and AC of the brain of sick rabbits (Figure 2A). Virus-positive neurons were also observed in the HI/PC, DLC/VLC, and Th, although in a lower frequency. In general, cells positive for viral antigens were present in well-defined clusters, typically of 4 to 10 neurons; usually one to three clusters per brain region. The location of these clusters was roughly the same, probably corresponding to areas of anatomically and functionally related neurons (not shown). A few, scattered, antigen-positive neurons were also observed across some sections, outside the clusters (not shown). As expected, brain regions of control animals were negative for BoHV-5 antigens. Clusters of cells showing strong iNOS signal - with astrocyte, microglia, and neuronal characteristic morphology - were observed in the same areas that were positive for BoHV-5 antigens (Figure 2B). The brain regions of control animals also showed some scattered cells weakly stained for iNOS. These results suggest that low levels of iNOS are expressed by cells of the brain even in the absence of inflammatory stimuli. Increased levels and well defined clusters of cells expressing high levels of iNOS, however, were present exclusively in the brain of inoculated rabbits, demonstrating the induction of iNOS expression after BoHV-5 infection.

Histopathology

All brain regions collected from sick animals (Experiment 1) for NOx determinations were submitted to histological examination. A summary of the histological changes and the clinical signs presented by sick rabbits is presented in Table 2. Histological/inflammatory changes were more pronounced in rabbits 3 and 4. At the day of euthanasia, these rabbits presented a profound

depression, nasal discharge, and rabbit 3 also had bruxism. In contrast, rabbits 1, 2, and 5 presented classical, severe signs of neurological infection such as circling, opisthotonus, and seizures. Interestingly, mild, restricted or none histological changes were observed in the brain of these animals. A consistent finding among the infected rabbits (exception rabbit 2) was the presence of histological/inflammatory changes mainly in the anterior structures (OC, AC).

Experiment 2

As the NOx measurements in Experiment 1 were performed in the brain of rabbits with overt neurological signs, a question remained whether the increase in NOx levels preceded or followed the development of neurological signs, especially seizures. To answer this question, another experiment was conducted, in which the measurements of NOx levels and search for virus replication were performed concomitantly and sequentially, prior to the development of neurological signs, in the brain of rabbits euthanized at different time points after virus inoculation (Experiment 2).

Virus isolation and quantitation

Infectious virus was demonstrated in nasal secretions of the inoculated rabbits between day 1 p.i. and the respective day of euthanasia. No infectious virus was recovered from brain regions of rabbits euthanized at day 2 p.i. and from controls. The progression of virus detection in each particular day and brain region is presented in Table 3. Probably, the HI/PC and Th are the last areas to be infected during viral dissemination within the brain, because some of these sections were still negative for virus at day 6 p.i., yet positive in Experiment 1 (examined at days 8 to 10 p.i.). The virus titers detected at late stages (5 and 6 d.p.i.) were higher than those detected at early times; and the distribution of the virus resembled that observed in Experiment 1, with the exception of Th (Tables 1 and 3). The kinetics of viral detection in different brain regions supports the findings that the main pathway of BoHV-5 transport into the brain of rabbits after

intranasal inoculation is the olfactory tract (Chowdhury *et al*, 1997; Diel *et al*, 2005).

NOx levels in the brain of rabbits at different time points after virus inoculation

At day 2 p.i., the levels of NOx in different areas of the brain of infected rabbits did not differ significantly from those of control rabbits (not shown). At day 3 p.i., a slight increase in NOx levels was observed in the OB/OC and AC (Figure 3A). This increase correlated with the initial detection of virus in these structures (Table 3). No changes in NOx levels were detected in the other structures at day 3 p.i., correlating with the lack of virus detection. At day 4 p.i., high NOx levels were detected in several examined sections. The increase was more pronounced in the AC (statistically significant; $F(12, 128) = 2.82$, $P < .003$), followed by OB/OC. The other structures also showed a slight, yet not statistically significant increase (Figure 3B). Again, the increased levels of NOx were correlated with the detection of virus in these areas (Table 3). At day 5 p.i., NOx levels were increased in all examined sections, yet a statistically significant difference between inoculated and control animals ($F(12, 128) = 2.82$; $P < .003$) was observed only in the OB/OC (Figure 3C). At this day, infectious virus was detected in several examined sections (Table 3, rabbits 18, 19, 20, and 21). In the last day of examination (day 6 p.i.), all sections but the Th presented a significant increase in the NOx levels ($F(12, 128) = 3.33$; $P < .003$; Figure 3D). These findings also correlated with the widespread distribution of the virus across these sections at day 6 p.i., and the lack of virus detection in the Th (Table 3, rabbits 22, 23, 24, and 25). These results showed that NOx levels increased progressively in most brain regions between days 3 and 6 p.i. and this increase correlated spatially and temporally with virus dissemination within the brain. In all cases, overproduction of NOx preceded the development of neurological disease.

Discussion

The results shown herein demonstrate that BoHV-5 replication in the brain of

experimentally infected rabbits induces an increase in the levels of NOx. The high NOx levels correlated with the areas harboring active virus replication and were not necessarily accompanied by histological inflammatory changes. Furthermore, sequential measurements of NOx at different time points after virus inoculation revealed that the increased levels correlated temporally and spatially with virus invasion into and spread within the brain; and preceded the development of neurological signs. Thus, it is reasonable to speculate that the increased synthesis of NO that starts at early stages of virus replication in the brain - likely a component of the innate immune response to the virus - may be followed by an overproduction of NO, leading to neuronal toxicity and dysfunction and contributing for the development of neurological disease.

In our experience, the brains of many rabbits developing early onset neurological disease upon BoHV-5 inoculation (days 6 to 9 p.i.), and some cattle developing natural disease as well, do not present marked histological changes of encephalitis (Silva *et al*, 1999; Rissi *et al*, 2006; E. F. Flores, unpublished observations). Likewise, virus positive neurons (as ascertained by IHC), or necrotic neurons, are not usually present in abundant numbers in many brains from sick animals. The lack of correlation between severity of neurological disease and the degree of histological changes was also observed in the present experiment. Rabbits 1 and 5 (Experiment 1) developed severe neurological signs (seizures, opisthotonus) albeit presented only mild and/or restricted inflammatory changes. Rabbit 2 did not present any histological change in spite of the severe neurological disease (Table 2). The absence or mildness of inflammatory histological changes and the relatively low number of infected/ affected neurons contrast with the severity of neurological signs, which inevitably lead to death. These observations prompted us to investigate whether the levels of NO - a candidate molecule for neuronal toxicity and dysfunction - are increased in the brain of rabbits during neurological infection by BoHV-5.

NO produced by inflammatory cells, e.g., activated macrophages and glial cells through

induction of the enzyme inducible NO synthase (iNOS) has been involved in the pathogenesis of neurotropic virus infections, and both protective and neurotoxic effects have been attributed to this molecule (Harris *et al*, 1995; Fuji *et al*, 1999; Ubol *et al*, 2001; Serrano *et al*, 2002). The NO synthesized by iNOS is believed to play an important role in the innate immune response against viruses (Chesler and Reiss, 2002). In initial stages of neurological infection, NO may be important to limit the virus spread to different areas of the CNS, acting as part of an antiviral strategy during innate immune response, along with IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , and other cytokines expressed mainly by macrophages, microglia cells, astrocytes, and neurons (Minc-Golomb *et al*, 1994, 1996; Moro *et al*, 1998; Saha and Pahan, 2006; Marcaccini *et al*, 2007). These responses lead to an inflammatory reaction, necessary to control early stages of infection and activate specific immune responses (Karupiah and Harris, 1995; Kodukula *et al*, 1999; Akaike and Maeda, 2000; Chesler and Reiss, 2002). Although there is a strong neuroinflammatory response, induced by microglia cells early into the brain of HSV-infected mice, this response seems not to be enough to avoid the progression of the disease (Marques *et al*, 2006).

On the other hand, it is widely accepted that high NO levels lead to oxidative injury through oxidation and nitration reaction of biomolecules (Akaike and Maeda, 2000). Increased levels of iNOS correlates with PRV propagation in the CNS of infected pigs (Serrano *et al*, 2002; Marcaccini *et al*, 2007), correlates with the severity of neurological signs during rabies virus infection in mice (Ubol *et al*, 2001), and were also observed in CNS regions of HSV-1 experimentally infected rats (Fuji *et al*, 1999). Recent studies demonstrate the presence of oxidative damage in the brain of mice with neurological infection by HSV. In this study, microglia cells are considered the major source of iNOS (Marques *et al*, 2008). Treatment of HSV-1-infected rats with an iNOS inhibitor (l-NMMA) resulted in reduction of morbidity and mortality, with amelioration and/or reduction of neurological signs, reinforcing the role of NO in

the pathogenesis of the disease (Fuji *et al*, 1999). Taken together, these findings suggest that NO produced in early infection might be involved in limiting virus spread within the brain, yet in later stages (and in high levels) may contribute to neurological neurotoxicity and dysfunction through the production of cytotoxic products (Fuji *et al*, 1999; Serrano *et al*, 2002). These observations are not exclusive to neurological disease by herpesviruses, because NO overproduction has also been demonstrated during rabies virus, borna disease virus, and reovirus neurological infections (Koprowsky *et al*, 1993; Ubol *et al*, 2001; Goody *et al*, 2005).

In our first experiment, spectrophotometry for NO₂ and NO₃ demonstrated that NO_x levels were significantly increased in all examined brain regions, and that high NO_x levels correlated spatially with virus replication (Figure 1, Table 1). Although the cell source of the NO burst detected by spectrophotometry could not be unequivocally determined by our IHC, it was likely derived from iNOS induction. Both nNOS and eNOS are constitutively expressed in low levels in neurons and endothelial cells, respectively, and do not contribute to the burst of NO observed in inflammatory reactions. Rather, this burst has been mainly attributed to iNOS induction and NO synthesis by inflammatory cells (Akaike and Maeda, 2000; Marcaccini *et al*, 2007). Regardless the cell source, our NO_x measurements detected high NO levels in several areas of the brain of rabbits developing neurological disease upon BoHV-5 infection.

As the levels of NO_x were first determined in rabbits with overt neurological disease and undergoing episodes of seizures, it was not clear whether the increased levels preceded, accompanied, or followed these neurological events. NO has been shown to act as proconvulsing agent and abnormal expression of nNOS and NO synthesis can trigger seizures in rats (Bagetta *et al*, 2002; Royes *et al*, 2005). Likewise, seizures may act as a trigger for the induction of iNOS and overproduction of NO, because seizures may induce IL-1 β expression (Vezzani, 2005) and electrical impulses. Then we investigated the timing and spatial relationship between virus

invasion and replication in the brain and NO synthesis. Results from Experiment 2 demonstrated that the increase in NO levels correlated spatially and temporally with viral dissemination within the brain. High NOx levels were first detected in anterior structures (OB/OC, AC) at day 3 p.i., coinciding with the first detection of virus in these areas. Following intranasal inoculation, BoHV-5 invades the brain mainly through the olfactory route, reaching first the OB and AC, where it replicates and disseminates further into the brain (Chowdhury *et al*, 1997; Diel *et al*, 2005). Indeed, both infectivity and high NO levels were first (and consistently) detected in these anterior structures (OC, AC). In the following days, high NOx levels were being progressively detected in additional areas, always correlating with infectivity. Thus, NO overproduction seemed to accompany virus dissemination within the brain and clearly preceded the development of neurological signs.

Seizures are consistently observed during neurological disease associated with BoHV-5 infection in rabbits (Meyer *et al*, 1996; Chowdhury *et al*, 1997; Silva *et al*, 1999). In our study, NOx levels were higher in the brain of rabbits with overt neurological disease (Experiment 1) than those observed early in infection, prior to the development of neurological signs (Experiment 2). Thus, as suggested in other viral systems (Fuji *et al*, 1999) it is possible that overproduction of NO during early infection may contribute to neuronal toxicity and dysfunction, leading to the production of neurological signs, including seizures. The production of seizures, in its turn, might provide stimuli for additional iNOS and nNOS activation, leading to further increase in NO levels and neuropathology (Serrano *et al*, 2002; Royes *et al*, 2005). Taken together with previous data, our results suggest that overproduction of NO and its toxic effects to neurons may be a component of the neuropathogenesis of BoHV-5 infection in rabbits. Experiments may also be performed in the future to determine whether NO levels are increased in the brain of BoHV-5 experimentally infected calves.

In summary, our results showed that NO levels are up-regulated in the brain of rabbits during BoHV-5-induced neurological disease. The increase in NO synthesis correlated spatially and temporally with the dissemination of the virus within the brain and preceded the development of clinical disease. The correlation between NO overproduction and the development of neurological signs suggests a potential role for NO in the neuropathology associated with BoHV-5 infection. In this context, a better understanding of the mechanisms leading to neuronal toxicity and/or dysfunction may help in understanding the neuropathogenesis of BoHV-5 infection in cattle. Currently, we are focusing on the investigation on the role of NO in the neuropathogenesis of BoHV-5 by means of inhibiting nitric oxide overproduction in the rabbit model.

Material and methods

Experimental design

Two independent experiments were performed to determine whether replication of BoHV-5 in the brain of experimentally infected rabbits was accompanied by increase in NO levels. In Experiment 1, five rabbits were inoculated intranasally with the virus and other five served as mock-infected controls (inoculated with minimal essential medium [MEM]). The inoculated rabbits were monitored clinically on a daily basis and submitted to euthanasia approximately 12 h after the onset of neurological signs (between days 8 and 10 post infection [p.i.]). Brain regions obtained from sick (inoculated) and healthy (control) rabbits were collected for quantitation of NO products (NOx), virus isolation and quantitation, immunohistochemistry (IHC) for viral antigens and iNOS, and for histopathological examination. In Experiment 2, five groups of four rabbits were inoculated with the virus and together with five groups of controls (four mock-infected rabbits) were submitted to euthanasia for tissue collection and examination at days 2, 3, 4, 5, and 6 p.i. This experiment was conducted to determine whether the increase in

nitric oxide levels occurred before or after the onset of neurological signs.

Cells and virus

Virus amplification, quantitation, and isolation from tissues were performed in CRIB cells (Flores and Donis, 1995), derived from Madin-Darby bovine kidney cells (American Type Culture Collection, CCL-22). Cells were routinely maintained in minimal essential medium (MEM; Cultilab, Campinas, São Paulo, Brazil) containing penicillin (1.6 mg/L), streptomycin (0.4 mg/L), nistatin (0.02 mg/L), and 5% fetal calf serum (Cultilab). The BoHV-5 SV-507/99 strain was isolated from an outbreak of meningoencephalitis in southern Brazil, submitted to nucleotide sequencing of the entire genome (Delhon *et al*, 2003), and its biological properties have been extensively characterized (Vogel *et al*, 2003; Diel *et al*, 2005).

Animals, virus inoculation, monitoring, and sampling

Thirty-day-old, weanling New Zealand rabbits were used throughout the experiments. The rabbits were inoculated by the intranasal route with 1 ml of a viral suspension containing approximately $10^{7.5}$ TCID₅₀ (50% tissue culture infectious dose) of SV-507/99, or received 1 ml of MEM (control groups) by the same route. Previously to virus or MEM administration, the animals were anesthetized with Zoletil 50, 200 µL SC (Virbac do Brasil Ind. E Com. LTDA, São Paulo, SP, Brazil). After virus inoculation, the rabbits were monitored clinically on a daily basis. Virus replication was monitored by submitting nasal swabs to viral isolation in CRIB cells. For tissue collection, animals were submitted to euthanasia after ventilation with halothane and oxygen. Different sections of the brain (Figure 4) were collected for quantification of degradation products of NO, virus isolation (stored at -70°C until testing), IHC (fixed in methacarn), and histopathology. All procedures during the animal experiments were conducted under veterinary supervision and according to COBEA's recommendations (Brazilian Committee on Animal Experimentation). The animal experiments were approved by the Institutional Committee on

Ethics in Research (approval 23081.012136/2007-90, August, 27th, 2007).

Virus isolation and quantitation

Nasal secretions collected on a daily basis were submitted to virus isolation in CRIB cells according to standard protocols. The material was considered negative for virus after three passages of five days each without the appearance of cytopathic effect (CPE). For virus isolation from brain regions, a 1:10 (w/v) tissues homogenates were prepared, centrifuged, and the supernatant was inoculated onto CRIB cells and monitored as described above. The infectivity of positive tissues was subsequently quantitated by limiting dilution in CRIB cells and the virus titers were calculated according to Reed and Muench (1938) and expressed as log₁₀ TCID₅₀/g of tissue. Samples positive only in the second or third passages were considered to harbor a titer of $<10^{2.87}$ TCID₅₀/g.

Assay of NO_x as a marker of NO levels

As NO is unstable in the environment, NO levels are generally quantified by spectrophotometry, measuring nitrite (NO₂) and nitrate (NO₃), the stable products of NO degradation. In this study, NO₂ and NO₃ levels (NO_x) were colorimetrically determined according to a protocol described by Miranda *et al* (2001). All assays for NO_x and protein determination were performed immediately after euthanasia and removal of the brain. A piece of 50 to 100 mg of each brain region (Figure 4) was homogenized in zinc sulphate and acetonitrile, centrifuged at 1600 x g for 30 min at 4°C, and the supernatant was collected for analysis in triplicate. Briefly, 200 µl of supernatants was added to tubes containing 200 µl of sulfanilamide (2%), 200 µl of N-(1 naphthyl)-ethylene diamine diHCl (NEDD) (0.1%), and 400 µl of vanadium chloride 2%. After incubation under agitation at 37°C for 1 h, colorimetric changes were evaluated spectrophotometrically at 540 nm wavelength.

Serial dilutions of NO₂ 100 mM were tested in triplicate for calculation of the mean

correction factor (MCF1). The mean of the three spectrophotometry values for each tissue was corrected by MCF1 and converted to nanomoles (nmol) of nitric oxide products, according to Miranda *et al* (2001).

Protein determination

The protein content of each brain region submitted to determination of NO_x levels was measured colorimetrically by the method described by Bradford (1976). Each sample was tested in duplicate and the absorbance was measured in 595 nm wavelength. Dilutions of bovine serum albumin at 1 mg/ml were tested in triplicate for mean correction factor (MCF2) calculation. Colorimetric values of the brain regions were then corrected by standard albumin MCF2, by the dilution of the samples (x20), by the volume - to the same used in NO_x measure - (x4). The result represents the amount of protein in each section, in milligrams.

The NO_x content of each brain region was divided by the protein content of its respective pellet, resulting in the amount of NO_x in nanomoles of NO_x per milligram of protein (nmol NO_x/mg protein).

Data analysis

The data obtained by quantitation of NO products (nmol NO_x/mg of protein) were submitted to analysis of variance, comparing the means of controls with the means of infected animals, for each particular section (Experiments 1 and 2), and for each day (Experiment 2). Two-way analysis of variance (ANOVA) was carried out using SPSS (SPSS, Chicago, IL, USA). Post hoc analysis was carried out by the Duncan test when appropriate. $P < .05$ was considered significant.

Immunohistochemistry (IHC) and histological examination

Brain regions of rabbits collected after euthanasia (Figure 4) were fixed in methacarn for 12 to 16 h, embedded in paraffin and sectioned at 5 mm. Two consecutive sections of each brain

region were submitted to IHC to detect BoHV-5 antigens and iNOS expression, respectively. IHC was performed essentially as described by Oldoni *et al* (2004), using the monoclonal antibody 2F9 specific for BoHV-5 glycoprotein C (2F9; 1:500); or with the polyclonal antibody NOS2 C-19sc649 for iNOS (NOS2; 1:100), from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). The presence of viral antigens was revealed by using a streptavidin-biotin-peroxidase kit (LSAB Plus, Dako, Glostrup, Denmark), followed by addition of the substrate diaminobenzidine (Sigma, St. Louis, MO, USA). Finally, the sections were stained with hematoxylin, dehydrated, and mounted for microscopic examination.

For histological examination, slides containing one section (5 mm) of each brain region were stained with hematoxylin and eosin (H&E).

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

- Akaike T, Maeda H (2000). Nitric oxide and virus infection. *Immunol.*, **101**: 300-308.
- Bagetta G, Paoletti AM, Leta A, Del Duca C, Nisticò R, Rotiroti D, Corasaniti MT (2002). Abnormal expression of neuronal nitric oxide synthase triggers limbic seizures and hippocampal damage in rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2**: 291, 255-260.
- Bogdan, C (1998). The Multiplex Function of Nitric Oxide in (Auto) immunity. *J. Exp. Med.*, **187**: 9, 1361-1365.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **7**: 72, 248-254.

- Carrilo BJ, Pospischil A, Dahme E (1983). Pathology of a bovine viral necrozing encephalitis in Argentina. *Zbl. Vet. Med. B*, **30**: 3, 161-168.
- Cerqueira NF, Yoshida WB (2002). Óxido nítrico: revisão. *Acta Cir. Bras.* **17**: 6, 417-423.
- Chesler DA, Reiss CS (2002). The role of IFN γ in immune responses to viral infections of the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **12**: 441-454.
- Chowdhury SI, Lee BJ, Mosier D, Sur JH, Osório FA, Kennedy G, Weiss ML (1997). Neuropathology of bovine herpesvirus 5 (BHV-5) meningo-encephalitis in a rabbit seizure model. *J. Comp. Pathol.*, **117**: 295-310.
- Delhon G, Moraes MP, Lu Z, Afonso CL, Flores EF, Weiblen R, Kutish GF, Rock DL (2003). Genome of bovine herpesvirus 5. *J. Virol.* **77**: 19, 10339-10347.
- Diel DG, Fonseca ET, Souza SF, Mazzanti A, Bauermann FV, Weiblen R, Flores EF (2005). Bovine herpesvirus 5 may use the olfactory and trigeminal pathways to invade the central nervous system of rabbits, depending upon the route of inoculation. *Braz. J. Vet. Res.*, **25**: 3, 164-170.
- Flores EF, Donis RO (1995). Isolation and characterization of a bovine cell line resistant to infection with the pestivirus bovine viral diarrhea virus (BVDV). *Virology*, **208**: 565-575.
- Fuji S, Akaike T, Maeda H (1999). Role of nitric oxide in pathogenesis of herpes simplex virus encephalitis in rats. *Virology*, **256**: 203-212.
- Goody, RJ, Schittone, SA, Tyler, KL (2005). Reovirus infection of the CNS enhances iNOS expression in areas of virus induced injury. *Exp. Neurol.*, **195**: 379-390.
- Harris N, Buller RML, Karupiah G (1995). Gamma interferon-induced, nitric oxide-mediated inhibition of vaccinia virus replication. *J. Virol.* **69**: 910-915.
- Hooper DC, Kean RB, Scott GS, Spitsin SV, Mikheeva T, Morimoto K, Bette M, Röhrenbeck AM, Dietzschold B, Weihe E (2001). The central nervous system inflammatory response to

- neurotropic virus infection is peroxynitrite dependent. *J. Immunol.*, **167**: 3470-3477.
- Kahrs RF (2001). Infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis. In: *Viral diseases of cattle*. Kahrs, R.F. (ed). 2th edn, Ames, Iowa: Iowa State University, pp. 159-170.
- Karupiah G, Harris, N (1995). Inhibition of viral replication by nitric oxide and its reversal by ferrous sulfate and tricarboxylic acid cycle metabolites. *J. Exp. Med.* **181**: 2171–2179.
- Kiechele FL, Malinski T (1993). Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology and detection. *Am. J. Clin. Pathol.*, **100**: 567-575.
- Kodukula P, Liu T, Van Rooijen N, Jager MJ, Hendricks RL (1999). Macrophage control of herpes simplex virus type 1 replication in the peripheral nervous system. *J. Immunol.* **162**: 2895–2905.
- Koprowsky H, Zheng YM, Heber-Katz E, Fraser N, Rorke L, Fu ZF, Hanlon C, Dietzschold B. (1993). In vivo expression of inducible nitric oxide synthase in experimentally induced neurologic diseases. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **90**: 3024-3027.
- Marcaccini A, López-Penã M, Bermudez R, Quiroga MI, Guerrero FH, Nieto JM, Alemañ N. (2007). Pseudorabies virus induces a rapid up-regulation of nitric oxide synthases in the nervous system of swine. *Vet. Microbiol.* **125**: 3-4, 232-243.
- Marques CP, Hu S, Sheng W, Lokensgard JR. (2006). Microglial cells initiate vigorous yet non-protective immune responses during HSV-1 brain infection. *Virus Research*, **121**: 1, 1-10.
- Marques CP, Cheeran MC, Palmquist JM, Hu S, Lokensgard JR. (2008). Microglia are the major cellular source of inducible nitric oxide synthase during experimental herpes encephalitis. *Journal of Neurovirology*, **14**: 3, 229-238.
- Meyer G, Lemaire M, Lyaku J (1996). Establishment of a rabbit model for bovine herpesvirus type 5 neurological acute infection. *Vet. Microbiol.* **5**: 27-40.

- Minc-Golomb D, Tsafaty I, Schwartz JP, (1994). Expression of inducible nitric oxide synthase by neurons following exposure to endotoxin and cytokine. *Braz. J. Pharmacol.* **112**: 720–722.
- Minc-Golomb D, Yalid G, Tsarfaty H, Resau JH, Schwartz JP (1996). In vivo expression of inducible nitric oxide synthase in cerebellar neurons. *J. Neurochem.* **66**: 1504–1509.
- Miranda KM, Espey MG, Wink DA (2001). A rapid, simple spectrophotometric method for detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* **5**: 62-71.
- Moro MA, De Alba J, Leza JC, Lorenzo P, Fernandez AP, Bentura ML, Bosca L, Rodrigo J, Lizasoain, I (1998). Neuronal expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *Eur. J. Neurosci.* **10**: 445–456.
- Oldoni I, Weiblen R, Inkelmann MA, Flores EF (2004). Production and characterization of monoclonal antibodies to a Brazilian bovine herpesvirus type 5 (BHV-5). *Braz. J. Med. Biol. Res.* **37**: 2, 213-221.
- Persichini T, Cantoni O, Suzuki H, Colasanti M (2006). Cross-talk between constitutive and inducible NO synthase: an update. *Antioxid. Redox Signal.* **8**: 5-6, 949-954.
- Reed LJ, Muench HA (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* **27**: 493–497.
- Rissi DR, Oliveira FN, Rech RR, Pierezan F, Lemos RAA, Barros CSL (2006). Epidemiology, clinical signs and distribution of the encephalic lesions in cattle affected by meningoencephalitis caused by bovine herpesvirus-5. *Braz. J. Vet. Res.* **26**: 2, 123-132.
- Royes LFF, Figuera MR, Furian AF, Oliveira MS, Mysklw JC, Fiorenza NG, Mello CF (2005). Involvement of NO in the convulsive behavior and oxidative damage induced by the intrastriatal injection of methylmalonate. *Neurosci. Lett.* **376**: 115-120.
- Saha RN, Pahan K (2006). Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. *Antioxid. Redox Signal.* **8**: 5-6, 929-947.

- Serrano F, Enquist LW, Card JP (2002). Pseudorabies virus-induced expression of nitric oxide synthase isoforms. *Physiol. & Behavior*, **77**: 557-563.
- Silva AM, Flores EF, Weiblen R, Canto MC, Irigoyen LF, Roehe PM, Souza RS (1999). Pathogenesis of meningoencephalitis in rabbits by bovine herpesvirus type-5 (BHV-5). *Rev. Bras. Microbiol.* **30**: 22-31.
- Stewart VC, Heales SJ (2003). Nitric oxide-induced mitochondrial dysfunction: Implications for neurodegeneration, *Free Radic. Biol. Med.* **34**: 287–303.
- Studdert MJ (1989). Bovine encephalitis herpesvirus. *Vet.Rec.* **125**: 584.
- Ubol S, Sukwattanapan C, Maneerat Y (2001). Inducible nitric oxide synthase inhibition delays death of rabies virus-infected mice. *J. Med. Microbiol.* **50**: 238-242.
- Vezzani A (2005). Inflammation and Epilepsy. *Epilepsy Curr.* **1**: 5, 1-6.
- Vogel FSF, Caron L, Flores EF, Weiblen R, Winkelmann ER, Mayer SV, Bastos RG (2003). Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 10, 4512-4520.
- Weiblen R, Barros CS, Canabarro TF, Flores IE (1989). Bovine meningoencephalitis from IBR virus. *Vet. Rec.* **25**: 124, 666-667.
- Wong GKT, Marsden PA (1996). Nitric oxide synthases: regulation in disease. *Nefrol. Dial. Transplant.* **11**: 215-220.
- Zaki MH, Akuta T, Akaike T. (2005). Nitric oxide-induced oxidative stress involved in microbial pathogenesis. *J. Pharmacol. Sci.* **98**: 2, 117-129.

Table 1. Infectivity in different areas of the brain of rabbits inoculated intranasally with bovine herpesvirus 5 and euthanized approximately 12 h after the onset of neurological signs, between days 8 and 10 p.i. (Experiment # 1).

| Rabbit # | Brain region | | | | |
|----------|-----------------|-----|---------|-------|------------------|
| | OB/OC* | AC | DLC/VLC | HI/PC | Th |
| 1 | ++ [†] | +++ | ++ | ++ | + |
| 2 | + | ++ | ++ | + | (+) [‡] |
| 3 | ++ | ++ | +++ | +++ | (+) |
| 4 | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 5 | ++ | ++ | + | (+) | ++ |

*OB/OC: olfactory bulb/olfactory cortex; AC: anterior cortex; DLC/VLC parietal and ventrolateral cortices; HI/CP: hippocampus and posterior cortex; Th: thalamus.

[†] +: virus titer $<10^{3.97}$ TCID₅₀/g; ++: virus titer between 10^4 and 10^5 TCID₅₀/g; +++: virus titer between 10^5 and 10^6 TCID₅₀/g.

[‡] (+) virus detected only in the second passage in cultured cells.

Table 2. Clinical signs and histological findings in the brain of rabbits inoculated intranasally with bovine herpesvirus 5 and euthanized approximately 12 h after the onset of neurological signs (Experiment # 1).

| Rabbit # | Clinical signs | Euthanasia (day) | Histopathology |
|----------------|--|------------------|--|
| 1 | Depression, nasal discharge, opisthotonus, bruxism, seizures. | 8p.i.† | OB/OC*: mild endothelial swelling, mild perivascular cuffing; AC: edema, neuronal necrosis; DLC/VLC and HI/CP: none; Th: neuronal necrosis. |
| 2 | Depression, nasal discharge, circling, seizures. | 8p.i. | None. |
| 3 | Depression, nasal discharge, bruxism. | 8p.i. | OB/OC, AC and Th: mild endothelial edema, mild perivascular cuffing; gliosis; OB/OC: some necrotic neurons; DLC/VLC: none. |
| 4 | Profound depression, nasal discharge. | 10p.i. | OB/OC, AC, DLC/VLC, HI/PC, Th: mild endothelial swelling, perivascular cuffing, focal and diffuse gliosis; HI/PC: edema. |
| 5 | Depression, nasal discharge, ataxia, incoordination, seizures. | 10p.i. | OC: neuronal necrosis; OB, AC, DLC/VLC, HI/PC and Th: none. |
| Controls (n=5) | None. | 10p.i. | None. |

*OB/OC: olfactory bulb/olfactory cortex; AC: anterior cortex; DLC/VLC parietal and ventrolateral cortices; HI/CP: hippocampus and posterior cortex; Th: thalamus.

† p.i.: post-infection.

Table 3. Infectivity in different areas of the brain of rabbits inoculated intranasally with bovine herpesvirus 5 and euthanized at different intervals after virus inoculation (Experiment # 2).

| Euthanasia | Rabbit # | Brain region | | | |
|--------------|----------|--------------|-----|---------|-------|
| | | OB/OC* | AC | DLC/VLC | HI/PC |
| Day 2 p.i. † | 6 – 9 | - | - | - | - |
| Day 3 p.i. | 10 | -‡ | - | - | - |
| | 11 | - | - | - | - |
| | 12 | (+)§ | (+) | - | - |
| | 13 | (+) | - | - | - |
| Day 4 p.i. | 14 | - | - | - | - |
| | 15 | - | - | - | - |
| | 16 | + | ++ | ++ | - |
| | 17 | + | + | - | - |
| Day 5 p.i. | 18 | ++ | (+) | - | - |
| | 19 | ++ | ++ | - | - |
| | 20 | ++ | + | ++ | + |
| | 21 | + | + | ++ | - |
| Day 6 p.i. | 22 | ++ | (+) | - | - |
| | 23 | (+) | + | - | - |
| | 24 | ++ | ++ | ++ | + |
| | 25 | ++ | ++ | + | (+) |
| Controls | 26-50 | - | - | - | - |

* OB/OC: olfactory bulb/olfactory cortex; AC: anterior cortex; DLC/VLC parietal and ventrolateral cortices; HI/CP: hippocampus and posterior cortex.

† p.i.: post-infection.

‡ Considered negative after three passages in cell culture. Virus has not been detected in any of the thalamus (not shown).

§(+) virus detected only in the second passage of the material in cultured cells; +: virus titer $<10^{3.97}$ TCID₅₀/g; ++: virus titer between 10^4 and 10^5 TCID₅₀/g.

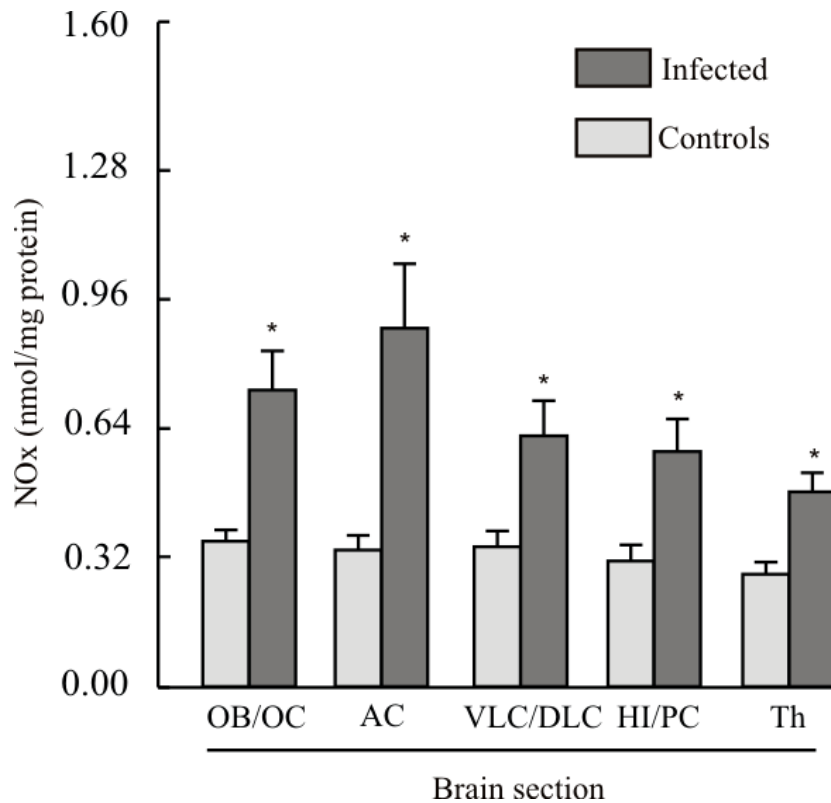


Figure 1. Nitric oxide (NOx) levels in brain regions of rabbits with neurological disease associated with bovine herpesvirus 5 infection. *statisticaly significant $F(4, 40) = 3.33$; $P < 0.02$. OB/OC: olfactory bulb and cortex; AC: anterior cortex; DLC/VLC: parietal and ventrolateral cortices; HI/PC: hippocampus and posterior cortex; Th: thalamus. The bars represent the mean of NOx levels in the respective brain regions of the groups, composed by five animals each.

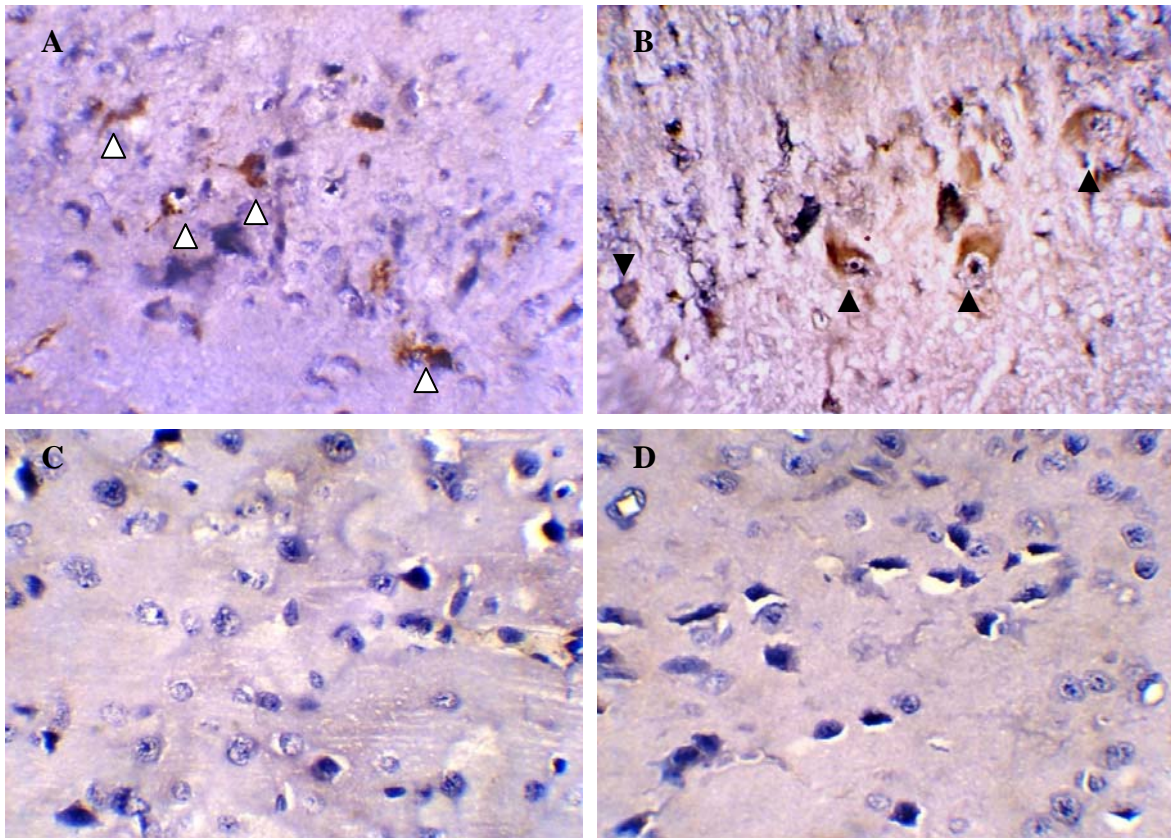


Figure 2. Immunohistochemistry for bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) antigens and iNOS in sequential sections of the brain of rabbits with neurological disease associated with BoHV-5 infection. A) Anterior cortex of rabbit # 1: BoHV-5 antigens in cells with neuronal morphology (Δ); B) Olfactory bulb of rabbit # 5: iNOS reactivity in cells with astrocyte morphology (\blacktriangledown) and neuronal morphology (\blacktriangle); C) Anterior cortex of a control rabbit stained for BoHV-5 antigens and D) For iNOS.

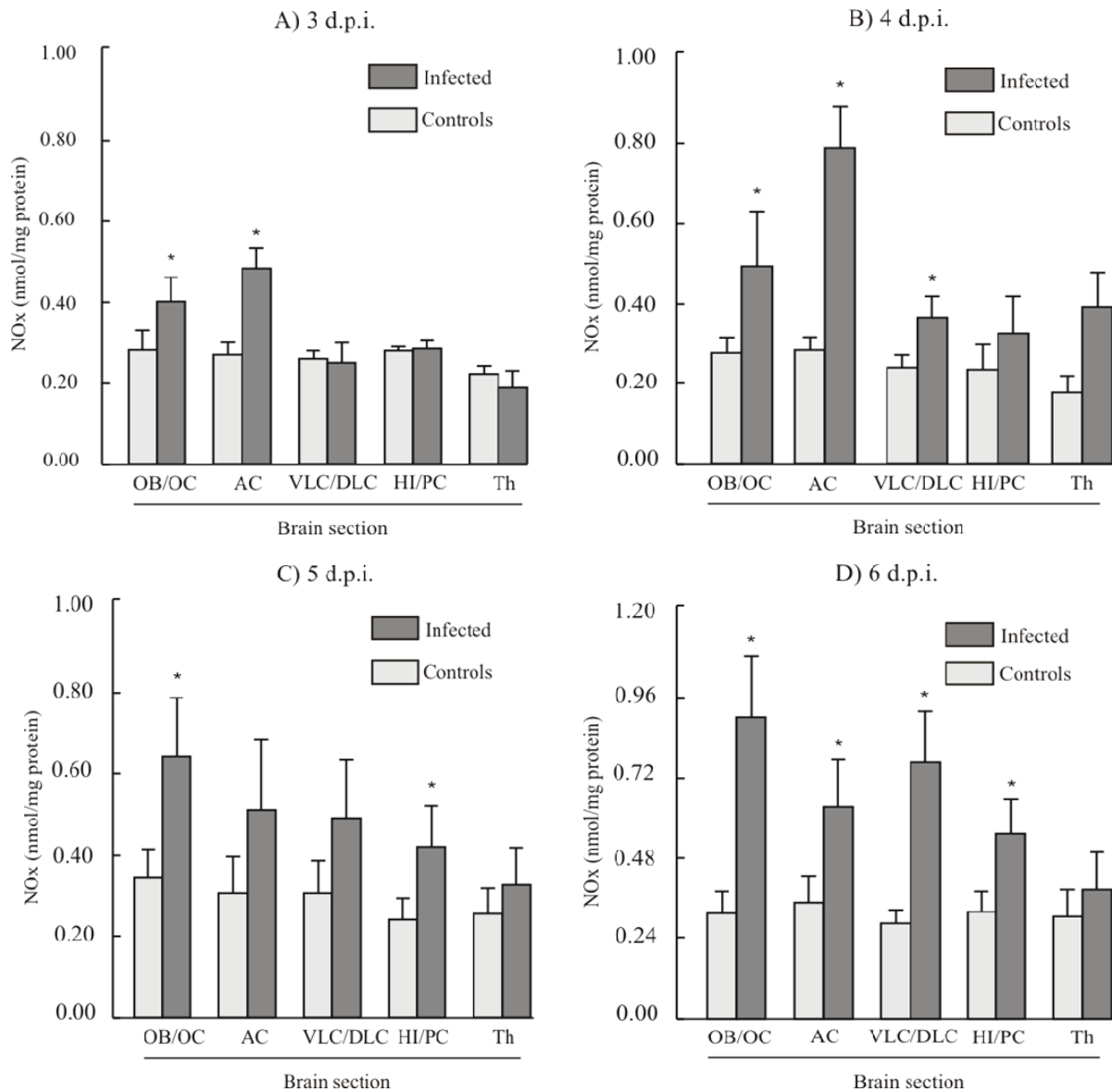


Figure 3. Nitric oxide (NOx) levels in brain regions of rabbits at different time points after intranasal inoculation of bovine herpesvirus 5. D.p.i.: day post-infection. OB/OC: olfactory bulb and cortex; AC: anterior cortex; DLC/VLC: parietal and ventrolateral cortices; HI/PC: hippocampus and posterior cortex; Th: thalamus. * statistically significant $F(12, 128) = 2.82$; $P < 0.003$. The bars represent the means of NOx measurements in the respective brain region of each group. The groups were composed by four infected and four mock-infected rabbits.

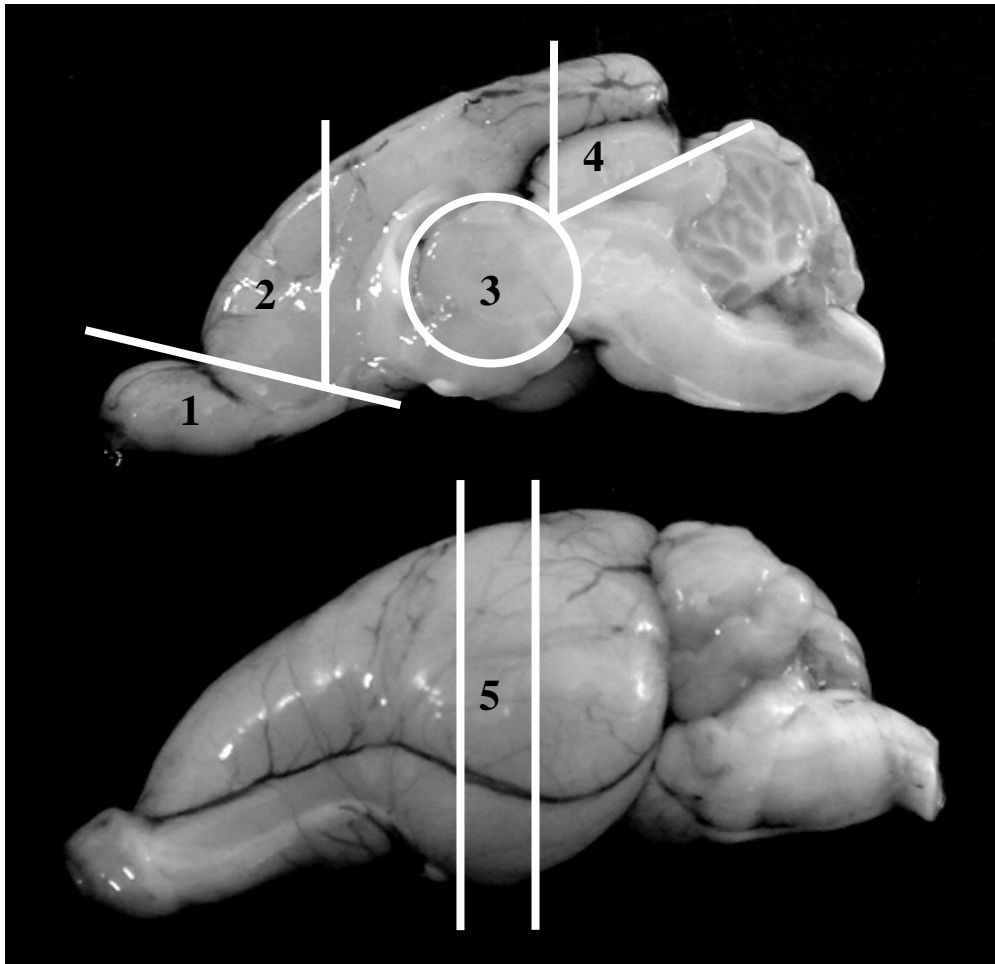


Figure 4. Sections of the brain of rabbits used for nitric oxide quantitation, bovine herpesvirus 5 isolation and immunohistochemistry for viral antigens and iNOS. 1) Olfactory bulb and cortex; 2) Anterior cortex; 3) Thalamus; 4) Hippocampus and posterior cortex and 5) Parietal and ventrolateral cortices. The top image represents a mediolateral view of a cross section, and the bottom shows a lateromedial view.

4. CAPÍTULO 3

Atividade do Aciclovir, Ganciclovir e Foscarnet frente aos herpesvírus bovino tipos 1, 2 e 5 em células de cultivo

Activity of Acyclovir, Gancyclovir and Foscarnet against bovine herpesviruses 1, 2 and 5 in culture cells

Renata Dezengrini^I, Sara Campos da Silva^I, Marcelo Weiss^{I,II}, Rudi Weiblen^{IV}, Eduardo Furtado
Flores^{IV*}

(artigo a ser submetido ao periódico *Ciência Rural*)

^I Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

^{II} Endereço atual: Plum Island Animal Disease Center (PIADC), United States Department of Agriculture (USDA), Orient Point, NY, EUA.

^{III} Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciência Rurais (CCR), Setor de Virologia (SV), UFSM, Santa Maria, 97105-900, RS, Brasil. E-mail: eduardofurtadoflores@gmail.com, Fone/fax: 55-32208034. * Autor para correspondência.

RESUMO

A atividade de três fármacos antivirais (Aciclovir [ACV], Ganciclovir [GCV] e Foscarnet [PFA]) foi testada *in vitro* frente aos herpesvírus bovino tipos 1 (BoHV-1), 2 (BoHV-2) e 5 (BoHV-5). Para isso, utilizou-se o teste de redução de placas virais em cultivo celular, testando-se diferentes concentrações dos fármacos frente a 100 doses infectantes para 50% dos cultivos celulares (DICC₅₀) dos respectivos vírus. Pelo teste de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), verificou-se que concentrações inferiores a 200 µg.mL⁻¹ dos três antivirais resultaram em índices de viabilidade de células MDBK e Hep2 superiores a 80%. Com base na concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀) e na concentração dos fármacos efetiva para inibir em 50% a replicação viral (EC₅₀), calculou-se o índice de seletividade (IS) dos antivirais para os três herpesvírus. O ACV foi moderadamente ativo frente ao BoHV-1 (EC₅₀: 112,9 µg.mL⁻¹ e IS: 4,5), ao BoHV-2 (EC₅₀: 114,2 µg.mL⁻¹ e IS: 4,5) e BoHV-5 (EC₅₀: 96,9 µg.mL⁻¹ e IS: 5,3). O GCV apresentou atividade moderada frente ao BoHV-2 (EC₅₀: 33,5 µg.mL⁻¹ e IS: 16,6) e, em menor grau, contra o BoHV-5 (EC₅₀: 123,2 µg.mL⁻¹ e IS: 4,5), sendo ineficaz frente ao BoHV-1 (EC₅₀: 335,8 µg.mL⁻¹ e IS: 1,7). O PFA apresentou atividade antiviral mais pronunciada, sendo o único fármaco que, na concentração de 100 µg.mL⁻¹, inibiu completamente a produção de placas pelos três vírus testados. O PFA foi o mais efetivo *in vitro* frente ao BoHV-1 (EC₅₀: 29,5 µg.mL⁻¹ e IS: 42,2), ao BoHV-2 (EC₅₀: 45,2 µg.mL⁻¹ e IS: 27,6) e ao BoHV-5 (EC₅₀: 7,8 µg.mL⁻¹ e IS: 160,6). Portanto, o PFA é um candidato para testes de terapia experimental de infecções pelos herpesvírus de bovinos *in vivo*.

Palavras-chave: antivirais, BoHV-1, BoHV-2, BoHV-5, Foscarnet, Ganciclovir, Aciclovir.

ABSTRACT

The activity of three anti-herpetic drugs (Acyclovir [ACV], Gancyclovir [GCV] and Foscarnet [PFA]) was tested against bovine herpesvirus 1 (BoHV-1), 2 (BoHV-2) and 5 (BoHV-5) *in vitro*. To this, we used the plaque reduction assay, testing different drug concentrations against 100 50% tissue infectious dose (TCID₅₀) of the respective viruses. We verified that drug concentrations lower than 200 µg.mL⁻¹ resulted in viability rates of more than 80% for MDBK and Hep2 cells in the MTT test (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). The selectivity index (IS) of the drugs was calculated by the concentration of the drug that is cytotoxic for 50% of the cells (CC₅₀) divided by the concentration of the antivirals effective in the inhibition of 50% of the viral replication (EC₅₀) for the three herpesviruses. ACV was moderately active against BoHV-1 (EC₅₀: 112.9 µg.mL⁻¹; IS: 4.5), BoHV-2 (EC₅₀: 114.2 µg.mL⁻¹; IS: 4.5) and BoHV-5 (EC₅₀: 96.9 µg.mL⁻¹; IS: 5.3). GCV was effective against BoHV-2 (EC₅₀: 33.5 µg.mL⁻¹; IS: 16.6), moderately effective against BoHV-5 (EC₅₀: 123.2 µg.mL⁻¹; IS: 4.5) and poorly active against BoHV-1 (EC₅₀: 335.8 µg.mL⁻¹; IS: 1.7). PFA exhibited the highest antiviral activity, being the only drug that, at concentration of 100 µg.mL⁻¹, completely inhibited plaque formation by all three viruses. PFA was the most effective *in vitro* against BoHV-1 (EC₅₀: 29.5 µg.mL⁻¹; IS: 42.2), BoHV-2 (EC₅₀: 45.2 µg.mL⁻¹; IS: 27.6) and BoHV-5 (EC₅₀: 7.8 µg.mL⁻¹; IS: 160.6). Thus, we conclude that PFA is a promising drug candidate for experimental therapeutic testing *in vivo* against bovine herpesviruses.

Key words: antiviral, BoHV-1, BoHV-2, BoHV-5, Foscarnet, Gancyclovir, Acyclovir.

INTRODUÇÃO

Os herpesvírus bovino tipos 1 (BoHV-1), 2 (BoHV-2) e 5 (BoHV-5) são vírus DNA de cadeia dupla linear, que possuem um capsídeo de simetria icosaédrica e envelope lipoprotéico, classificados na família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*. Esses vírus estabelecem

e reativam infecções latentes em seus hospedeiros, capacidade que permite a sua manutenção na natureza (ROCK et al., 1992; ROIZMAN, 1992). O BoHV-1 e 5 pertencem ao gênero *Varicellovirus*, e o BoHV-2 é classificado no gênero *Simplexvirus* (ROIZMAN, 1992). O BoHV-1 é associado com doença respiratória (rinotraqueíte infecciosa bovina, IBR), conjuntivite, vulvovaginite/balanopostite pustular infecciosa (IPV/IBP), infertilidade transitória e abortos (ROIZMAN, 1992; KAHRS, 2001). O BoHV-2 é associado à mamilita herpética bovina (BHM), doença vesicular e erosiva do úbere e tetos, que acomete vacas leiteiras com frequência (KAHRS, 2001). O BoHV-5 é o agente da meningoencefalite herpética, doença geralmente fatal em bovinos jovens e que ocorre com frequência na Argentina e no Brasil (CARRILLO et al., 1983; RISSI et al., 2006).

Historicamente, os herpesvírus humanos têm sido alvo para o desenvolvimento e teste de fármacos antivirais. O Aciclovir (ACV) e o Ganciclovir (GCV) são análogos de nucleosídeos, consistindo de uma guanina associada a uma molécula semelhante a um açúcar acíclico (COEN & RICHMAN, 2007). Ambos são fosforilados por quinases virais a monofosfato (timidina quinase – TK - e a fosfotransferase UL97, respectivamente), e em seguida, por quinases celulares a trifosfato (COEN & RICHMAN, 2007). A ação desses antivirais é mediada pela sua incorporação na cadeia nascente de DNA viral, impedindo que a DNA polimerase dos herpesvírus complete seu ciclo catalítico (WHITLEY & ROIZMAN, 2001; COEN & RICHMAN, 2007). O Foscarnet (PFA) é um análogo sintético do pirofosfato, incorporado na cadeia de DNA pela polimerase, e também impede que essa enzima complete seu ciclo catalítico (ERIKSSON et al., 1982; COEN & RICHMAN, 2007).

Estudos de atividade antiviral com herpesvírus de animais têm sido ocasionalmente conduzidos (SCHWERS et al., 1980; THIRY et al., 1983; MAGGS & CLARKE, 2004; MARLEY et al., 2006; MEULEN et al., 2006; GARRÉ et al., 2007). Assim, foi demonstrado que

o ACV é pouco ativo frente ao BoHV-1 (THIRY et al., 1983) e ao herpesvírus felino 1 – FeHV-1 (MAGGS & CLARKE, 2004; MEULEN et al., 2006). Foi demonstrado também que o ACV é 10 vezes menos efetivo do que o GCV frente ao herpesvírus equino 1 (EqHV-1) *in vitro* (GARRÉ et al., 2007). Outros estudos demonstraram que o GCV inibe a replicação do FeHV-1 em células de linhagem felina (MAGGS & CLARKE, 2004; MEULEN et al., 2006). A eficácia deste antiviral *in vitro* frente ao FeHV-1, juntamente com a Idoxuridina, foi superior à de outros quatro fármacos (MAGGS & CLARKE, 2004). Dentre seis antivirais testados frente ao EqHV-1, o GCV foi o mais ativo *in vitro*, sendo considerado o fármaco de escolha para testes de eficácia em equinos (GARRÉ et al., 2007).

GARRÉ et al. (2007) observaram que a redução do número de placas produzidas pelo EqHV-1 *in vitro* pelo PFA varia de acordo com a cepa ou isolado. Esse antiviral foi ainda associado com redução do número e tamanho de placas produzidas pelo BoHV-1 *in vitro*, sugerindo-se que o fármaco possa ser utilizado *in vivo* (SCHWERS et al., 1980). A atividade do PFA contra o BoHV-1 também foi testada em embriões bovinos *in vitro*, nos quais inibiu a replicação viral na concentração de 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (MARLEY et al., 2006).

A importância de se testar antivirais inicialmente pelo teste de redução no número de placas virais reside no fato de se selecionar os fármacos que inibem a replicação viral *in vitro* para então testá-los *in vivo*. Testes *in vivo* contra o BoHV-1 não foram conduzidos com o ACV, após a verificação da baixa eficiência *in vitro* do ACV contra esse vírus (THIRY et al., 1983). Da mesma forma, não existem estudos publicados de testes com antivirais comerciais, como o GCV e o PFA, *in vivo* com os herpesvírus de bovinos.

A terapia antiviral é uma prática comum em humanos, porém pouco relatada em infecções por herpesvírus em animais. A maioria dos estudos, conduzidos *in vitro*, investigam a eficiência de antivirais comerciais frente ao FeHV-1 (MAGGS & CLARKE, 2004; MEULEN et al., 2006;

HUSSEIN et al., 2008a) e com menor frequência frente ao BoHV-1 (SCHWERS et al., 1980; THIRY et al., 1983, MARLEY et al., 2006). Apesar de alguns estudos demonstrarem atividade antiviral de fármacos de uso humano contra herpesvírus bovino *in vitro*, pouco se sabe sobre a eficácia de antivirais frente a esses vírus, não existindo formulações disponíveis para tratamento de infecções herpéticas nesta espécie. Provavelmente, isso se deve ao custo elevado do tratamento, principalmente para grandes animais. Neste sentido, coelhos têm sido utilizados como modelo para estudos de patogenia do BoHV-1 e BoHV-5 (FLORES et al., 2009) e cobaias para estudos com o BoHV-2 (TORRES et al., *in press*). Para estas espécies, existe a possibilidade de se realizar estudos com antivirais, associados ou não a outros fármacos. Assim, o conhecimento acerca da atividade *in vitro* de antivirais contra esses agentes pode permitir a realização de estudos de patogenia e terapêutica adicionais frente ao BoHV-1, BoHV-2 e BoHV-5, bem como para o tratamento de animais de alto valor zootécnico (DEZENGRINI et al., 2009; FLORES et al., 2009). Por esta razão, inicialmente testou-se *in vitro* a atividade de três antivirais utilizados para o tratamento de infecções herpéticas humanas, o ACV, GCV e PFA frente ao BoHV-1, BoHV-2 e BoHV-5 em células de cultivo.

MATERIAL E MÉTODOS

A atividade *in vitro* do Aciclovir (ACV), Ganciclovir (GCV) e Foscarnet (PFA) foi testada frente ao BoHV-1, BoHV-2 e BoHV-5 em células de cultivo, pelo teste de redução do número de placas. Inicialmente, investigou-se a toxicidade de doses crescentes desses fármacos para células MDBK e Hep-2, com o objetivo de selecionar doses que representassem atividade antiviral específica dos fármacos nos testes de redução do número de placas.

Células e vírus

Células de linhagem de rim bovino MDBK (ATCC, CCL-22) e da linhagem Hep-2

(ATCC, CCL-23), cultivadas em meio essencial mínimo (MEM)^a e suplementadas com 5% de soro equino (SE) ou soro fetal bovino (SFB)^b, respectivamente, 100 U.mL⁻¹ de penicilina e 100 µg.mL⁻¹ de estreptomicina^c foram utilizadas para amplificação e quantificação dos vírus, ensaios de placa e testes de citotoxicidade. As cepas de BoHV-5 SV-507/99 (DELHON et al., 2003), BoHV-2 (cedida pelo Dr. Fernando Osório, University of Nebraska, Lincoln, Nebraska, EUA), e BoHV-1 SV-56/90 (WEIBLEN et al., 1992) foram testadas quanto a sua sensibilidade *in vitro* aos três fármacos. A cepa Singer do BVDV (Dr. Ruben Donis, University of Nebraska, Lincoln, Nebraska, EUA) e a cepa KOS do HSV-1 (Dr. Paulo Michel Roehe, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil) foram utilizadas como controles negativos e positivos, respectivamente, da sensibilidade viral aos fármacos.

Fármacos

Três fármacos antivirais comerciais indicados para o tratamento de infecções por herpesvírus humanos foram selecionados para os testes *in vitro*: o ACV^d (peso molecular – PM - 225), GCV^e (PM 255.2) e PFA^f (PM 300.1). Os fármacos foram diluídos na concentração de 1mg.mL⁻¹ em solução salina (ACV); solução salina com 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) (GCV), ou em água ultrapura (PFA) imediatamente antes do uso.

Teste de viabilidade celular

O teste de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) foi utilizado para investigar a toxicidade dos três antivirais para as células de cultivo. Células MDBK ou Hep-2 (1,6 x 10⁵ células/cavidade de placas de poliestireno com 96 cavidades) foram incubadas por 24 h a 37°C em estufa de CO₂ a 5% com diluições seriadas dos três antivirais (1, 10, 100, 200 e 500 µg.mL⁻¹), ou mantidas como controles, em triplicata, e submetidas ao teste de MTT adaptado de GARRÉ et al. (2007). Após 24 h de incubação com o fármaco, removeu-se o sobrenadante e adicionou-se 50 µL de MTT (1mg.mL⁻¹ em MEM) por cavidade, e as células e

foram incubadas (MDBK por 2 h e Hep-2 por 4 h) a 37°C em estufa de CO₂ a 5%. Em seguida, removeu-se o MTT e adicionou-se 100 µL DMSO por cavidade, incubando-se por 15 min. a 37°C sob agitação constante. O sobrenadante foi passado para uma nova placa de 96 cavidades e a absorbância (em densidade óptica - OD) foi medida a um comprimento de onda de 550nm em um leitor de ELISA. Foram conduzidos dois testes independentes, e a viabilidade de células foi calculada para cada concentração de antiviral testada pela seguinte fórmula: $\% \text{ células viáveis} = \text{média OD (antiviral)} \times 100 / \text{média OD (controles)}$.

As porcentagens de células viáveis para cada concentração do fármaco foram utilizadas para o cálculo da concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀), por análise de regressão linear. No teste de MTT, considerou-se tóxica a concentração de antiviral em que a viabilidade das células foi inferior a 80%, em comparação com os controles (GARRÉ et al., 2007).

Atividade antiviral in vitro

O teste de redução do número de placas virais (MEULEN et al., 2006; GARRÉ et al., 2007) foi utilizado para investigação da atividade antiviral *in vitro* dos três fármacos frente ao BoHV-1, BoHV-2 e BoHV-5. No teste utilizou-se o HSV-1 e o BVDV Singer como controles positivo e negativo, respectivamente. Para isso, foram utilizadas células MDBK ou Hep 2 (HSV-1) cultivadas em placas de poliestireno de seis cavidades (aproximadamente 2×10^6 células/cavidade). Previamente ao ensaio, três cavidades contendo células receberam 1 mL de MEM com a concentração do antiviral a ser testada (0,1; 1; 10; 25; 75 e 100 µg.mL⁻¹) e três cavidades foram mantidas como controles, e incubadas por 1 h a 37°C em estufa de CO₂ a 5%. Em seguida, o sobrenadante foi removido e os tapetes celulares foram lavados, adicionando-se 1 mL de inóculo contendo aproximadamente 100 DICC₅₀ (doses infectantes para 50% dos cultivos celulares) do respectivo vírus, por cavidade. Após 2 h de adsorção, o inóculo foi removido e os tapetes celulares foram recobertos com 2 mL de MEM contendo 5% de SE ou SFB, 0,95% de

carboximetilcelulose^f e a respectiva concentração de antiviral em $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Após 48 h de incubação a 37°C em estufa de CO₂ a 5%, foi realizada a contagem do número de placas virais nas cavidades, com o auxílio de uma lâmina milimetrada adaptada à superfície inferior da placa. Foram realizados pelo menos dois testes independentes, em triplicata, com cada concentração dos antivirais.

A inibição da replicação viral foi calculada a partir da fórmula: *% inibição da replicação viral* = $1 - (\text{número médio de placas virais nas cavidades com antiviral} / \text{número médio de placas virais nas cavidades sem antiviral}) \times 100$. A concentração de cada fármaco efetiva para inibir em 50% o número de placas virais (EC₅₀) e o índice de seletividade (IS) foram calculados por análise de regressão linear, considerando-se a equação da reta adequada quando o valor de R² foi igual ou superior a 0,9. O IS é a relação entre a CC₅₀ do fármaco (obtido pelo MTT) e a EC₅₀. Este valor é utilizado para estimar a segurança de medicamentos, tanto para a utilização em humanos, quanto para animais e, quanto maior o valor deste (acima de 1), maior a diferença entre a dose de antiviral que reduz em 50% a replicação viral (EC₅₀) e a dose citotóxica (CC₅₀). Portanto maior a segurança do fármaco para uso nas respectivas células (COEN & RICHMAN, 2007).

RESULTADOS

Citotoxicidade dos antivirais para os cultivos celulares

No teste de MTT, verificou-se que todas as concentrações dos três antivirais testadas, exceto a de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, resultaram em viabilidade celular acima de 80% (dados não apresentados). Assim, pôde-se utilizar concentrações de até 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ nos testes com os três fármacos em células MDBK e Hep-2. Os valores de concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀) dos fármacos estão apresentados na tabela 1.

Atividade antiviral in vitro do ACV, GCV e PFA frente aos herpesvírus de bovinos

A concentração de antiviral que inibiu 50% da replicação dos vírus (EC_{50}) e o índice de seletividade (IS) do ACV, GCV e PFA frente à 100 $DICC_{50}$ do BoHV-1, BoHV-2 e BoHV-5 estão apresentados na tabela 1. Esses valores foram calculados a partir das porcentagens de redução do número de placas, que são apresentados na figura 1. O PFA inibiu completamente a formação de placas pelos três vírus testados na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Frente ao HSV-1, todas as concentrações testadas do ACV e GCV, e as concentrações de 75 e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do PFA, inibiram completamente a formação de placas virais, demonstrando a atividade desses fármacos nos testes realizados. Nenhuma das concentrações dos três antivirais testadas inibiu a replicação do BVDV, demonstrando a especificidade da atividade anti-herpética desses fármacos no teste de redução do número de placas (dados não apresentados).

DISCUSSÃO

Dentre os antivirais com eficácia anti-herpética comprovada, foram selecionados três fármacos disponíveis comercialmente, que são utilizados para o tratamento de infecções herpéticas humanas: Aciclovir (ACV), Ganciclovir (GCV) e Foscarnet (PFA). O ACV e GCV são análogos do nucleosídeo guanosina, com atividade citotóxica específica para células infectadas por herpesvírus. A atividade antiviral é dependente da fosforilação por uma enzima quinase viral, a timidina quinase – TK – ou na ausência desta, pela fosfotransferase UL97, seguida de duas fosforilações por quinases celulares. O ACV promove o término da extensão da molécula de DNA viral nascente após a sua incorporação na cadeia, já o GCV é incorporado sem necessariamente interromper a extensão da cadeia (CLERCQ, 2001; COEN & RICHMAN, 2007). O PFA é um análogo do pirofosfato e, ao contrário dos outros dois fármacos, não requer ativação prévia por fatores celulares ou virais, ligando-se no sítio ocupado pelo pirofosfato e impedindo que a polimerase complete o seu ciclo catalítico (NAESENS & CLERCQ, 2001;

COEN & RICHMAN, 2007). Por esta razão, o PFA é utilizado para o tratamento de infecções herpéticas por mutantes na TK, UL97 e/ou DNA polimerase do HSV-1, vírus da varicela zoster (VZV) ou citomegalovírus humano (HCMV) resistentes ao ACV e/ou ao GCV e outros análogos de nucleosídeo (COEN & RICHMAN, 2007).

No teste de redução do número de placas, o ACV apresentou-se pouco a moderadamente ativo (Figura 1), com uma EC_{50} comparativamente elevada e IS baixo para os três herpesvírus testados (Tabela 1). Estes achados são compatíveis aos relatos de atividade *in vitro* do ACV frente a outros herpesvírus animais, como o FeHV-1 e EqHV-1, contra os quais a EC_{50} desse antiviral é 11 e 20 vezes maior que a do GCV, respectivamente (MEULEN et al., 2006; GARRÉ et al., 2007). Estudos anteriores realizados *in vitro* também demonstraram atividade controversa do ACV frente ao BoHV-1, sendo necessárias concentrações elevadas do fármaco para que a atividade antiviral fosse evidenciada (THIRY et al., 1983; GLOTOV et al., 2004).

Enzimas de outros herpesvírus não fosforilam o ACV de forma eficiente como a TK do HSV e VZV (COEN & RICHMAN, 2007), o que poderia explicar a baixa atividade deste antiviral contra os herpesvírus animais. Estudos têm demonstrado que a TK de herpesvírus animais possuem alta similaridade de nucleotídeos com a TK do HSV-1, porém a especificidade por substratos e as propriedades cinéticas dessa enzima frente a fármacos são diferentes entre as espécies de herpesvírus humanos e animais (SOLAROLI et al., 2008). Foi demonstrado ainda que a baixa eficiência do ACV frente ao FeHV-1 é devida à fosforilação pouco eficiente pela TK desse vírus, uma vez que, na presença da TK do HSV-1, a DNA polimerase do FeHV-1 apresenta alta afinidade pelo ACV (HUSSEIN et al., 2008a). Portanto, a baixa ativação do ACV pelo FeHV-1 é atribuída a diferenças da sequência de aminoácidos e estruturais na TK, que resultam na ligação desse fármaco à TK em um sítio diferente para fosforilar o ACV. Quando esses dois resíduos são substituídos na TK do FeHV-1 para mimetizar a ligação do ACV à TK do HSV-1, a

ativação desse antiviral aumenta em 3 vezes (HUSSEIN et al., 2008b).

O GCV foi comparativamente eficaz na redução do número de placas do BoHV-2, apresentando um baixo valor de EC_{50} e elevado IS (Tabela 1). O BoHV-2, dentre os três vírus testados, é o que possui maiores semelhanças com o HSV-1. Contra esse vírus, o GCV também apresentou-se eficaz, inibindo a sua replicação completamente em todas as concentrações testadas (Figura 1). A atividade do GCV frente ao HSV-1 já foi demonstrada anteriormente (DUAN et al., 2008). Porém, foram necessárias concentrações maiores desse fármaco para se observar efeito antiviral frente ao BoHV-5, e frente ao BoHV-1 o GCV foi ineficaz. O GCV é considerado o antiviral de escolha para inibir a replicação ou limitar a disseminação do FeHV-1 *in vitro*, juntamente com o Cidofovir e o PMEDAP; e seguido pelo PMEDAP e ACV para o EqHV-1 (MEULEN et al., 2006; GARRÉ et al., 2007).

O PFA foi o fármaco que apresentou os melhores resultados frente ao BoHV-1, BoHV-2 e BoHV-5, sendo o único que, na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, inibiu completamente a formação de placas pelos três herpesvírus de bovinos testados (Figura 1). Além disso, os valores de EC_{50} foram mais baixos do que aqueles do ACV e GCV para o BoHV-1 e BoHV-5, apresentando IS superiores para os três vírus (Tabela 1). A atividade antiviral do PFA já havia sido demonstrada frente ao BoHV-1, em células do *cumulus* co-cultivadas com embriões bovinos. Os títulos do vírus foram reduzidos em quatro logaritmos na concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e a replicação viral foi inibida completamente frente a $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (MARLEY et al., 2006). Por outro lado, o PFA apresenta atividade intermediária frente ao FeHV-1 *in vitro* se comparado a outros fármacos como o GCV e o Cidofovir. Testes com o EqHV-1 demonstraram que o PFA reduz o número de placas virais, porém essa ação varia de acordo com o isolado viral, apresentando, por isso, valor limitado para o tratamento de infecções por esse vírus (MEULEN et al., 2006; GARRÉ et al., 2007).

Para o BoHV-2, o GCV apresentou um valor de EC₅₀ mais baixo que o PFA. O valor de IS no entanto foi superior para o PFA, indicando que este seria mais seguro para estudos *in vivo* com este vírus. Além disso, o GCV somente pode ser utilizado por infusão intravenosa, o que dificultaria a formulação de pomadas de uso tópico na glândula mamária de fêmeas bovinas. Embora a mamilite herpética bovina seja uma doença auto-limitante, possui importância em rebanhos leiteiros, pois pode produzir redução na produção de leite e predispor a infecções bacterianas, responsáveis por mastites (WELLENBERG et al., 2002). Pela semelhança com o HSV-1 e o HSV-2, acredita-se que fármacos disponíveis para o tratamento das infecções herpéticas humanas possam se constituir em alternativas para o tratamento das lesões vesiculares e erosivas produzidas pelo BoHV-2 (FIELD et al., 2006). Esse vírus também tem sido indicado como modelo para estudos com o HSV-1, pela sua semelhança genética e antigênica (EHLERS et al., 1999). A aplicabilidade de fármacos antivirais para o tratamento destas infecções em bovinos é questionável, pelo seu alto custo. Contudo, o conhecimento de antivirais efetivos contra o BoHV-1 e BoHV-5 possui aplicabilidade em estudos de patogenia e terapêutica antiviral em modelos animais, especialmente camundongos e coelhos.

CONCLUSÕES

Os três fármacos testados apresentaram atividade antiviral, em níveis variáveis, frente aos três herpesvírus de bovinos *in vitro*. O GCV apresentou-se ativo contra o BoHV-2 *in vitro*, e é um candidato para testes *in vivo*. O PFA apresentou os melhores resultados frente aos três herpesvírus, constituindo-se no candidato de eleição para testes terapêuticos *in vivo*.

FONTES DE AQUISIÇÃO

^aInvitrogen Brasil LTDA, São Paulo, SP, Brasil.

^bCultilab Materiais para Cultura de Células LTDA, Campinas, SP, Brasil.

^cNutricell nutrientes celulares LTDA, Campinas, SP, Brasil.

^dGalena, Campinas, SP, Brasil.

^eBrasvit, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

^fSigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à colega do Setor de Virologia Marciele Ribas Pilau, pelo auxílio na realização dos ensaios de citotoxicidade pelo MTT.

REFERÊNCIAS

CARRILLO, B.J. et al. Pathology of a bovine viral necrotizing encephalitis in Argentina.

Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B, v. 30, n. 3, p. 161-168, 1983.

CLERCQ, E.D. Molecular targets for antiviral agents. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 297, n. 1, p. 1-10, 2001.

COEN, D.M.; RICHMAN, D.D. Antiviral agents. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields virology**. 5.ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2007. Cap. 14, p. 447-485.

DELHON, G.A. et al. Genome of bovine herpesvirus 5. **Journal of Virology**, v. 77, n. 19, p. 10339-10347, 2003. Doi: 10.1128/JVI.77.19.10339-10347.2003.

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. Doi: 10.1080/13550280802578067.

DUAN, R. et al. Acyclovir-resistant corneal HSV-1 isolates from patients with herpetic keratitis.

Journal of Infectious Disease, v. 198, p. 659-663, 2008. Doi: 10.1086/590668.

EHLERS, B. et al. Bovine herpesvirus type 2 is closely related to the primate alphaherpesviruses.

Virus Genes, v. 19, n. 3, p. 197-203, 1999. Doi: 10.1023/A:1008184630066.

ERIKSSON, B. et al. Pyrophosphate analogs as inhibitors of DNA polymerases of cytomegalovirus, herpes simplex virus and cellular origin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 696, n. 2, p. 115-123, 1982.

FIELD, H.J. et al. Herpesvirus latency and therapy – from a veterinary perspective. **Antiviral Research**, v. 71, n. 2-3, p. 127-133, 2006. Doi: 10.1016/j.antiviral.2006.03.018.

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. Doi: 10.1590/S0100-736X2009000100001.

GARRÉ, B. et al. In vitro susceptibility of six isolates of equine herpesvirus 1 to acyclovir, ganciclovir, cidofovir, adefovir, PMEDAP and foscarnet. **Veterinary Microbiology**, v. 122, n. 1-2, p. 43-51, 2007. Doi: 10.1016/j.vetmic.2007.01.004.

GLOTOV, A.G. et al. Study of antiviral activity of different drugs against bovine herpes virus and pestivirus. **Antibiotiki i Khimioterapiia**, v. 49, n. 6, p. 06-09, 2004.

HUSSEIN, I.T.M. et al. Penciclovir is a potent inhibitor of feline herpesvirus-1 with susceptibility determined at the level of virus-encoded thymidine kinase. **Antiviral Research**, n.78, n. 3, p.268-274, 2008a. Doi: 10.1016/j.antiviral.2007.10.015.

HUSSEIN, I.T.M. et al. Substrate specificity and molecular modelling of the feline herpesvirus-1 thymidine kinase. **Archives of Virology**, v. 153, p. 495-505, 2008b. Doi: 10.1016/j.antiviral.2007.01.152.

KAHRS, R.F. Viral diseases of cattle. 2.ed. Iowa: Iowa State University Press, 2001.

MAGGS, D.J.; CLARKE, H.E. In vitro efficacy of ganciclovir, cidofovir, penciclovir, foscarnet,

idoxuridine and acyclovir against feline herpesvirus type-1. **American Journal of Veterinary Research**, v. 65, n. 4, p. 399-403, 2004.

MARLEY, M.S. et al. Effect of phosphonoformic acid in the development of bovine embryos in vitro. **Veterinary Therapeutics**, v. 7, n. 2, p. 156-166, 2006.

MEULEN, K.V.D. et al. In vitro comparison of antiviral drugs against feline herpesvirus 1. **BMC Veterinary Research**, v. 2, n. 13, p. 1-7, 2006. Doi: 10.1186/1746-6148-2-13.

NAESENS, L.; CLERCQ, E.D. Recent developments in herpesvirus therapy. **Herpes**, v. 8, n. 1, p. 12-16, 2001.

RISSE, D.R. et al. Epidemiology, clinical signs and distribution of the encephalic lesions in cattle affected by meningoencephalitis caused by bovine herpesvirus-5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 123-132, 2006. Doi: 10.1590/S0100-736X2006000200010.

ROCK, D.L. et al. Characterization of dexamethasone-induced reactivation of latent bovine herpesvirus 1. **Journal of Virology**, v. 66, n. 4, p. 2484-2490, 1992.

ROIZMAN, B. The family Herpesviridae: an update. **Archives of Virology**, v. 123, n. 3-4, p.432-445, 1992.

SCHWERS, A. et al. Comparison of the effect of trisodium phosphonoformate on the mean plaque size of pseudorabies virus, infectious bovine rhinotracheitis virus and pigeon herpesvirus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 90, n. 4, p. 625-633, 1980.

SOLAROLI, N. et al. Substrate specificity of feline and canine herpesvirus thymidine kinase. **Antiviral Research**, v. 79, p. 128-132, 2008. Doi: 10.1016/j.antiviral.2008.03.003.

THIRY, E. et al. In vivo and in vitro effect of acyclovir on pseudorabies virus, infectious bovine rhinotracheitis virus and pigeon herpesvirus. **Annales Recherches Vétérinaires**, v. 14, n. 3, p. 233-245, 1983.

TORRES, F.D. et al. Acute and latent infection by bovine herpesvirus type 2 in a guinea pig

model. **Microbial Pathogenesis**, *in press*, 2010.

WEIBLEN, R. et al. Isolation of bovine herpesvirus 1 from preputial swabs and semen of bulls with balanoposthitis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 4, n. 3, p. 341–343, 1992.

WELLENBERG, G.J. et al. Viral infections and bovine mastitis: a review. **Veterinary Microbiology**, v. 88, n. 1, p. 27-45, 2002. Doi: 10.1016/S0378-1135(02)00098-6.

WHITLEY, R.J.; ROIZMANN, B. Herpes simplex virus infections. **Lancet**, n. 357, n. 9257, p. 1513-1518, 2001. Doi: 10.1016/S0140-6736(00)04638-9.

YOSHIDA, M. et al. Comparison of antiviral compounds against human herpesvirus 6 and 7. **Antiviral Research**, v. 40, n. 1-2, p. 73-84, 1998.

Tabela 1. Susceptibilidade *in vitro* dos herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), tipo 2 (BoHV-2) e tipo 5 (BoHV-5) ao Aciclovir (ACV), Ganciclovir (GCV) e Foscarnet (PFA).

| Herpesvírus de bovinos | Antiviral | | | | | |
|-------------------------------|-------------------------------|-----------------|------------------|------|------------------|-------|
| | ACV | | GCV | | PFA | |
| | EC ₅₀ ^a | IS ^b | EC ₅₀ | IS | EC ₅₀ | IS |
| BoHV-1 | 112,9 ^c | 4,5 | 335,8 | 1,7 | 29,5 | 42,2 |
| BoHV-2 | 114,2 | 4,5 | 33,5 | 16,6 | 45,2 | 27,6 |
| BoHV-5 | 96,9 | 5,3 | 123,2 | 4,5 | 7,8 | 160,6 |
| CC ₅₀ ^d | 508,3/130,3 | | 556,2/111,4 | | 1.245,1/4869,9 | |

^aEC₅₀: concentração de cada fármaco efetiva para inibir em 50% o número de placas virais, em µg.mL⁻¹.

^bIS: índice de seletividade; relação entre a CC₅₀ e a EC₅₀.

^cOs valores se referem à concentração do antiviral em µg.mL⁻¹.

^dCC₅₀: concentração do fármaco em µg.mL⁻¹ citotóxica para 50% das células MDBK/Hep 2.

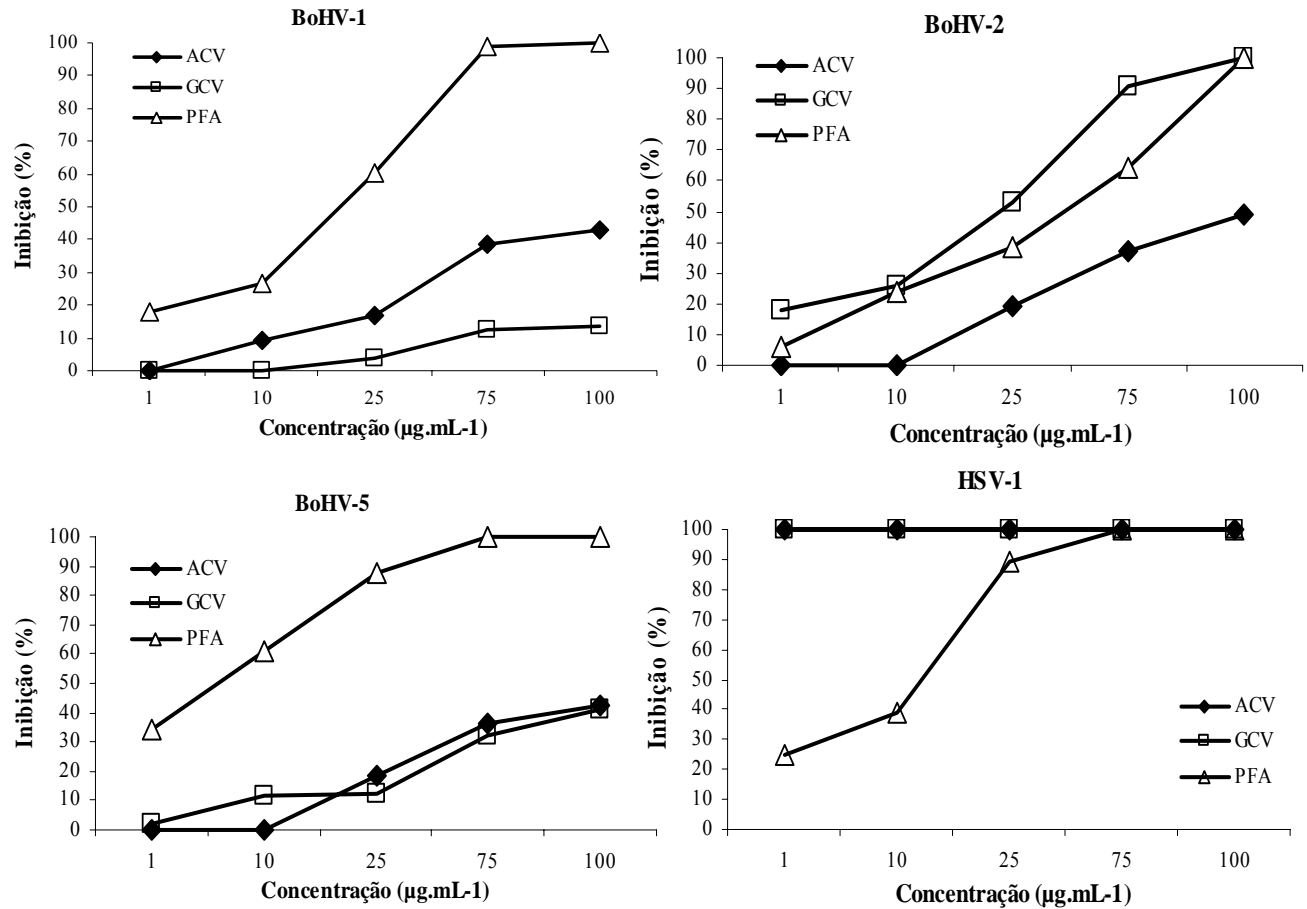


Figura 1. Porcentagem de inibição da replicação viral *in vitro* pelo Aciclovir, Ganciclovir e Foscarnet frente aos herpesvírus bovino tipos 1 (BoHV-1), 2 (BoHV-2), 5 (BoHV-5) e herpes simplex tipo 1 (HSV-1). Os dados representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

5. CAPÍTULO 4

Atividade do Foscarnet sobre os herpesvírus bovino tipos 1 e 5 em coelhos

Foscarnet activity against bovine herpesvirus types 1 and 5 in rabbits

Renata Dezengrini¹, Sara Campos da Silva¹, Carolina Kist Traesel¹, Marcelo Weiss^{1,2}, Mauro Schneider Oliveira³, Rudi Weiblen⁴, Eduardo Furtado Flores^{4*}

(artigo a ser submetido ao periódico *Pesquisa Veterinária Brasileira*)

¹Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

²Endereço atual: Plum Island Animal Disease Center (PIADC), United States Department of Agriculture (USDA), Orient Point, NY, EUA.

³Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

⁴Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciência Rurais (CCR), Setor de Virologia (SV), UFSM, Santa Maria, 97105-900, RS, Brasil. E-mail: eduardofurtadoflores@gmail.com, Fone/fax: 55-32208034. * Autor para correspondência

ABSTRACT. – Dezengrini, R., Silva, S.C., Traesel, C.K., Weiss, M., Oliveira, M.S., Weiblen, R. & Flores, E.F. 2010. [**Foscarnet activity against bovine herpesvirus types 1 and 5 in experimentally infected rabbits**] Atividade do Foscarnet sobre os herpesvírus bovino tipos 1 e 5 em coelhos infectados experimentalmente. Pesquisa Veterinária Brasileira xx(x):xx-xx. Setor de Virologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, e Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências Rurais. Universidade Federal de Santa Maria, Av, Roraima, 1000, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil. E-mail: eduardofurtadoflores@gmail.com

The antiviral activity of Foscarnet (PFA) was previously demonstrated *in vitro* against three bovine herpesviruses (BoHVs). Herein we report the activity of PFA in rabbits inoculated intranasally (IN) or in the conjunctival sac (IC) with BoHV-1 or BoHV-5 and treated with 100 mg/kg of PFA on a daily basis. Rabbits inoculated with BoHV-5 by the IC route and treated with PFA presented a reduction in virus titers between days 2 and 6 post inoculation (pi) comparing to untreated controls; this difference was significant at day 3 pi [$F(9,108) = 2,23$; $P < 0.03$]. Morbidity and mortality rates of rabbits inoculated with BoHV-5 and treated with PFA were significantly reduced (50%; 11/22) when compared to untreated controls (95.4%; 21/22) ($P < 0.0008$). A reduction in virus shedding was also observed in rabbits inoculated with BoHV-1 by the IC route, between days 1 and 4 pi; 6 and 7 pi. The frequency, severity and duration of ocular signs (hyperemia, edema, ocular secretion) were also reduced in the PFA-treated group. In this group, 6/9 animals developed only mild, mainly unilateral, and transient ocular signs. In contrast, 8/9 controls developed severe ocular signs. The difference in the incubation period and in the duration of the clinical course was significant between the groups ($P < 0.005$ and $P < 0.04$, respectively). The PFA antiviral activity *in vivo* against BoHV-1 and BoHV-5 is promising towards future studies to evaluate its applicability for treatment of herpetic infections in domestic animals.

INDEX TERMS: Antivirals, BoHV-1, BoHV-5, Foscarnet, rabbits.

RESUMO. - A atividade antiviral do Foscarnet (PFA) foi previamente demonstrada *in vitro* frente a três herpesvírus bovino (BoHV). Neste estudo, a atividade do PFA foi avaliada *in vivo* em coelhos inoculados pela via intranasal (IN) ou no saco conjuntival (IC) com o BoHV-1 ou BoHV-5, e tratados ou não com 100 mg/kg do fármaco por dia. Coelhos inoculados com o BoHV-5 pela via IC e tratados com o PFA apresentaram uma redução nos títulos de vírus excretado entre os dias 2 e 6 pi; essa diferença foi significativa no dia 3 pi [$F(9,108) = 2,23$; $P < 0,03$]. Coelhos inoculados com o BoHV-5 apresentaram uma redução significativa ($P < 0,0008$) nos índices de morbidade e mortalidade: 95,4% (21/22) nos controles para 50% (11/22) nos tratados. Redução na excreção de vírus também foi observada em coelhos inoculados com o BoHV-1 pela via IC, entre os dias 1 e 4, e 6 e 7 pi. A frequência, severidade e duração dos sinais oculares (hiperemia, edema, secreção ocular) também foram reduzidas no grupo PFA. Nesse grupo, 6/9 animais desenvolveram apenas sinais oculares leves unilaterais e transitórios. Em contraste, 8/9 animais do grupo controle desenvolveram sinais oculares severos. A diferença no período de incubação e na duração do curso clínico foi significativa entre os grupos ($P < 0,005$ e $P < 0,04$, respectivamente). A atividade antiviral do PFA *in vivo* contra o BoHV-1 e BoHV-5 é promissora para estudos futuros que avaliem sua aplicabilidade no tratamento de infecções herpéticas em animais domésticos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Antivirais, BoHV-1, BoHV-5, Foscarnet, coelhos.

INTRODUÇÃO

Os herpesvírus bovino tipos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) são classificados na família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*. Esses agentes apresentam

uma cadeia dupla linear de DNA como genoma, são envelopados e possuem uma substância amorfa denominada tegumento entre o capsídeo e o envelope viral (Roizman 1992). O BoHV-1 é associado principalmente com doença respiratória, a rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), lesões genitais, denominadas vulvovaginite e balanopostite pustular infecciosa (IPV/IBP), além de produzir infertilidade transitória, abortos e infecções sistêmicas em neonatos (Roizman 1992). O BoHV-5 produz meningoencefalite de curso geralmente fatal em bovinos jovens, doença relatada com frequência na Argentina e no Brasil (Carrillo et al. 1983, Rissi et al. 2006). Uma importante característica dos vírus dessa subfamília é a capacidade de estabelecer e reativar infecções latentes em gânglios nervosos, o que permite a sua perpetuação na natureza (Rock et al. 1992).

Devido à sua importância clínica, os herpesvírus humanos têm sido alvo do desenvolvimento de fármacos antivirais. Dentre os fármacos testados, incluem-se os análogos de nucleosídeo, de pirofosfato e outros fármacos inibidores da DNA polimerase (Coen & Richman 2007). O Foscarnet (PFA) é um análogo sintético do pirofosfato que impede que a DNA polimerase complete seu ciclo catalítico (Coen & Richman 2007). Esse fármaco é utilizado em humanos para o tratamento de infecções herpéticas por isolados resistentes aos análogos de nucleosídeo (Eriksson et al. 1982, Coen & Richman 2007). Estudos de atividade antiviral do PFA com o EqHV-1, FeHV-1 e BoHV-1 têm sido conduzidos *in vitro* (Schwers et al. 1980, Maggs & Clarke 2004, Marley et al. 2006, Garré et al. 2007). Garré et al. (2007) observaram que a redução do número de placas produzidas do EqHV-1 *in vitro* pelo PFA varia de acordo com a cepa ou isolado. Esse antiviral foi ainda associado com a redução do número e tamanho de placas produzidas pelo BoHV-1 *in vitro*, sugerindo-se que o fármaco possa ser utilizado *in vivo* (Schwers et al. 1980). A atividade do PFA contra o BoHV-1 também foi testada em embriões bovinos *in vitro*, nos quais inibiu completamente a replicação viral, em concentrações de 200 e 400 µg/mL (Marley et al. 2006).

Poucos estudos foram realizados para testar fármacos antivirais *in vivo* contra herpesvírus animais. A maioria deles relata estudos com o ACV em camundongos ou em coelhos inoculados com o HSV-1, que servem como modelo para uso de fármacos antivirais em humanos (Sicher et al. 1981, Kern et al. 1986). Em estudos clínicos, a atividade do PFA já foi demonstrada frente ao citomegalovírus murino (MCMV), quando reduziu a mortalidade e os títulos de vírus nos pulmões de ratos infectados (Debs et al. 1986). Em macacos, o PFA reduziu o período de viremia e a severidade das lesões produzidas pelo VZV (Öberg et al. 1989). Em cobaias, este fármaco preveniu o desenvolvimento de lesões cutâneas e genitais após a inoculação com o HSV-1 (Spruance et al. 1986, Öberg et al. 1989). O PFA também foi testado em camundongos infectados com o HSV-1, nos quais reduziu a mortalidade (Kern et al. 1978; Öberg et al. 1989).

A atividade *in vitro* do ACV, GCV e PFA foi demonstrada frente ao BoHV-1, BoHV-2 e BoHV-5 (Dezengrini et al. 2009, submetido). Apesar de alguns estudos demonstrarem a atividade antiviral de fármacos de uso humano contra o BoHV-1 *in vitro*, não existem formulações disponíveis para tratamento de infecções herpéticas nesta espécie. Não obstante, a atividade antiviral de fármacos contra o BoHV-1 e BoHV-5 pode possuir aplicabilidade em estudos de patogenia e de terapêutica antiviral em modelos animais, especialmente em camundongos e coelhos. Assim, o objetivo desse estudo foi investigar os efeitos do PFA sobre a replicação e as doenças produzidas pelo BoHV-1 e BoHV-5 em coelhos infectados experimentalmente.

MATERIAL E MÉTODOS

O Foscarnet (PFA) foi testado *in vivo* em coelhos inoculados pelas vias intranasal (IN) ou no saco conjuntival (IC) com o BoHV-1 ou BoHV-5. Foram comparadas a replicação e excreção viral, bem como o desenvolvimento de sinais clínicos (período de incubação, morbidade, mortalidade, severidade dos sinais) nos grupos tratados e controles. Os procedimentos com

animais foram conduzidos sob supervisão veterinária e conforme as recomendações do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade (aprovação 23081.012136/2007-90, em 27 de agosto de 2007).

Células, vírus e fármacos

Células da linhagem MDBK (ATCC, CCL-22) cultivadas em meio essencial mínimo (MEM; Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) e suplementadas com 5% de soro equino (SE), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Nutricell, Campinas, SP, Brasil) foram utilizadas para amplificação, quantificação e isolamento viral. As cepas de BoHV-5 SV-507/99 (Delhon et al. 2003), e BoHV-1 SV-56/90 (Weiblen et al. 1992) foram utilizadas para a inoculação dos coelhos. O antiviral Foscarnet (PFA; PM 300.1) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) foi aliquotado, mantido a temperatura ambiente e diluído em água ultrapura imediatamente antes da aplicação nos animais.

Atividade do PFA frente ao BoHV-5 em coelhos

Experimento I: 20 coelhos da raça Nova Zelândia, com 23 dias de idade, foram inoculados pela via IN com $10^{7,6}$ DICC₅₀ do BoHV-5, sob anestesia com 30 mg/kg de tiletamina e zolazepan (Zoletil 50; Virbac do Brasil, São Paulo, SP, Brasil) (Silva et al. 1999). Destes, 10 coelhos receberam 100 mg/kg por dia de PFA em três aplicações intraperitoneais (IP) com intervalos de 8 horas (h), entre os dias 1 e 6 pós-inoculação (pi), constituindo o grupo PFA. Os demais coelhos inoculados (n=10) receberam água ultrapura (200 µL) sob o mesmo protocolo, constituindo o grupo controle de vírus (CV). Os animais foram monitorados clinicamente a cada 8 h e suabes nasais foram coletados a cada 48 h (dias 1 a 15 pi) para isolamento viral. Os animais que apresentaram sinais neurológicos foram submetidos à eutanásia após anestesia com 30 mg/kg de cloridrato de ketamina e 5mg/kg de cloridrato de xilazina (Virbac do Brasil, São Paulo, SP, Brasil), pela administração intracardíaca de tiopental sódico (Cristália Produtos Químicos e

Farmacêuticos LTDA, Itapira, SP, Brasil). Secções do encéfalo desses animais foram coletadas e submetidas à isolamento de vírus.

Experimento II: 12 coelhos da raça Nova Zelândia com 21 dias de idade foram inoculados pela via IN com $10^{7,2}$ DICC₅₀ do BoHV-5, conforme descrito acima. Seis animais receberam PFA entre 8 hpi e 10 dpi pela via IP (100 mg/kg por dia), constituindo o grupo PFA; 6 animais receberam água ultrapura (200 µL) nos mesmos intervalos (grupo CV). Suabes nasais foram colhidos a cada 48 h entre os dias 2 e 14 pi para isolamento e quantificação de vírus. Os animais que apresentaram sinais neurológicos foram submetidos à eutanásia conforme descrito no Experimento I; secções do encéfalo foram coletadas para isolamento viral.

Experimento III: 12 coelhos foram inoculados pela via IC sob anestesia com $10^{7,2}$ DICC₅₀ do BoHV-5. Após a inoculação, os animais foram alocados em dois grupos: um grupo recebeu aplicações de PFA (grupo PFA) entre 8 hpi e 17 dpi (100 mg/kg por dia, IP), e no grupo controle (CV; n=6) foi administrada água ultrapura (200 µL). Suabes conjuntivais foram coletados diariamente entre os dias 1 e 14 pi e submetidos a isolamento e quantificação de vírus. Os animais que apresentaram sinais neurológicos foram submetidos à eutanásia conforme descrito acima, coletando-se porções do encéfalo para isolamento viral.

Atividade do PFA frente ao BoHV-1 em coelhos

Dezoito coelhos da raça Nova Zelândia, com 21 dias de idade, foram inoculados pela via IC, sob anestesia, com $10^{7,58}$ DICC₅₀ do BoHV-1, e a seguir distribuídos aleatoriamente em dois grupos. O grupo PFA (n=9) recebeu aplicações de PFA IP (100 mg/kg por dia) entre 8 hpi e 10 dpi, enquanto que o grupo CV (n=9) recebeu água ultrapura IP (200 µL) nos mesmos intervalos. Os animais foram monitorados clinicamente 3 vezes ao dia. Suabes conjuntivais foram coletados entre os dias 1 e 11 pi para isolamento e quantificação de vírus.

Durante o monitoramento clínico, observaram-se os sinais clínicos oculares, os quais

foram registrados em fichas individuais. Para tornar a avaliação clínica mais objetiva, atribuíram-se valores de zero (0) a quatro (4), de acordo com a severidade dos sinais (Quadro 1). Dessa forma, a cada dia, os animais apresentaram doença de severidade quantificável de 0 a 4. Posteriormente, utilizou-se um escore clínico, onde foi calculada a média e o somatório desses valores para cada grupo, entre os dias 1 e 12 pi.

Isolamento e quantificação de vírus

Após a coleta, os suabes nasais ou oculares foram drenados, centrifugados a baixa rotação (2000 x g por 10 min.) e uma alíquota de 200 µL inoculada em monocamadas de células MDBK. Após 2 h de incubação a 37°C em estufa de CO₂ a 5%, o inóculo foi removido e o meio de cultivo adicionado. Foram realizadas 3 passagens de 5 dias cada, considerando-se negativas as amostras que não apresentaram efeito citopático (ECP) ao final da terceira passagem. Regiões do encéfalo de coelhos que apresentaram sinais neurológicos (experimentos I, II e III) além do TG (experimento III) foram macerados em areia estéril, homogenizadas em MEM 2X 1:5 (peso x volume) e centrifugados a 2000 x g a 4°C por 10 min. Uma alíquota de 200 µL foi inoculada em monocamadas de células MDBK, seguido de monitoramento conforme descrito acima.

Para a quantificação de vírus nas secreções oculares, os suabes foram drenados e submetidos à quantificação pela técnica de diluição limitante em células MDBK. Os títulos virais foram calculados de acordo com Reed & Muench (1938) e expressos como log₁₀ DICC₅₀/mL.

Análise estatística

Os períodos de incubação dos animais inoculados com os vírus, além da duração do curso clínico nos animais inoculados com o BoHV-1 foram comparados entre os grupos PFA e CV pelo teste não-paramétrico U de Mann Whitney, considerando-se significativo P<0,05, com auxílio do SPSS (SPSS, Chicago, IL, EUA). Os valores referentes ao número de animais que apresentaram sinais neurológicos (morbidade) e mortalidade dos grupos PFA e CV foram submetidos ao Teste

Exato de Fisher de probabilidade (Zar et al., 1999). Os títulos médios do BoHV-1 e BoHV-5 excretados nas secreções oculares dos coelhos dos grupos PFA e CV foram submetidos à análise de variância de duas vias (MANOVA) com medida repetida. O teste *post hoc* Student Newman Keuls (SNK) foi aplicado quando apropriado, considerando-se significativo $P < 0,05$, com auxílio do SPSS.

RESULTADOS

Efeitos do PFA sobre a infecção e doença neurológica pelo BoHV-5 em coelhos

No experimento I, todos os animais inoculados com o BoHV-5 pela via IN (grupos PFA e CV) excretaram o vírus em secreções nasais por um período de 5 a 15 dias. Quatro entre dez animais do grupo PFA (40%) apresentaram sinais neurológicos entre os dias 6 e 9 pi; e 9/10 animais do grupo CV (90%) apresentaram sinais neurológicos entre os dias 7 e 15 pi (Quadro 2). Os sinais não diferiram entre os grupos, e foram caracterizados por depressão, descarga nasal, bruxismo, opistótono, andar em círculos e convulsões. Animais doentes foram submetidos à eutanásia *in extremis*.

No experimento II, coelhos inoculados com o BoHV-5 pela via IN excretaram o vírus nas secreções nasais por 6 a 10 dias. Não foram observadas diferenças nos títulos médios de vírus excretados entre os grupos PFA e CV (dados não apresentados). Os sinais neurológicos foram evidenciados entre os dias 6 e 15 pi (grupo CV) e 7 a 12 pi (grupo PFA). Os índices de morbidade e mortalidade foram de 66,7% (4/6) no grupo PFA e de 100% (6/6) no grupo CV (Quadro 2).

Nos dois experimentos conduzidos com animais inoculados pela via IN (Exp. I e II), observaram-se sinais neurológicos em 50% (8/16) dos animais tratados com PFA, contra 93,7% (15/16) dos controles. A mediana do período de incubação foi relativamente menor no grupo

PFA, porém essa diferença não foi significativa, pela variação entre os animais dentro dos grupos (Quadro 2).

Como nos dois primeiros experimentos não foi possível quantificar a excreção de vírus, realizou-se o terceiro experimento, no qual coelhos foram inoculados pela via IC com o BoHV-5. No experimento III os animais tratados com PFA excretaram o vírus em títulos inferiores aos controles, entre os dias 2 e 6 pi. No dia 3 pi essa diferença foi significativa [$F(9,108) = 2,23$; $P < 0,03$] (Fig 1). Neste dia, verificou-se um pico na excreção viral, e o título médio de vírus foi 4,8 vezes inferior no grupo PFA (Fig 1). Além disso, o período médio de excreção de vírus nesse grupo foi menor, de 11 dias (10-13) no grupo PFA contra 12,7 dias (10-14) no grupo CV. No dia 11 pi, todos os animais do grupo CV e somente 3 do grupo PFA ainda excretavam vírus nas secreções oculares. A diferença na mediana do período de incubação entre esses grupos não foi significativa (Quadro 2). O curso clínico dos animais nesse experimento foi, em geral, mais tardio do que nos animais inoculados pela via IN, e os coelhos apresentaram doença neurológica entre os dias 11 e 18 pi (grupo CV) e entre 12 e 20 dpi (grupo PFA). A análise estatística do período de incubação médio e do curso clínico médio não revelou diferenças entre os grupos PFA e grupos CV nos três experimentos com o BoHV-5. A diferença das taxas de morbidade e mortalidade entre os grupos CV e PFA foi de 50%, confirmando os resultados dos primeiros experimentos. Apesar da inoculação ter sido IC, os animais não apresentaram sinais oculares/conjuntivais.

Portanto, considerando-se os três experimentos realizados com o BoHV-5, os índices de morbidade e mortalidade foram de 95,7% (21/22) nos grupos CV e de 50% (11/22) nos grupos PFA. Essa diferença foi significativa ($P < 0,0008$). Isso demonstra a eficácia do PFA, não somente na redução dos títulos de vírus excretados, mas também na redução da morbidade e mortalidade.

Efeitos do PFA sobre a infecção conjuntival pelo BoHV-1 em coelhos

No experimento realizado com o BoHV-1, o PFA reduziu a excreção de vírus nas

secreções oculares entre os dias 1 e 4; 6 e 7 pi (Fig 2). Embora essa redução não tenha sido significativa, nos dias 1, 2 e 4 pi os títulos médios de vírus excretados foram respectivamente 2,3, 4,1 e 4,9 vezes menores no grupo PFA. No dia 10 pi, 3 animais do grupo PFA e 6 do grupo CV ainda excretavam vírus nas secreções oculares.

Os sinais clínicos oculares foram mais frequentes nos animais controles (8/9) do que nos tratados (6/9), e de maior intensidade e duração no grupo CV (Fig 3). Nos animais tratados, os sinais foram de hiperemia e secreção serosa leve, unilateral, apresentando recuperação em 2 a 7 dias. A oclusão parcial e unilateral da pálpebra foi observada em dois animais, por um período transitório. Por outro lado, os animais do grupo CV apresentaram sinais oculares mais precoces e severos, com curso clínico de maior duração. Esses sinais foram caracterizados por hiperemia, edema e secreção serosa moderada a severa bilateral e oclusão parcial ou total das pálpebras. A oclusão total e bilateral das pálpebras foi observada em todos os animais que desenvolveram sinais oculares do grupo CV entre os dias 4 e 9 pi. Além destes sinais, vesículas e crostas foram observadas entre os dias 5 e 9 pi em 4 dos 9 animais desse grupo. Os sinais iniciaram-se a partir do dia 1 pi e regrediram após 4 a 13 dias, com um período de incubação médio mais curto e curso clínico de maior duração nos animais controles. As médias do período de incubação foram de 7,1 (4-7) dpi no grupo PFA e 3,5 (1-4) dpi no grupo CV. Esses valores foram convertidos a mediana [5 (4-12) para o grupo PFA e 3 (2-3,5) para o grupo CV] e submetidos à análise estatística. Dessa forma, observou-se que o aumento do período de incubação no grupo PFA foi significativo ($P < 0,005$). Da mesma forma, a redução na duração do curso clínico de 7,3 (4-13) para 3,1 (2-7), analisada após a conversão desses dados a mediana [4 (0-5) no grupo PFA e 9 (4-9,5) no grupo CV], foi significativa ($P < 0,04$) (Quadro 3). Na figura 4 é apresentada a evolução do escore clínico médio e total dos grupos tratados com o PFA ou mantidos como controle de vírus.

DISCUSSÃO

O presente estudo relata os efeitos do Foscarnet (PFA) em coelhos inoculados com o BoHV-1 ou BoHV-5. Nos coelhos inoculados pela via IC, o tratamento com esse fármaco resultou na redução da excreção desses vírus. Em coelhos inoculados com o BoHV-5, observou-se uma redução da morbidade e mortalidade nos grupos tratados. Nos coelhos inoculados com o BoHV-1, o tratamento retardou o início da doença, reduziu a frequência, a severidade e a duração do curso clínico. Esses resultados abrem perspectivas para experimentos envolvendo terapias experimentais e estudos de patogenia envolvendo drogas antivirais contra esses agentes.

A partir dos resultados obtidos em um experimento anterior, quando investigou-se a atividade *in vitro* de três antivirais (Aciclovir, Ganciclovir e Foscarnet) frente a três herpesvírus de bovinos, selecionou-se o PFA para estudos *in vivo* (Dezengrini et al. 2009, submetido). Para esses testes, utilizou-se o modelo experimental de coelhos, já bem caracterizado (Silva et al. 1999, Flores et al. 2009). Coelhos recém-desmamados foram inoculados com o BoHV-5 pela via intranasal (IN) e tratados com PFA entre os dias 1 e 6 pi (Exp. I) ou entre 8 h e 10 dpi (Exp. II), e avaliados quanto ao desenvolvimento de doença neurológica. Nesses experimentos, a quantificação viral nas secreções nasais – indicativos da eficiência de replicação primária - pode não fornecer indicativos precisos dos níveis de replicação (Flores et al. 2009). Portanto, realizou-se o terceiro experimento, com o objetivo principal de quantificar e comparar a replicação e excreção viral nas secreções oculares de coelhos inoculados.

Os títulos médios de vírus nas secreções oculares de coelhos inoculados com o BoHV-5 (Exp. III) foram significativamente inferiores no dia 3 pi [$F(9,108) = 2,23$; $P < 0,03$] (Fig 1), embora diferenças nos títulos também tivessem sido observadas em outros dias (2, 4-6pi). Esses resultados demonstram que o PFA reduziu a replicação e a excreção viral. Considerando-se os três experimentos com o BoHV-5, o tratamento resultou em índices de morbidade e mortalidade

inferiores ($P < 0,0008$) nos grupos tratados [50% (11/22) nos grupos PFA contra 95,7 (21/22) nos grupos CV]. A atividade antiviral no sítio de replicação primária, reduzindo os títulos virais produzidos e excretados, pode explicar em parte a redução nos índices de morbidade e mortalidade. É provável que a invasão viral do encéfalo seja influenciada pela quantidade de partículas infecciosas produzidas nos ciclos iniciais de replicação (Chowdhury et al. 1997, Lee et al. 1999). Assim, a redução na replicação primária, resultaria em redução na carga viral que estaria disponível para invadir o encéfalo. Embora não tenha sido possível quantificar os títulos de vírus excretados nos Exp. I e II, é possível que também tenha ocorrido uma redução da replicação na mucosa nasal dos animais tratados com PFA.

Hipotetiza-se que a redução nos índices de morbidade e mortalidade pelo tratamento com PFA de coelhos inoculados com o BoHV-5 possa também ser devida, parcialmente, à interferência do fármaco com a replicação viral no encéfalo. Nesse sentido, tem sido demonstrado que o PFA apresenta uma boa penetração no líquido e no humor vítreo, atingindo concentrações consideráveis na retina e no SNC de coelhos (López-Cortés et al. 2000). Portanto, além de inibir a replicação no sítio de entrada, é possível que o PFA tenha reduzido os níveis da replicação do BoHV-5 no encéfalo, após a passagem pela barreira hematoencefálica. Isso poderia ter reduzido a disseminação viral no encéfalo e prevenido ou retardado o desenvolvimento de doença neurológica nos animais tratados.

Nos animais inoculados IC com o BoHV-5, além da redução na excreção de vírus e nos índices de morbidade e mortalidade, observou-se um curso clínico mais tardio nos animais de ambos os grupos. Esse achado era esperado, pois a inoculação IC resulta na invasão do SNC preferencialmente pela via trigeminal, que apresenta cinética mais lenta em relação à via olfatória (Lee et al. 1999, Diel et al. 2005).

A ação do PFA frente ao BoHV-1 *in vitro* havia sido demonstrada em estudos anteriores

(Schwers et al. 1980, Marley et al. 2006, Dezengrini et al. 2009, submetido). No entanto, existem poucos estudos *in vivo* com este antiviral, provavelmente pelo seu custo elevado. O tratamento com o PFA de coelhos infectados com o BoHV-1 pela via IC resultou na redução dos títulos médios de vírus excretados nas secreções oculares entre os dias 1 e 4; 6 e 7 pi (Fig 2). No dia 10 pi, 3/9 animais do grupo tratado e 6/9 do grupo controle ainda estavam excretando vírus. Os sinais clínicos apresentados pelo grupo PFA foram observados em 66,7% (6/9) dos animais tratados e em 88,9% (8/9) animais do grupo CV. Além da excreção reduzida de vírus, a redução marcante no escore clínico é um importante parâmetro de avaliação, para demonstrar a eficácia do PFA frente ao BoHV-1. Entre os dias 5 e 8 pi, o escore clínico foi aproximadamente 5 vezes inferior no grupo PFA, demonstrando a redução da intensidade dos sinais oculares associados à infecção (Fig. 3 e 4). Nesse sentido, o PFA também tem sido utilizado com sucesso no tratamento de infecções oculares pelo HSV-1, principalmente naquelas produzidas por mutantes na TK resistentes ao ACV, que na maioria das vezes também são refratários ao GCV (Duan et al. 2008).

O início do tratamento com o PFA nas primeiras horas após a inoculação provavelmente limita os títulos de vírus que atingem o SNC (BoHV-5), ou ainda reduz a replicação local do vírus (BoHV-1 e BoHV-5). Com isso, reduz a morbidade e severidade clínica associadas a essas infecções. O início precoce do tratamento (8 hpi a 1 dpi) foi realizado com o intuito de demonstrar a eficácia do PFA na inibição da replicação do vírus. Embora este procedimento não reflita o que se utiliza na rotina - início da terapia após o início dos sinais clínicos – esta é uma prática comum em estudos com antivirais *in vivo* (Sicher et al. 1981, Thiry et al. 1983, Kern et al. 1986, Öberg et al. 1989). O retardo no início do tratamento tópico com PFA de camundongos infectados com o HSV-1 para 5 dpi resultou no aumento do escore clínico e da mortalidade por encefalite nos animais tratados (Piret et al. 2000).

Cabe ressaltar que os resultados apresentados no presente estudo são aplicáveis às cepas

de BoHV-1 e BoHV-5 testadas, tendo em vista os relatos de variação de eficácia do PFA frente a diferentes isolados do HSV-1 e do EqHV-1 (Schwers et al. 1980, Garré et al. 2007).

Embora a atividade antiviral do PFA não tenha sido testada em infecções recorrentes pelo BoHV-1 e BoHV-5, acredita-se que, assim como para o HSV-1, esse fármaco também possa ser efetivo nas reativações das infecções pelos herpesvírus de bovinos (Duan et al. 2008). Estudos semelhantes a este, com o teste de concentrações de PFA superiores e outras vias de aplicação também poderiam elucidar se é possível reduzir ainda mais a excreção de vírus nas secreções oculares, assim como prevenir totalmente o desenvolvimento de sinais neurológicos nos animais tratados.

O objetivo geral desse trabalho foi investigar a eficácia do PFA contra o BoHV-1 e BoHV-5, o que poderia abrir perspectivas para estudos futuros de patogenia e terapêutica dessas infecções herpéticas em modelos experimentais. Alguns desses estudos poderiam elucidar a eficácia de doses maiores de PFA, com início de tratamento mais tardio, vias de aplicação alternativas (gotas oculares ou pela via intravenosa, por exemplo) e sua atividade na reativação/recrudescência da infecção latente. A eficácia de terapias de associação do PFA com outros fármacos, como antiinflamatórios que inibem a ciclooxigenase 2 (COX-2) (Oliveira et al. 2008), inibidores da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), anticonvulsivantes efetivos frente às convulsões jacksonianas – que são parciais e focais - como a carbamazepina, o ácido valpróico, a gabapentina e fenitoína, ou ainda fármacos utilizados no tratamento de convulsões generalizadas (Chowdhury et al. 1997, Ropper & Brown, 2007), poderiam auxiliar na elucidação dos mecanismos de patogenia das infecções pelo BoHV-1 e BoHV-5 *in vivo*.

COMISSÃO DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Os animais foram utilizados de acordo com as recomendações do COBEA (Comitê

Brasileiro em Experimentação Animal). Os procedimentos em animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM (aprovação #23081.012136/2007-90 de 03.09.2007).

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos colegas do Setor de Virologia Fabrício Dias Torres, Juliana Felipetto Cargnelutti e Lucas Bernardes pelo auxílio na realização dos experimentos com animais.

REFERÊNCIAS

- Carrillo, B.J., Pospischil, A. & Dahme, E. 1983. Pathology of a bovine viral necrotizing encephalitis in Argentina. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*, 30(3):161-168.
- Coen, D.M. & Richman, D.D. 2007. Antiviral agents, p.447-485. In: Knipe, D.M.; Howley, P.M. (Ed.). *Fields Virology*, 5th edition. Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Chowdhury, S.I, Lee, B.J., Mosier, D., Sur, J-H, Osorio, F.A., Kennedy, G & Weiss, M.L. 1997. Neuropathology of Bovine Herpesvirus Type 5 (BHVo5) Meningo-encephalitis in a Rabbit Seizure Model. *Journal of Comparative Pathology*, 11295-310.
- Debs, R., Brunette, E., Papahadjopoulos, D., Debruin, M. & Shanley, J.D. 1986. Site specific therapy of murine cytomegalovirus lung infection using aerosolized antiviral agents. 26th International Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy, p.730.
- Delhon, G.A., Moraes, M.P., Lu, Z., Afonso, C.L., Flores, E.F., Weiblen, R., Kutish, G.F., & Rock, D.L. 2003. Genome of bovine herpesvirus 5. *The Journal of Virology*, 77(19):10339-10347.
- Dezengrini, R.D., Silva, S.C., Weiss, M., Weiblen, R. & Flores, E.F. 2009. Atividade in vitro do Aciclovir, Ganciclovir e Foscarnet nos herpesvírus bovino tipos 1, 2 e 5. *Ciência Rural*. (submetido).
- Diel, D.G., Fonseca E.T., Souza S.F., Mazzanti A., Bauermann F.V., Weiblen R. & Flores E.F. 2005. O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) pode utilizar as rotas olfatória e trigeminal para invadir o sistema nervoso central de coelhos, dependendo da via de inoculação. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 25(3):164-170.
- Duan, R. de Vries, R.D., Osterhaus, A.D., Remeijer, L. & Verjans, G.M. 2008. Acyclovir-resistant corneal HSV-1 isolates from patients with herpetic keratitis. *Journal of Infectious Disease*, 198:659-663.

- Flores, E.F., Weiblen, R., Vogel, F.S.F., Dezengrini, R., Almeida, S.R., Spilki, F.R. & Roehe, P.M. 2009. Neuropatogênese experimental da infecção pelo herpesvírus bovino tipo 5 em coelhos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 29(1):1-16.
- Eriksson, B. Oberg, B. & Wahren, B. 1982. Pyrophosphate analogs as inhibitors of DNA polymerases of cytomegalovirus, herpes simplex virus and cellular origin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 696(2):115-123.
- Garré, B. van der Meulen, K., Nugent, J., Neytsd, J., Croubelsb, S., De Backerband, P. & Nauwynck, H. 2007. In vitro susceptibility of six isolates of equine herpesvirus 1 to acyclovir, ganciclovir, cidofovir, adefovir, PMEDAP and foscarnet. *Veterinary Microbiology*, 122(1-2):43-51.
- Kern, E.R., Glasgow, L.A., Overall, J.C. Jr., Reno, J.M. & Boezi, J.A. 1978. Treatment of experimental herpesvirus infections with phosphonoformate and some comparisons with phosphonoacetate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 14:817-823.
- Kern, E.R., Richards, J.T. & Overall, J.C. Jr. 1986. Acyclovir treatment of disseminated herpes simplex virus type 2 infection in weanling mice: alteration of mortality and pathogenesis. *Antiviral Research*, 6(4):189-195.
- Lee, B.J., Weiss, M.J., Moiser, D. & Chowdhury, S.I. 1999. Spread of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in the rabbit brain after intranasal inoculation. *Journal of Neurovirology*, 5(5):474-484.
- López-Cortés, L.F., Ruiz-Valderas, R., Lucero-Muñoz, M. J., Cordero, E., Pastor-Ramos, M.T., & Marquez, J. 2000. Intravitreal, retinal, and central nervous system foscarnet concentrations after rapid intravenous administration to rabbits. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(3):756-759.
- Maggs, D.J. & Clarke, H.E. 2004. In vitro efficacy of ganciclovir, cidofovir, penciclovir, foscarnet, idoxuridine and acyclovir against feline herpesvirus type-1. *American Journal of Veterinary Research*, 65(4):399-403.
- Marley, M.S., Givens, M.D., Stringfellow, D.A., Galik, P.K., Riddell, K.P. 2006. Effect of phosphonoformic acid in the development of bovine embryos in vitro. *Veterinary Therapeutics*, 7(2):156-166.
- Oliveira, M.S., Furian, A.F., Rambo, L.M., Ribeiro, L.R., Royes, L.F.F., Ferreira, J., Calixto, J.B. & Mello, C.F. 2008. Modulation of Pentylentetrazol-induced seizures by prostaglandin E₂ receptors. *Neuroscience*, 152:1110-1118.
- Öberg, B. Antiviral effects of phosphonophormate (PFA, foscarnet sodium). *Pharmacology & Therapeutics*, v. 40, n. 2, p. 213-285, 1989.
- Piret, J., Désormeaux, A., Gourde, P., Juhász, J. & Bergeron, G. 2000. Efficacies of topical formulations of Foscarnet and Acyclovir and of 5-percent Acyclovir ointment (Zovirax) in a murine model of cutaneous herpes simplex virus type 1 infection. *Antimicrobial Agents and*

- Chemotherapy, 44(1):30-38.
- Reed, L.J. & Muench, H.A. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Epidemiology*, 27(3):493-497.
- Rissi, D.R., Oliveira, F.N., Rech, R.R., Pierezan, F., Lemos, R.A.A. & Barros, C.S.L. 2006. Epidemiology, clinical signs and distribution of the encephalic lesions in cattle affected by meningoencephalitis caused by bovine herpesvirus-5. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 26(2):123-132.
- Rock, D.L., Lokensgard, J., Lewis, T. & Kutish, G. 1992. Characterization of dexamethasone-induced reactivation of latent bovine herpesvirus 1. *The Journal of Virology*, 66(4):2484-2490.
- Roizman, B., Desrosiers R.C., Fleckenstein B., Lopez C., Minson A.C. & Studdert M.J. 1992. The family Herpesviridae: an update. *Archives of Virology*, 123(3-4):432-445.
- Ropper, A.H., Brown, R.H. Adams and Victor's principles of neurology. Cardinal manifestations of neurologic disease, epilepsy and disorders of consciousness. 8th edition. Disponível em: <http://www.accessmedicine.com/content.aspx?aID=969414> Acesso: 31 de maio de 2007.
- Schwes, A., Pastoret, P.P., Vindevogel, H., Leroy, P., Aguilar-Setien, A. & Godart, M. 1980. Comparison of the effect of trisodium phosphonoformate on the mean plaque size of pseudorabies virus, infectious bovine rhinotracheitis virus and pigeon herpesvirus. *Journal of Comparative Pathology*, 90(4):625-633.
- Sicher, S.E. & Oh, J.O. 1981. Acyclovir Therapy of Neonatal Herpes Simplex Virus Type 2 Infections in Rabbits. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 20(4):503-507.
- Silva, A.M., Flores, E.F., Weiblen, R., Canto, M.C., Irigoyen, L.F., Roehe, P.M. & Sousa, R.S. 1999. Pathogenesis of meningoencephalitis in rabbits by bovine herpesvirus type-5 (BHV-5). *Revista de Microbiologia*, 30(1):22-31.
- Spruance, S.L., Freeman, D.J. & Shet, N.T. 1986. Comparision of Foscarnet cream, Acyclovir cream and, acyclovir ointment in the topical treatment of experimental cutaneus herpes simplex virus type 1 infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 30:196-198.
- Thiry, E., Vindevogel, H., Leroy, P., Pastoret, P.P., Schwes, A., Brochier, B., Anciaux, Y. & Hoyois, P. 1983. In vivo and in vitro effect of acyclovir on pseudorabies virus, infectious bovine rhinotracheitis virus and pigeon herpesvirus. *Annales Recherches Vétérinaires*, 14(3):233-245.
- Weiblen, R., Kreutz, L.C., Canabarro, T.F., Schuch, L.F. & Rebelatto, M.C. 1992. Isolation of bovine herpesvirus 1 from preputial swabs and semen of bulls with balanoposthitis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 4(3):341-343.
- Zar, J.H. 1999. Fischer exact test. 543-546. In: _____ (Ed.). *Bioestatistical Analysis*. 4th.edition. Prentice Hall, Upper Sadle River.

Quadro 1. Critérios utilizados para quantificar as manifestações clínicas em coelhos inoculados com o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) no saco conjuntival.

| Escore | Aparência das lesões oculares |
|--------|---|
| 0 | ausência de sinais oculares |
| 0,5 | hiperemia ou secreção serosa leve unilateral |
| 1,0 | hiperemia e secreção serosa leve unilateral ou hiperemia moderada unilateral |
| 1,5 | hiperemia e secreção serosa leve bilateral, com ou sem crostas (recuperação) |
| 2,0 | hiperemia e secreção serosa acentuada unilateral |
| 2,5 | hiperemia e secreção serosa moderada bilateral ou hiperemia e secreção serosa acentuada unilateral |
| 3,0 | hiperemia e secreção serosa acentuada bilateral ou hiperemia e secreção mucosa moderada bilateral |
| 3,5 | hiperemia e secreção seromucosa moderada bilateral acompanhadas de vesículas ou crostas unilaterais |
| 4,0 | Hiperemia e secreção seromucosa acentuada bilateral ou moderada e acompanhadas de vesículas ou crostas bilaterais |

Quadro 2. Efeitos do Foscarnet em coelhos inoculados com o herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5).

| Grupo | n ¹ | Período de incubação ² | Morbidade/mortalidade (%) |
|---|----------------|-----------------------------------|---------------------------|
| <i>Experimento I – Intranasal</i> | | | |
| CV ³ | 10 | 12 (5-15) | 9/10 (90) |
| PFA ⁴ | 10 | 24 (6-9) | 4/10 (40) |
| <i>Experimento II – Intranasal</i> | | | |
| CV | 6 | 9,7 (6-15) | 6/6 (100) |
| PFA | 6 | 17,5 (7-12) | 4/6 (66,7) |
| <i>Experimento III – Saco conjuntival</i> | | | |
| CV | 6 | 15 (11-18) | 6/6 (100) |
| PFA | 6 | 25 (12-20) | 3/6 (50) |
| <i>TOTAL</i> | | | |
| CV | 22 | - | 21/22 (95,7) |
| PFA | 22 | - | 11/22 (50) |

¹n: número de animais.

²Os valores do período de incubação são apresentados como média dos grupos e variação (mínima-máxima). Para análise estatística, calculou-se a mediana (Q50) dos períodos de incubação dos grupos PFA e CV nos três experimentos pelo teste U de Mann Whitney, não observando-se diferenças estatísticas. As medianas e os quartis (Q25 e Q75) foram de 9 (8-13) nos grupos CV e 23 (7,25-35) nos grupos PFA dos experimentos I e II. No experimento III foram de 15 (13,25-17,25) no CV e 27,5 (12,75-35) no PFA.

³CV: grupo controle de vírus.

⁴PFA: grupo tratado com o Foscarnet.

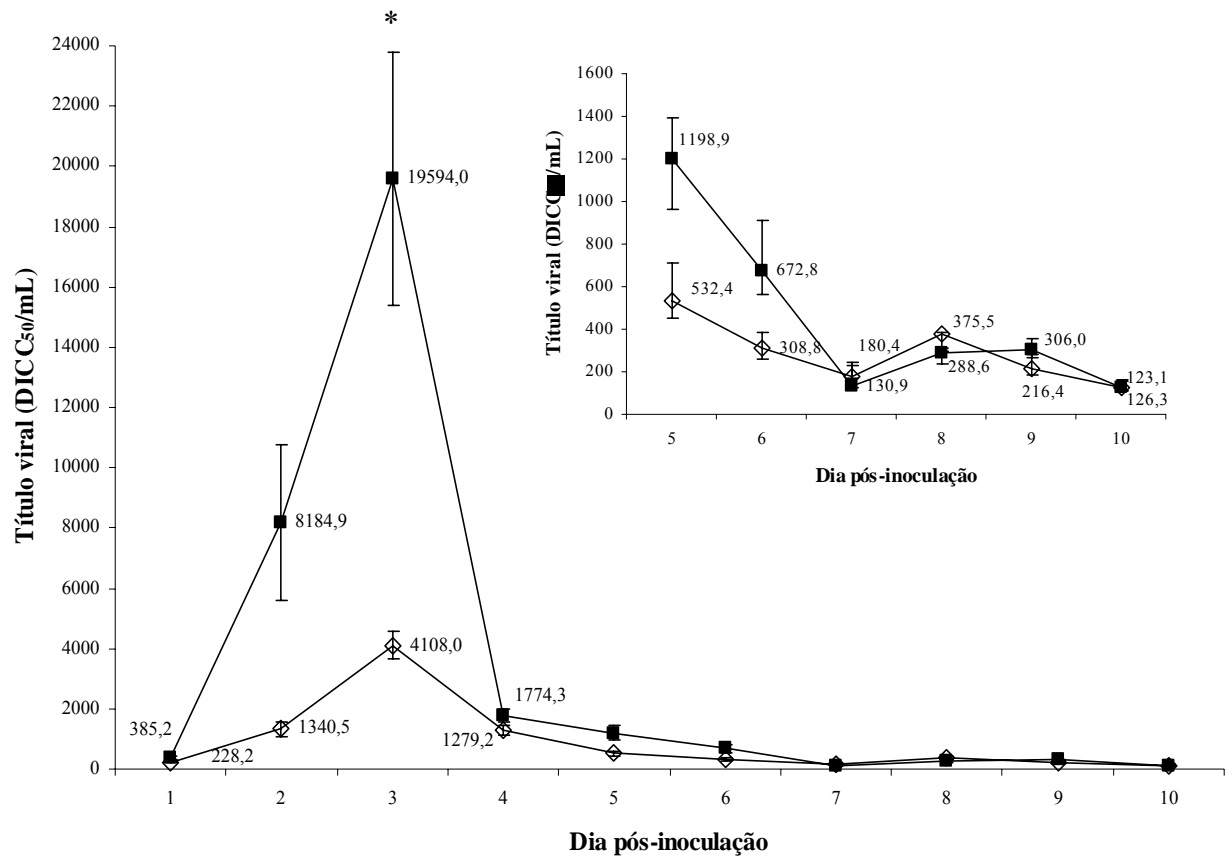


Fig 1. Excreção de vírus em secreções oculares dos coelhos inoculados no saco conjuntival (Experimento III) com o herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5), tratados com o Foscarnet (◇) ou mantidos como controles de vírus (■). Os pontos (◇,■) representam as médias dos títulos de vírus excretados, expressos em DICC₅₀/mL, com os respectivos erros-padrão. Os títulos virais médios entre os dias 5 e 10 pi estão apresentados no gráfico menor. * Diferença significativa [F(9,108) = 2,23; P<0,03)].

Quadro 3. Efeitos do Foscarnet em coelhos inoculados no saco conjuntival com o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1).

| Grupo | n ¹ | Excreção de vírus (dias) ² | Período de incubação ³ | Morbidade (%) | Curso clínico ⁴ |
|------------------|----------------|---------------------------------------|-----------------------------------|---------------|----------------------------|
| CV ⁵ | 9 | 9,3 (7-10) | 3,5 (1-4) | 8/9 (88,9) | 7,3 (4-13) |
| PFA ⁶ | 9 | 9,1 (7-10) | 7,1 (4-7)* | 6/9 (66,7) | 3,1 (2-7)* |

¹n: número de animais.

²Período médio, em dias, de excreção de vírus em secreções oculares. Entre parênteses são apresentados o período mínimo e máximo de excreção viral por animais dos respectivos grupos.

³São apresentadas a média do período de incubação e, entre parênteses, o maior e menor intervalo para o desenvolvimento dos sinais oculares. Esses valores foram convertidos a mediana (Q50) e quartis (Q25 e Q75) no teste não-paramétrico U de Mann Whitney. Essas medianas foram de 5 (4-12) para o grupo PFA e 3 (2-3,5) para o grupo CV. A diferença entre as medianas foi significativa ($P < 0,005$).

⁴A média de duração do curso clínico, em dias, bem como o maior e o menor intervalo para recuperação clínica são apresentados. A mediana (Q50) e os quartis (Q25 e Q75) foram 4 (0-5) no grupo PFA e 9 (4-9,5) no grupo CV. Essa diferença foi significativa ($P < 0,04$).

⁵CV: grupo controle de vírus.

⁶PFA: grupo tratado com o Foscarnet (PFA).

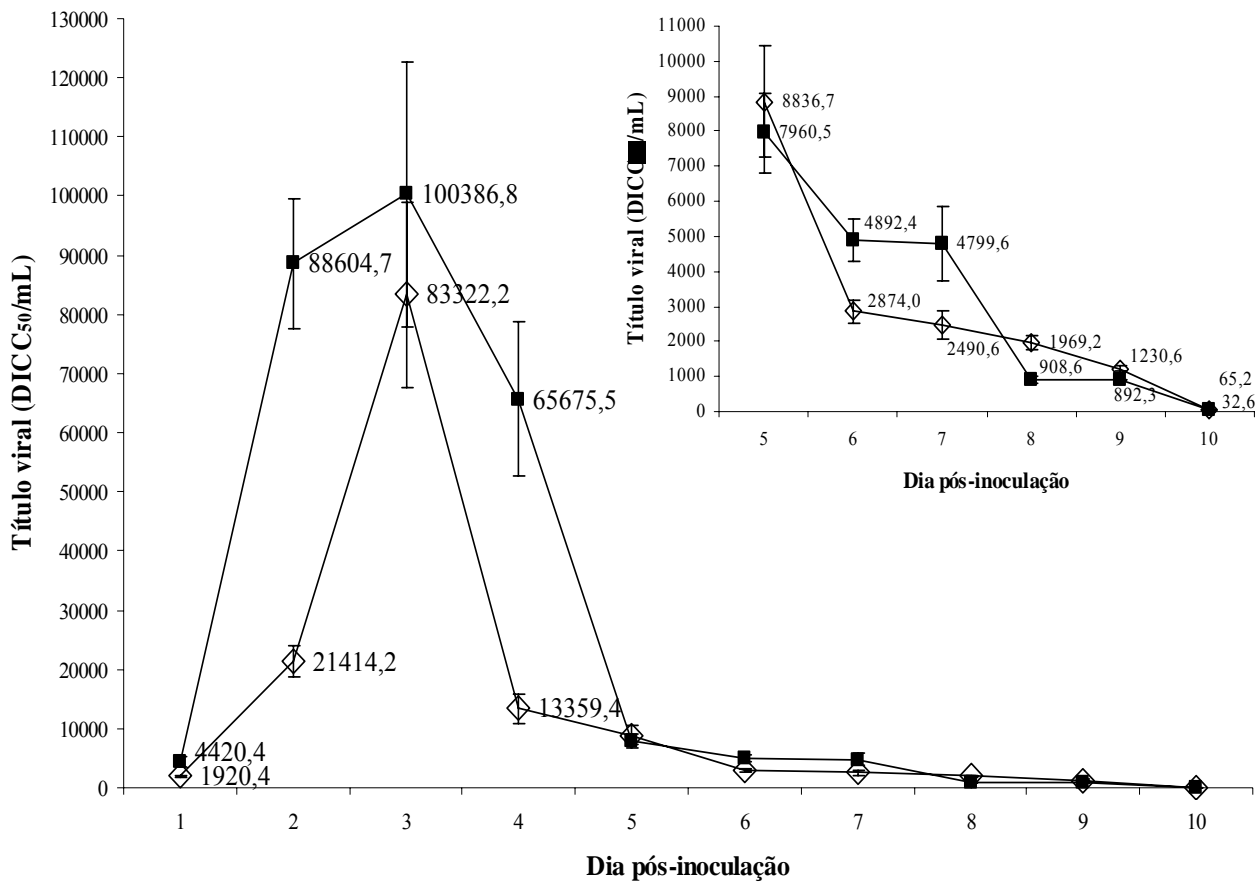


Fig 2. Excreção de vírus em secreções oculares de coelhos inoculados no saco conjuntival com o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), tratados com o Foscarnet (◇) ou mantidos como controles de vírus (■). Os pontos (◇,■) representam os títulos médios de vírus excretados, expressos em DICC₅₀/mL, com o respectivo erro padrão. Os títulos virais médios entre os dias 5 a 10 pi estão apresentados no gráfico menor.

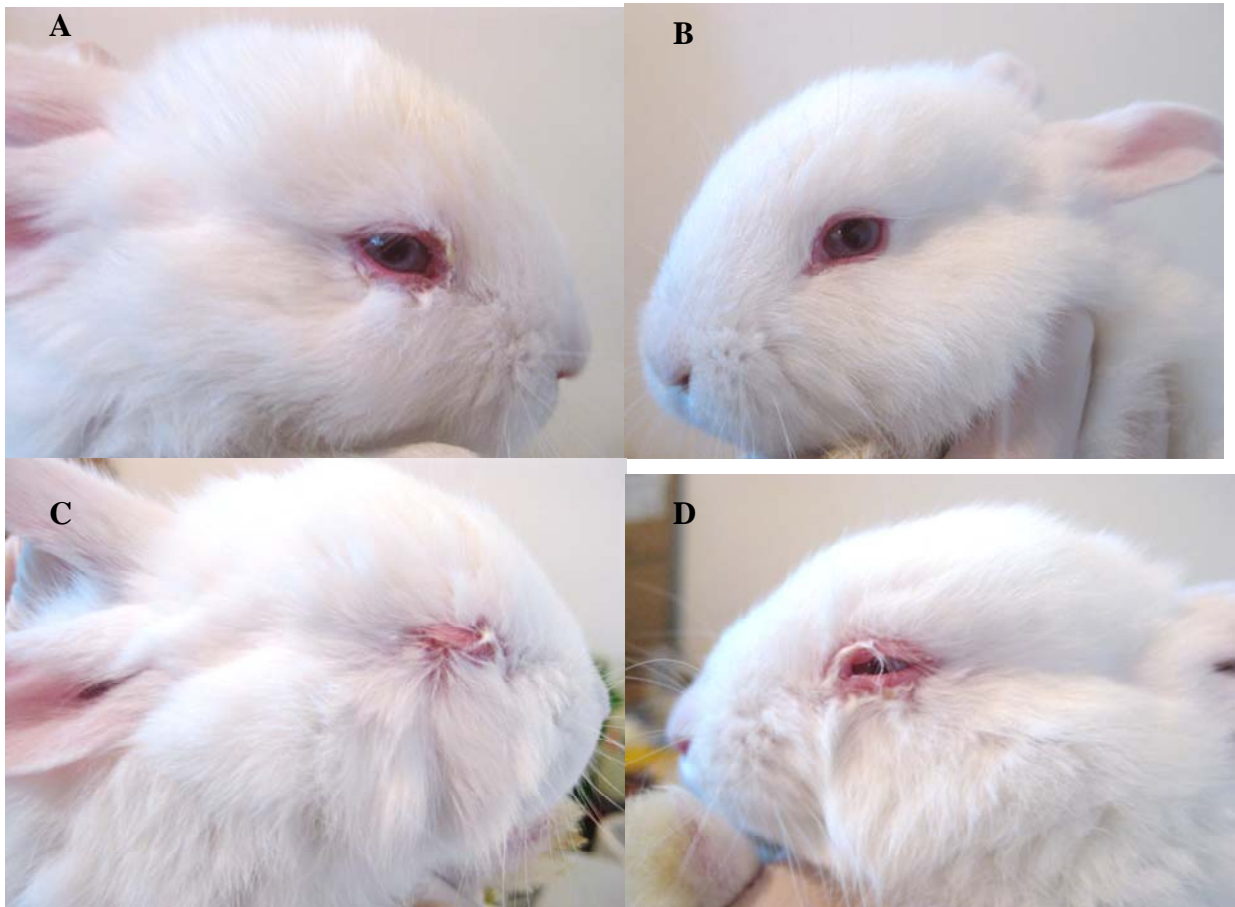


Fig 3. Sinais clínicos oculares de coelhos inoculados com o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) no saco conjuntival. Animal tratado com Foscarnet (grupo PFA) (A e B) e animal do grupo controle de vírus (C e D) no dia 5 pós-inoculação.

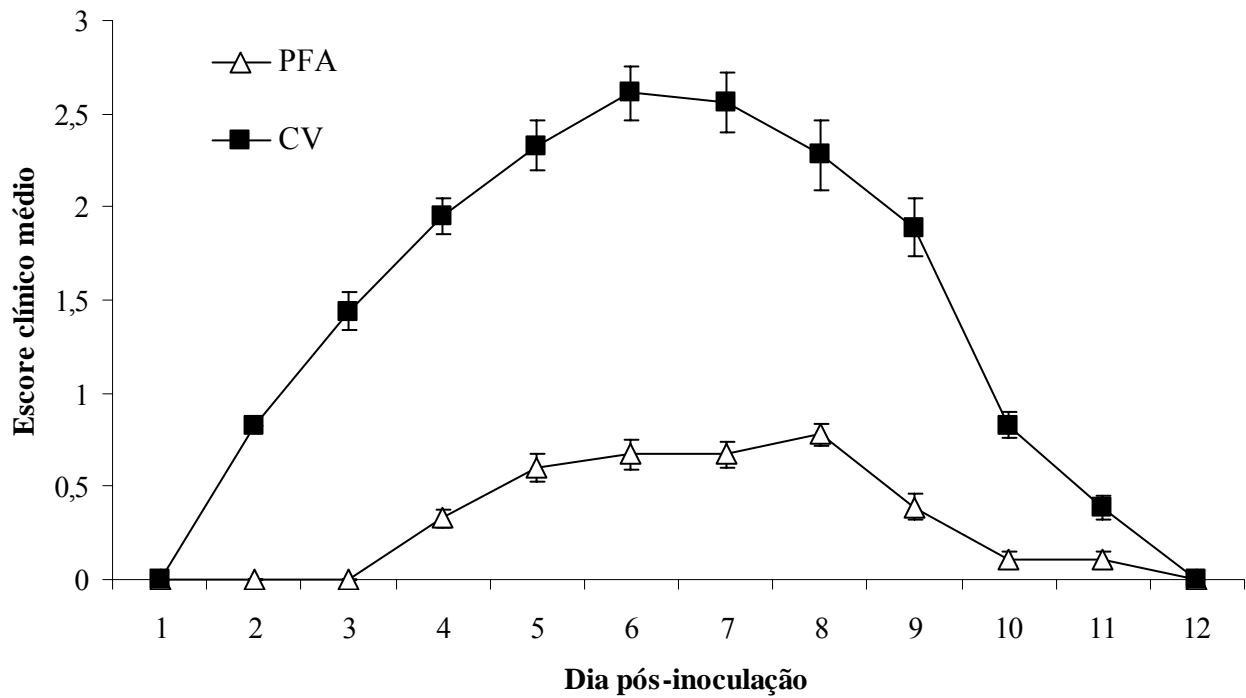


Fig 4. Escore clínico médio dos sinais clínicos oculares de coelhos inoculados com o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) no saco conjuntival e tratados com Foscarnet (grupo PFA) ou mantidos como controles de vírus (grupo CV). Os pontos representam as médias do escore clínico, com os respectivos erros-padrão. No gráfico menor é apresentado o somatório do escore clínico de cada grupo.

6. CAPÍTULO 5

Efeito de um inibidor da enzima óxido nítrico sintase induzível e terapia antiviral em coelhos inoculados com o herpesvírus bovino tipo 5

Effects of an inducible nitric oxide synthase inhibitor and antiviral therapy in rabbits inoculated with bovine herpesvirus type 5

Renata Dezengrini^I; Mauro Schneider Oliveira^{II}; Carlos Fernando Mello^{II}; Rudi Weiblen^{III};

Eduardo Furtado Flores^{III*}

^I Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

^{II} Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

^{III} Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciência Rurais (CCR), Setor de Virologia, UFSM, Santa Maria, 97105-900, RS, Brasil. E-mail: eduardofurtadoflores@gmail.com, Fone/fax: 55-32208034.

* Autor para correspondência.

RESUMO

A replicação do herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) no encéfalo de coelhos infectados experimentalmente é acompanhada de um aumento nos níveis de óxido nítrico (NO), que precede o desenvolvimento de doença neurológica. Estudos anteriores também demonstraram a atividade do antiviral Foscarnet (PFA) frente ao BoHV-5 *in vitro* e *in vivo*. No presente estudo, investigou-se o efeito da inibição da isoforma induzível da enzima óxido nítrico sintase (iNOS), associada ou não ao tratamento com o PFA, na infecção e doença neurológica pelo BoHV-5 em coelhos. Para isso, 24 coelhos inoculados com $10^{7,2}$ DICC₅₀ do BoHV-5 (cepa SV-507/99) pela via intranasal foram alocados em quatro grupos de seis animais cada: um grupo recebeu o inibidor da iNOS aminoguanidina (AG) na dose de 400 mg.kg^{-1} por dia pela via intraperitoneal (IP) entre os dias 2 e 6 pós-inoculação (pi); outro grupo foi tratado com PFA na dose de 100 mg.kg^{-1} IP por dia entre 8 horas e 10 dias pi; um terceiro grupo recebeu ambos os fármacos (AG+PFA); e outro grupo foi mantido como controle de vírus (CV). Animais de todos os grupos excretaram o vírus nas secreções nasais entre os dias 2 e 10 pi e desenvolveram doença neurológica, porém com diferentes frequências e períodos de incubação. Os índices de morbidade e mortalidade foram de 100% (6/6) nos grupos AG e CV; de 66,7% (4/6) no grupo PFA e de 83,3% (5/6) no grupo AG+PFA. O período de incubação da doença neurológica foi significativamente menor no grupo AG, comparando-se com os outros grupos ($P < 0,05$). Nesse grupo, os sinais neurológicos foram mais precoces e severos; e foram mais tardios no grupo AG+PFA. Esses resultados demonstram que o tratamento com PFA reduziu a morbidade e mortalidade associadas com a infecção pelo BoHV-5; e que o tratamento com AG resultou na antecipação e no agravamento do quadro neurológico. Assim, sugere-se que a indução da síntese de NO em resposta a infecção pode desempenhar uma função relevante na resposta imune inata contra o BoHV-5, visto que a sua inibição resultou em doença neurológica mais precoce e severa em coelhos infectados.

Palavras-chave: BoHV-5, óxido nítrico, iNOS, coelhos, aminoguanidina, Foscarnet, terapia antiviral.

ABSTRACT

The replication of bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) in the brain of experimentally infected rabbits is accompanied by an increase in nitric oxide (NO) levels, which precedes the development of neurological disease. Previous studies also demonstrated the activity of the antiviral Foscarnet (PFA) against BoHV-5 *in vitro* and *in vivo*. Here we investigated the effect of the inhibition of the inducible nitric oxide synthase (iNOS), associated or not with PFA, on the neurological infection and disease by BoHV-5 in rabbits. Twenty four rabbits were inoculated intranasally with $10^{7.2}$ TCID₅₀ of BoHV-5 (strain SV-507/99) and distributed in four groups of six animals each: one group received the iNOS inhibitor aminoguanidine (AG) at 400 mg.kg⁻¹ intraperitoneally (IP) per day between days 2 and 6 post-inoculation (pi); another group received PFA at 100 mg.kg⁻¹ IP per day, between 8 hours and 10 days pi; a third group received both AG and PFA and the fourth group was maintained as virus control. Animals from all groups shed virus in nasal secretions between days 2 and 10 pi, and developed neurological disease, however with different frequencies and incubation periods. Morbidity and mortality rates were 100% (6/6) in the groups AG and CV, 66.7% (4/6) in the group PFA and 83.3% (5/6) in the group AG+PFA. The incubation period of neurological disease was significantly reduced in animals of group AG comparing to the other groups ($P < 0.05$). The onset of neurological disease occurred earlier and the signs were more severe in the animals of group AG; and delayed in the group AG+PFA. These results demonstrate that PFA-treatment reduced the morbidity and mortality rates associated with BoHV-5 infection; and that AG treatment anticipated and aggravated the neurological signs. We therefore suggest that NO production in response to virus infection may

be an important component of the innate immune response against BoHV-5, since iNOS inhibition resulted in an earlier and more severe neurological disease.

Keywords: BoHV-5, nitric oxide, iNOS, rabbits, aminoguanidine, Foscarnet, antiviral therapy.

INTRODUÇÃO

O herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) é um alfa herpesvírus que produz meningoencefalite não-suprativa, frequentemente fatal em bovinos jovens (BAGUST & CLARK, 1972; BELKNAP et al., 1994). A infecção experimental de coelhos resulta no desenvolvimento de sinais neurológicos semelhantes aos apresentados por bovinos infectados e, assim, a patogenia da infecção neurológica pelo BoHV-5 tem sido estudada nessa espécie (LEE et al., 1999; SILVA et al., 1999; CARON et al., 2002; FLORES et al., 2009). Após a inoculação intranasal (IN), o vírus replica na mucosa nasal e é transportado ao sistema nervoso central (SNC), preferencialmente pela via olfatória, onde ocorre replicação lítica e/ou estabelecimento de infecção latente (LEE et al., 1999; CARON et al., 2002).

A resposta imune inata contra os herpesvírus é mediada pela síntese de interferon (IFN) α e β , interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) (BREDER et al., 1988; BABIUK et al., 1996). Essas citocinas, além de IFN- γ e componentes virais, são responsáveis pela expressão da isoforma induzível da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) durante as infecções (AKAIKE & MAEDA, 2000). Essa enzima cataliza a reação de formação do óxido nítrico (NO) em células da micróglia e em astrócitos no SNC, em quantidades muito superiores (10 a 100 vezes) às produzidas pelas isoformas constitutivas em células endoteliais e neurônios (AKAIKE & MAEDA, 2000; PACHER et al., 2007). Apesar da importância do NO na defesa do organismo contra fungos e bactérias, em que a supressão da síntese dessa molécula pode levar a deficiências na eliminação de infecções bacterianas, a função do NO em infecções virais ainda é pouco

conhecida (AKAIKE & MAEDA, 2000).

Nas infecções produzidas por alguns vírus, o NO exerce função antiviral pela inibição da replicação de DNA e da síntese de proteínas tardias. A atividade antiviral do IFN γ contra o vírus do herpes simplex 1 (HSV-1) é mediada, em parte, pela síntese de NO (CROEN, 1993). Neste sistema, demonstrou-se a diminuição nos títulos do HSV-1 *in vitro* pelo NO produzido por macrófagos (CROEN, 1993). Porém, a resposta imune inata mediada por células da microglia não impede a disseminação do HSV-1 e a progressão da doença neurológica em camundongos (MARQUES, 2006; MARQUES et al., 2008). Além disso, a resposta inflamatória e infiltração intensa de células inflamatórias são diretamente relacionadas à encefalite fatal pelo HSV-1 em camundongos (LUNDBERG et al., 2008). Em alguns estudos, a aplicação de inibidores da NOS em camundongos infectados com o HSV-1 reduziu a gravidade e a mortalidade resultantes (FUJII et al., 1999), ou ainda os níveis do mRNA da iNOS e a carga viral do HSV-1 no SNC (MEYDING-LAMMADÉ et al., 2002). Em outros estudos, o tratamento resultou no agravamento das manifestações clínicas e na detecção de títulos virais superiores em secreções e tecidos (BENENCIA et al., 2001; GAMBA et al., 2004; KEADLE et al., 2005).

Acredita-se que o NO possui função neuroprotetora no início de infecções neurológicas por herpesvírus, porém com a disseminação viral e a síntese excessiva dessa molécula, pode resultar em neurotoxicidade (FUJII et al., 1999; SERRANO et al., 2002). A neurotoxicidade do NO e seus intermediários é relacionada à fragmentação de DNA, nitrosilação de proteínas, peroxidação de lipídios, inibição da citocromo C oxidase, indução de apoptose ou necrose, aumento de permeabilidade da barreira hematoencefálica, disfunção na condução de impulsos nervosos e, na indução de convulsões (HOOPER et al., 2001; PACHER et al., 2007; ROYES et al., 2007).

Portanto, terapias que associam inibidores da iNOS e antivirais poderiam permitir uma

redução nos níveis de NO e, em consequência, evitar ou reduzir os efeitos tóxicos da produção excessiva dessa molécula, aliada à redução nos títulos de vírus que invadem e replicam no SNC (FUJII et al., 1999; MEYDING-LAMADÉ et al., 2002).

Um aumento nos níveis de NO foi correlacionado à disseminação do BoHV-5 no encéfalo de coelhos infectados (DEZENGRINI et al., 2009). O significado deste achado no entanto permanece desconhecido, pois estudos anteriores haviam demonstrado que a ação do NO no SNC pode ser tanto benéfica quanto deletéria. Atividade antiviral moderada do NO contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) *in vitro* já foi relatada (GUPTA et al., 1999), mas a função biológico dessa molécula durante a infecção *in vivo* pelo BoHV-1, bem como a sua função durante a infecção *in vitro* e *in vivo* pelo BoHV-5 permanecem desconhecidos.

A aminoguanidina (AG) inibe a atividade da L-arginina em formar NO, na reação catalizada pela NOS. Para inibir as isoformas constitutivas, a AG necessita da presença de cofatores, possuindo maior especificidade para a iNOS (WOLFF & LUBESKIE, 1995). O Foscarnet (PFA) é um análogo sintético do pirofosfato que impede que a DNA polimerase viral complete seu ciclo catalítico. Esse antiviral é utilizado no tratamento de infecções herpéticas em humanos, principalmente aquelas produzidas por amostras virais resistentes ao Aciclovir ou Ganciclovir (COEN & RICHMAN, 2007). A ação do PFA na inibição da replicação dos herpesvírus bovino 1, 2 e 5 (BoHV-1, BoHV-2 e BoHV-5) foi demonstrada *in vitro*, e em coelhos inoculados com o BoHV-1 e BoHV-5 (DEZENGRINI et al., 2009a, submetido).

O objetivo deste trabalho foi investigar a participação da biogênese do NO na patogenia da infecção aguda pelo BoHV-5 em coelhos, pela inibição seletiva da iNOS com a AG, associada ou não ao tratamento com o antiviral PFA.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho experimental

Coelhos inoculados com o BoHV-5 foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos e receberam diferentes tratamentos nos dias seguintes à inoculação: aminoguanidina (grupo AG); Foscarnet (grupo PFA); ambos os fármacos (AG+PFA) ou foram mantidos como controles de vírus não-tratados (CV). Os índices de morbidade e mortalidade, período de incubação e severidade dos sinais clínicos foram comparados entre os grupos.

Células, vírus e fármacos

Células MDBK (ATCC CCL-22) cultivadas em meio essencial mínimo (MEM)^a e suplementadas com 5% de soro equino (SE), 100 U.mL⁻¹ de penicilina e 100 µg.mL⁻¹ de estreptomicina^b foram utilizadas para a amplificação, isolamento e quantificação viral. A cepa de BoHV-5 SV-507/99, já sequenciada e caracterizada (DELHON et al., 2003) foi utilizada para inocular os animais. O inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) aminoguanidina^c (AG) e o antiviral Foscarnet^c (PFA) foram aliquotados, mantidos em temperatura ambiente e diluídos em água ultrapura imediatamente antes da aplicação e conforme recomendações do fabricante.

Animais, inoculação viral, tratamentos e monitoramento

Coelhos da raça Nova Zelândia recém desmamados (aproximadamente 25-30 dias de idade) foram inoculados pela via IN com 0,5 mL de uma suspensão do BoHV-5 SV-507/99 contendo 10^{7,2} doses infectantes para 50% dos cultivos celulares por mL (DICC₅₀.mL⁻¹) sob anestesia com tiletamina e zolazepan (Zoletil 50^d, 30 mg.kg⁻¹ via intramuscular). Em seguida, esses animais foram alocados em quatro grupos: o grupo AG (n=6) recebeu 400 mg.kg⁻¹ por dia de AG pela via intraperitoneal (IP), em aplicações a cada 12 horas, entre os dias 2 e 7 pós-inoculação (pi). No grupo PFA (n=6), aplicou-se o fármaco (100 mg.kg⁻¹ por dia) entre 8 horas pi

e 10 dias pi, a cada 8 horas, pela via IP. O grupo AG + PFA (n=6) recebeu ambos os fármacos nos mesmos períodos e concentrações descritos acima; e o grupo CV (n=6) consistiu no grupo controle de vírus, recebendo pela via IP volume equivalente (200 µL) de água ultrapura. Quatro animais foram incluídos como controles dos fármacos, após inoculação com 0,5 mL de MEM pela via IN sob anestesia. Esses animais receberam AG (grupo C-AG, n=2) ou PFA (grupo C-PFA n=2) pela via IP nas mesmas doses e períodos citados.

Foram realizadas três observações clínicas diárias, além de monitoramento virológico pela coleta de suabes nasais a cada 48 h, entre os dias 2 e 10 pi. Para a coleta dos suabes nasais, os animais foram sedados com cloridrato de xilazina^d. Os suabes foram acondicionados em tubos com 0,5 mL de MEM 2X (contendo 2X a concentração de antibióticos) e armazenados a -80°C. Os animais que apresentaram sinais neurológicos foram anestesiados com quetamina^d e cloridrato de xilazina, e submetidos à eutanásia pela administração de tiopental sódico^e intracardiaco. Diferentes secções do encéfalo desses animais foram coletadas e armazenadas a -80°C para isolamento viral.

Os procedimentos com animais foram conduzidos sob supervisão veterinária e de acordo com as recomendações da COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade (aprovação 23081.012136/2007-90, em 27 de agosto de 2007).

Isolamento de vírus das secreções nasais e tecidos

Os suabes foram drenados e 100 µL foram inoculados em monocamadas de células MDBK conforme protocolo descrito por VOGEL et al. (2003). Secções do SNC de animais que apresentaram doença neurológica foram maceradas em areia estéril e homogenizadas em MEM 2X na proporção de 1:5 (peso x volume). Após centrifugação a 2000 x g, 200 µL do sobrenadante foram inoculados em monocamadas de células MDBK, e incubadas por duas horas a 37°C em

estufa de CO₂ a 5%. O inóculo foi removido, as monocamadas lavadas com MEM 2X, o meio de cultivo (MEM contendo 5% SE) foi repostado.

As placas contendo as células inoculadas foram incubadas a 37°C em estufa de CO₂ a 5%, e monitoradas por cinco dias para a apresentação de efeito citopático (ECP). Duas passagens subsequentes foram realizadas, considerando-se negativas as amostras que não produziram ECP ao final da terceira passagem.

Análise estatística

O valores (número de dias) dos períodos de incubação nos 4 grupos foram submetidos à análise estatística pelo teste não paramétrico de Kruskal-Whallis (análise de variância de uma via), seguido do teste de comparação múltipla de Dunn quando necessário, em que a probabilidade de $P < 0,05$ foi considerada significativa, usando-se o SPSS^f.

RESULTADOS

Todos os coelhos inoculados com o BoHV-5 excretaram o vírus nas secreções nasais, por 5 a 10 dias, indicando que o vírus replicou com eficiência na mucosa nasal. A excreção viral nas secreções nasais não resultou em diferenças nos títulos de vírus nos dias 2, 4 e 6 pi (dados não apresentados).

Animais de todos os grupos desenvolveram doença neurológica, porém com diferenças no período de incubação, na frequência e severidade dos sinais neurológicos (Tabela 1). Os sinais clínicos não diferiram muito entre os grupos e foram caracterizados por depressão, nistagmo, olhar fixo, opistótono, bruxismo, andar em círculos e convulsões. Além desses sinais, no grupo AG observou-se hiperexcitação.

As medianas dos períodos de incubação para os diferentes grupos, bem como o intervalo interquartil de cada grupo (AG, PFA, AG+PFA e CV) são apresentados na Figura 1. A redução

no período de incubação, e consequente apresentação precoce de sinais neurológicos pelo grupo AG foi significativa ($P < 0,05$), quando comparada com o período de incubação dos outros três grupos.

As taxas de morbidade e mortalidade foram de 100% (6/6) nos grupos AG e CV, 66,7% (4/6) no grupo PFA e 83,3% (5/6) no grupo AG+PFA. Os índices de mortalidade e a distribuição temporal do desenvolvimento de doença neurológica pelos animais submetidos aos diferentes tratamentos são apresentados na Figura 1. Os três animais sobreviventes, dois do grupo PFA e um do grupo AG+PFA, foram monitorados clinicamente até o dia 35 pi.

Várias regiões do encéfalo dos animais que apresentaram sinais neurológicos foram positivas para vírus, indicando que os sinais neurológicos apresentados pelos animais foram decorrentes da replicação do BoHV-5 no SNC. No entanto, não foram observadas diferenças evidentes nos padrões de distribuição de vírus nas secções do encéfalo dos animais dos diferentes grupos (resultados não apresentados). Animais dos grupos C-AG e C-PFA (controles dos fármacos) permaneceram sem alterações clínicas durante o período de acompanhamento.

DISCUSSÃO

No presente estudo investigou-se o efeito da inibição da síntese de NO, associada ou não ao tratamento com um antiviral, na patogenia da infecção neurológica pelo BoHV-5 em coelhos. A hipótese que norteou este experimento foi formulada com base em estudos anteriores que demonstraram um aumento significativo do NO em regiões do encéfalo de coelhos durante a infecção neurológica aguda pelo BoHV-5 (DEZENGRINI et al., 2009). Hipotetizou-se então que a produção excessiva do NO, estimulada como parte dos mecanismos de defesa inata contra a infecção, poderia resultar em toxicidade e disfunção neuronal, levando ao desenvolvimento de sinais neurológicos. De acordo com essa hipótese, a inibição da síntese excessiva de NO – e a

consequente manutenção de níveis basais – poderiam resultar no abrandamento e/ou na prevenção do desenvolvimento dos sinais neurológicos. Assim, utilizou-se um inibidor da isoforma induzível da enzima óxido nítrico sintase - iNOS (aminoguanidina, AG), associado ou não com o PFA, um antiviral cuja atividade contra o BoHV-5 havia sido demonstrada *in vitro* e *in vivo* (DEZENGRINI et al., submetido, 2009a, 2009b).

Os resultados obtidos com o grupo tratado com AG, apesar de preliminares e dependentes de estudos mais detalhados, parecem não suportar integralmente esta hipótese. Esses indicam que a síntese de NO em determinados níveis pode ser necessária para limitar ou restringir a replicação do BoHV-5 no encéfalo de coelhos, pois a aplicação do inibidor na iNOS AG na dose de 400 mg.kg⁻¹ resultou na antecipação e no agravamento da doença neurológica no modelo experimental. Já o efeito do PFA, reduzindo a morbidade e mortalidade pela infecção com o BoHV-5, confirma observações anteriores (DEZENGRINI et al., 2009b, submetido). Os efeitos da associação AG+PFA no presente experimento são de difícil interpretação, uma vez que esses animais apresentaram um retardo no desenvolvimento da doença neurológica. De qualquer forma, os resultados aqui apresentados são compatíveis com uma função do NO na patogenia da infecção neurológica pelo BoHV-5, seja pela toxicidade neuronal, quando em níveis excessivos, ou pela atividade restritiva à replicação viral, quando em níveis apropriados.

Se a inibição da iNOS resultasse em redução da morbidade e mortalidade, poderia se constituir em uma alternativa terapêutica e, assim, associada ou não à terapia antiviral com o PFA, poderia-se reduzir a toxicidade mediada pelo NO, aliada à redução da replicação e/ou dos títulos de vírus no encéfalo. No entanto, observou-se que os coelhos tratados com AG desenvolveram sinais neurológicos mais precoces e severos quando comparados aos animais dos outros três grupos. Além dos sinais neurológicos observados nos outros grupos, observou-se hiperexcitação e vocalização nesses animais, que antecederam os episódios convulsivos. Esses

resultados indicam que a administração do inibidor da iNOS pode ter resultado em uma supressão excessiva dos níveis de NO. Considerando-se os efeitos protetores do NO frente a vírus neurotrópicos (BENENCIA et al., 2001; GAMBA et al., 2004; KEADLE et al., 2005), é possível que determinados níveis dessa molécula sejam necessários como parte dos mecanismos de defesa inata contra a infecção. Assim, a inibição de sua síntese – e a consequente redução excessiva nos seus níveis no encéfalo – podem ter contribuído para a antecipação e exacerbação da doença neurológica em coelhos.

Os resultados observados no grupo AG são semelhantes aos relatados por Benencia et al. (2001). Esses autores relataram o aumento da gravidade dos sinais oculares, dos títulos de vírus nas secreções oculares e no SNC, e da mortalidade, possivelmente associados à redução da atividade antiviral do NO em camundongos infectados com o HSV-1 e tratados com AG. Da mesma forma, camundongos com infecção respiratória pelo HSV-1 que receberam AG pela via intranasal entre os dias -2 e 1 pi apresentaram sinais mais graves de pneumonite e um aumento nos títulos de vírus nos pulmões e no SNC (GAMBA et al., 2004). Camundongos com infecção ocular pelo HSV-1 tratados com 400 mg.kg⁻¹ IP por dia de AG entre os dias 1 e 14 pi apresentaram um aumento da mortalidade. No entanto, os títulos virais nas secreções oculares e no SNC não foram alterados (KEADLE et al., 2005). Estes autores sugerem uma função do NO produzido pela iNOS no controle da replicação viral no início da infecção nasal pelo HSV-1. Cabe ressaltar que o tratamento com a AG nesses estudos foi iniciado previamente à inoculação com o HSV-1, ou ainda no dia 1 pi, em períodos que antecedem a síntese excessiva de NO. Assim, é possível que a inibição da iNOS tenha ocorrido em uma fase em que o NO ainda teria função neuroprotetora, e não neurotóxica.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que, a exemplo do que foi observado por BENENCIA et al. (2001) e GAMBA et al. (2004) para o HSV-1, a síntese de NO via iNOS

pode ser benéfica, e não neurotóxica, no início da infecção pelo BoHV-5. Essa função na imunidade inata provavelmente depende dos níveis de NO produzidos, não podendo se descartar que ocorra neurotoxicidade quando os níveis são excessivos. Contudo, a supressão da iNOS, e a consequente redução nos níveis protetores de NO também podem ser prejudiciais e propiciar o desenvolvimento de sinais neurológicos mais precoces e intensos em coelhos infectados pelo BoHV-5.

Outra hipótese para explicar os achados do presente experimento seria que a inibição excessiva da síntese de NO no SNC poderia influenciar a função neuronal e a vasodilatação moduladas por essa molécula. Outros estudos com vírus neurotrópicos relatam o uso de doses de AG de até 800 mg.kg⁻¹ por dia por períodos variáveis (BENENCIA et al., 2001; UBOL et al., 2001; GAMBA et al., 2004). Contudo, cabe ressaltar que, neste estudo, optou-se pelo início das aplicações de AG no dia 2 pi, que antecede a detecção de aumento nos níveis de NO no SNC de coelhos infectados com o BoHV-5, selecionando-se uma dose intermediária de AG. O objetivo foi de inibir a síntese excessiva de NO, implicada em neurotoxicidade e disfunção neuronal, sem alterar os níveis fisiológicos dessa molécula (DEZENGRINI et al., 2009).

Comparando-se o período de incubação médio para desenvolvimento de doença neurológica, observa-se que os animais do grupo AG+PFA apresentaram um desenvolvimento mais tardio de sinais em relação aos outros três grupos. Esses sinais foram observados principalmente após a interrupção do tratamento. Esse retardo poderia representar uma interação positiva entre os fármacos, pois o antiviral reduziria os títulos de vírus que invadem ao SNC e, em contrapartida, o inibidor da iNOS reduziria os efeitos neurotóxicos da síntese excessiva de NO (FUJII et al., 1999; MEYDING-LAMADÉ, 2002). Nesse sentido, estudos adicionais com tratamento mais prolongado com ambos os fármacos, e doses inferiores de AG aplicadas a partir do dia 3 pi, aliados à quantificação de vírus e produtos tóxicos do NO, podem fornecer maiores

esclarecimentos sobre esse achado. Os índices de morbidade e mortalidade no grupo AG+PFA foram, no entanto, superiores àqueles apresentados pelo grupo PFA, indicando que a redução na mortalidade nesses dois grupos, em relação ao grupo AG e controle, possivelmente foi devida ao efeito do antiviral.

CONCLUSÃO

A administração do inibidor da iNOS em coelhos infectados com o BoHV-5 resultou no desenvolvimento de sinais neurológicos mais precoces e severos. Considerando-se que a administração desse fármaco provavelmente resultou na inibição da iNOS e, possivelmente, na redução dos níveis de NO necessários para uma suposta atividade antiviral, é possível que essa molécula faça parte da resposta inata frente à infecção pelo BoHV-5. Essa hipótese não invalida um possível efeito nocivo de níveis excessivos do NO, produzindo toxicidade e disfunção neuronal.

COMISSÃO DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Os animais foram manipulados de acordo com as recomendações do COBEA (Comitê Brasileiro em Experimentação Animal), e os procedimentos aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM (aprovação #23081.012136/2007-90 de 03.09.2007).

FONTES DE AQUISIÇÃO

^aInvitrogen Brasil LTDA, São Paulo, SP, Brasil.

^bNutricell nutrientes celulares LTDA, Campinas, SP, Brasil.

^cSigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA.

^dVirbac do Brasil Ind. E Com. LTDA, São Paulo, SP, Brasil.

^eCristália, Produtos Químicos e Farmacêuticos LTDA, Itapira, SP, Brasil.

^fSPSS, Chicago, IL, EUA.

REFERÊNCIAS

- AKAIKE, T.; MAEDA, H. Nitric oxide and virus infection. **Immunology**, v. 101, n. 3, p. 300-308, 2000. Doi: 10.1046/j.1365-2567.2000.00142.
- BABIUK, L.A. et al. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. **Veterinary Microbiology**, v. 43, n. 1-2, p. 31-42, 1996. Doi: 10.1016/S0378-1135(96)01232-1
- BAGUST, T.J.; CLARK L. Pathogenesis of meningoencephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 82, n. 4, p. 375-383, 1972.
- BELKNAP, E. et al. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 1.3. **Veterinary Pathology**, v. 31, n. 3, p. 358-365, 1994.
- BENENCIA, F. et al. Effect of aminoguanidine, a nitric oxide synthase inhibitor, on ocular infection with herpes simplex virus in balb/c mice. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 42, n. 6, p. 1277-1284, 2001.
- BREDER, C.D. et al. Interleukin 1 immunoreactive innervation of the human hypothalamus. **Science**, v. 240, n. 4850, p. 321-324, 1988. Doi: 10.1126/science.3258444.
- CARON, L. et al. Latent infection by bovine herpesvirus type-5 in experimentally infected rabbits: virus reactivation, shedding and recrudescence of neurological disease. **Veterinary Microbiology**, v. 84, n.4, p. 285-295, 2002.
- CROEN, K. D. Evidence for antiviral effect of nitric oxide. Inhibition of herpes simplex virus type 1 replication. **Journal of Clinical Investigation**, v. 91, n. 6, p. 2446-2452, 1993. Doi: 10.1172/JCI116479.

- COEN, D.M.; RICHMAN, D.D. Antiviral Agents. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**, 5 ed. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2007. Cap. 14, p. 447-479, 2007.
- DELHON, G. et al. Genome of bovine herpesvirus type 5. **Journal of Virology**, v.77, n.19, p. 10339-10347, 2003. Doi: 10.1128/JVI.77.19.10339-10347.2003.
- 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. Doi: 10.1080/13550280802578067.
- DEZENGRINI, R. et al. Atividade *in vitro* do Aciclovir, Ganciclovir e Foscarnet nos herpesvírus bovino tipos 1, 2 e 5. **Ciência Rural**, submetido, 2009a.
- DEZENGRINI, R. et al. O Foscarnet reduz a excreção viral e os sinais clínicos em coelhos infectados experimentalmente com os herpesvírus bovino tipos 1 e 5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, submetido, 2009b.
- 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. Doi: 10.1590/S0100-736X2009000100001.
- FUJII, S. et al. Role of nitric oxide in pathogenesis of herpes simplex vírus encephalitis in rats. **Virology**, v. 256, p. 203-212, 1999. Disponível em: Doi: 10.1006/viro.1999.9610.
- GAMBA, G. et al. Early inhibition of nitric oxide production increases HSV-1 intranasal infection. **Journal of Medical Virology**, v. 73, n. 2, p. 313-322, 2004. Doi: 10.1002/jmv.20093.
- GUPTA, P.K. et al. Induction of nitric oxide in bovine peripheral blood mononuclear cells by bovine herpesvirus 1. **Acta Virologica**, v. 43, n. 5, p. 321-324, 1999.
- HOOPER, D.C. et al. The central nervous system inflammatory response to neurotropic virus infection is peroxynitrite dependent. **Journal of Immunology**, v. 167, n. 6, p. 3470-3477, 2001.

- KEADLE, T.L. et al. The effects of aminoguanidine on primary and recurrent ocular herpes simplex virus infection. **Nitric oxide**, v. 13, n. 4, p. 247-253. Doi: 10.1016/j.niox.2005.07.007.
- LEE, B.J. et al. Spread of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in the rabbit brain after intranasal inoculation. **Journal of Neurovirology**, v. 5, n. 1, p. 474-484, 1999.
- LUNDBERG, P. et al. The immune response to herpes simplex virus type 1 infection in susceptible mice is a major cause of CNS pathology resulting in fatal encephalitis. **Journal of Virology**, v. 82, n. 14, p. 7078-7088, 2008. doi:10.1128/JVI.00619-08.
- MARQUES, C.P. Microglial cells initiate vigorous yet non-protective immune responses during HSV-1 brain infection. **Virus Research**, v. 121, n. 1, p. 1-10, 2006. Doi: 10.1016/j.virusres.2006.03.009
- MARQUES, C.P. Microglia are the major cellular source of inducible nitric oxide synthase during experimental herpes encephalitis. **Journal of Neurovirology**, v. 14, n. 3, p. 229-238, 2008. Doi: 10.1080/13550280802093927.
- MEYDING-LAMADÉ, U. et al. Experimental herpes simplex virus encephalitis: inhibition of the expression of inducible nitric oxide synthase in mouse brain tissue. **Neuroscience Letters**, v. 318, n. 1, p. 21-24, 2002. Doi: 10.1016/S0304-3940(01)02469-7.
- PACHER, P. et al. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 315-424, 2007. Doi: 10.1152/physrev.00029.2006.
- ROYES, L.F.F. et al. The role of nitric oxide on the convulsive behavior and oxidative stress induced by methylmalonate: An electroencephalographic and neurochemical study. **Epilepsy Research**, v. 73, n. 3, p. 228-237, 2007. Doi: 10.1016/j.eplepsyres.2006.10.009.
- SERRANO, F. et al. Pseudorabies virus-induced expression of nitric oxide synthase isoforms. **Physiology & Behavior**, n.77, p.557-563, 2002. Doi: 10.1016/S0031-9384(02)00913-7.
- SILVA, A.M. 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. Doi: 10.1590/S0001-37141999000100005.

UBOL, S. et al. Inducible nitric oxide synthase inhibition delays death of rabies virus-infected mice. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 238-242, 2001.

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 Virology**, v. 41, n. 10, p. 4512-4520, 2003. Doi: 10.1128/JCM.41.10.4512-4520.2003.

WOLFF, D. J.; LUBESKIE, A. Aminoguanidine is an isoform-selective, mechanism-based inactivator of nitric oxide synthase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 316, n.1, p. 290-301, 1995. Doi: 10.1006/abbi.1995.1040.

Tabela 1. Efeitos do tratamento com aminoguanidina (AG), Foscarnet (PFA), ambos os fármacos (AG+PFA) na doença neurológica produzida pelo herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5)

| Grupos | N ¹ | Período de incubação (dias) ² | Morbidade e Mortalidade (%) |
|-----------------|----------------|--|-----------------------------|
| AG | 6 | 6,7 (5-10)* | 6/6 (100) |
| PFA | 6 | 17,5 (7-12) | 4/6 (66,7) |
| AG+PFA | 6 | 15,7 (6-16) | 5/6 (83,3) |
| CV ³ | 6 | 9,7 (6-15) | 6/6 (100) |

¹n: número de animais.

² Esses valores representam as médias do período de incubação dos respectivos grupos, e entre parênteses estão o período mínimo e máximo de início da doença neurológica. As medianas dos períodos de incubação foram calculadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Whallis (análise de variância de uma via), bem como os intervalos interquartis. Essas diferenças foram significativas (*; onde $P < 0,05$) e são apresentadas na Figura 1.

³CV: controle de vírus.

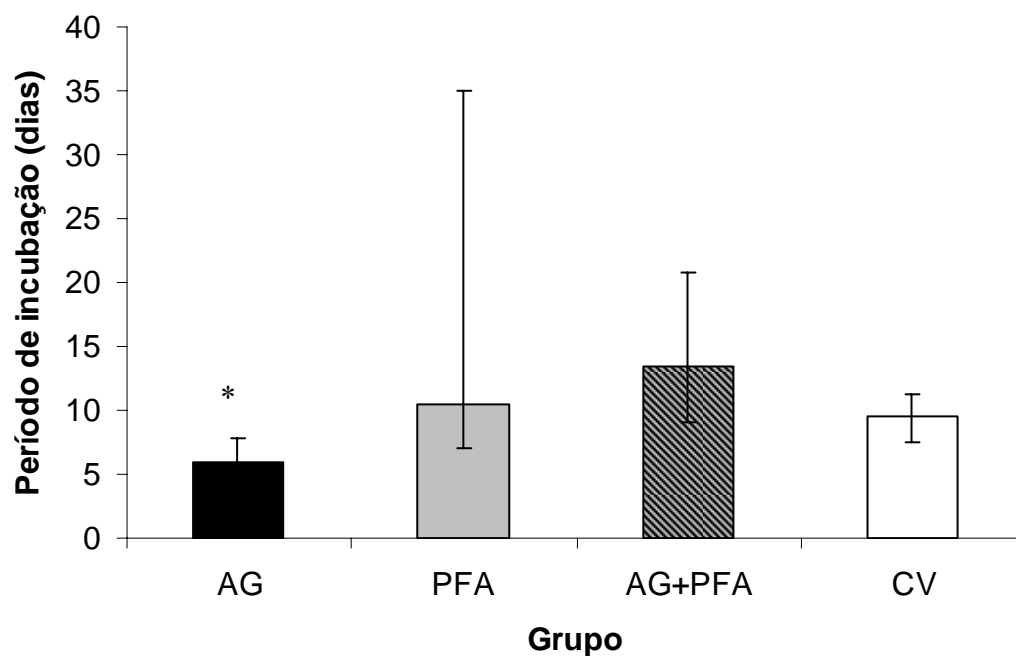


Figura 1. Período de incubação da infecção neurológica em coelhos inoculados com o herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) e tratados com o inibidor da iNOS aminoguanidina (AG), com o antiviral Foscarnet (PFA), com ambos os fármacos (AG+PFA), ou mantidos como controles não-tratados (CV). Os dados são apresentados como medianas e seus respectivos intervalos interquartil (\pm) para grupos de seis animais (teste de Kruskal Whalis, seguido do teste comparativo múltiplo de Dunn). A redução na mediana do período de incubação do grupo AG é significativa (*; onde $P < 0,05$), quando comparada com a mediana dos outros grupos.

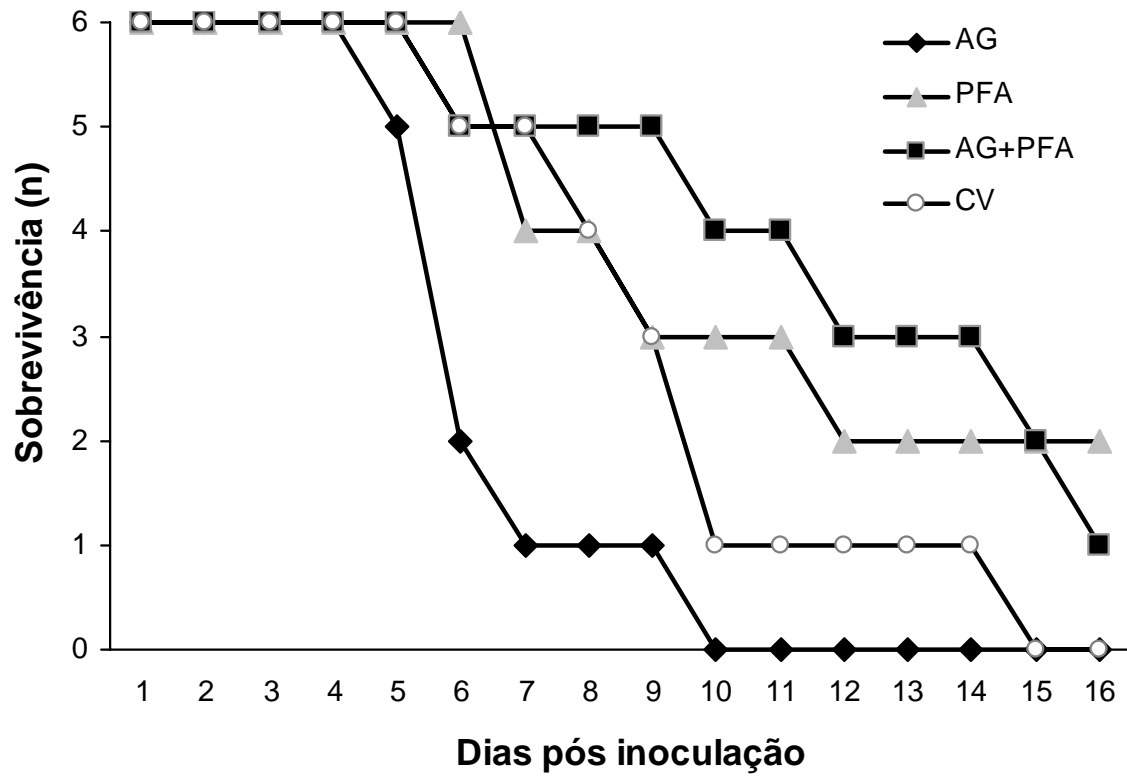


Figura 2. Distribuição temporal da morbidade e mortalidade em coelhos inoculados com o herpesvírus bovino 5 que foram tratados com aminoguanidina (AG), Foscarnet (PFA), ambos os fármacos (AG+PFA) ou mantidos como grupo controle de vírus (CV).

5. CONCLUSÕES

- A infecção neurológica pelo herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) em coelhos é acompanhada de um aumento nos níveis de NO;
- O aumento dos níveis de NO precede o desenvolvimento dos sinais neurológicos, e apresenta correlação espacial e temporal com a disseminação viral no encéfalo;
- O Aciclovir (ACV) é moderadamente ativo frente aos herpesvírus bovinos tipos 1 (BoHV-1), 2 (BoHV-2) e BoHV-5 *in vitro*;
- O Ganciclovir (GCV) é moderadamente efetivo frente ao BoHV-5 e inibe a replicação do BoHV-2 *in vitro*;
- O Foscarnet (PFA) apresenta a atividade antiviral mais acentuada *in vitro* frente ao BoHV-1, BoHV-2 e BoHV-5;
- O tratamento com o PFA em coelhos inoculados com o BoHV-1 reduz a excreção de vírus nas secreções oculares, aumenta o período de incubação, além de reduzir a frequência e a duração dos sinais oculares;
- O tratamento com o PFA reduz os títulos de vírus excretados na secreção ocular e os índices de morbidade e mortalidade de coelhos inoculados com o BoHV-5;
- A aplicação de um inibidor da iNOS, a aminoguanidina (AG), em coelhos inoculados com o BoHV-5 resulta no desenvolvimento de sinais neurológicos mais precoces e severos.

6. REFERÊNCIAS

- ALICE, F.J. Isolamento do vírus da mamilitite herpética bovina no Brasil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 8, p. 9-15, 1977.
- AKAIKE, T.; MAEDA, H. Nitric oxide and virus infection. **Immunology**, Oxford, v. 101, n. 3, p. 300-308, Aug. 2000.
- BABIUK, L. A. et al. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 43, n. 1-2, p. 31-42, Nov. 1996.
- BAGUST, T. J.; CLARK L. Pathogenesis of meningoencephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. **Journal of Comparative Pathology**, Bristol, v. 82, n. 4, p. 375-383, Oct. 1972.
- BALDANTI, F. et al. Z-isomers of 2-hydroxymethylcyclopropylidenemethyl adenine (synadenol) and guanine (synguanol) are active against ganciclovir- and foscarnet-resistant human cytomegalovirus UL97 mutants. **Antiviral Research**, Leuven, v. 56, p. 273-278, Aug. 2002.
- BELKNAP, E. et al. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 1.3. **Veterinary Pathology**, Monterey, v. 31, n. 3, 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 Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 4, p. 144-150, dez. 2000.
- BREDER, C. D. et al. Interleukin 1 immunoreactive innervation of the human hypothalamus. **Science**, New York, v. 240, p. 321-324, Apr. 1988.
- CARON, L. et al. Latent infection by bovine herpesvirus type-5 in experimentally infected rabbits: virus reactivation, shedding and recrudescence of neurological disease. **Veterinary Microbiology**. Amsterdam, v. 84, n. 4, p. 285-295, Feb. 2002.
- CLAUS, M. P et al. Isolation and partial characterization of bovine herpesvirus in cattle with neurological signs. **Virus Reviews & Research**, São Paulo, v. 5, n. 2, p. 120, 2000.

COLODEL, E. M. et al. Meningoencefalite necrosante causada por herpesvírus bovino no Estado de Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 2, p. 293-298, jan./mar. 2002.

CHOWDHURY, S. I. et al. Neuropathology of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) meningoencephalitis in a rabbit seizure model. **Journal of Comparative Pathology**, Bristol, v. 117, n. 17, p. 295-310, Nov. 1997.

COEN, D. M. Acyclovir resistant, pathogenic herpesviruses. **Trends in Microbiology**, London, v. 2, n. 12, p. 481-485, Dec. 1994.

COEN, D. M.; RICHMAN, D. D. Antiviral Agents. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**, 5 th. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2007. Cap. 14, p. 447-479.

DE CLERCQ, E. Molecular targets for antiviral agents. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Palo Alto, v. 297, n. 1, p. 1-10, Feb. 2001.

ELION, G. B. et al. Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine. **Proceedings of the National Academic Science of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5716-5720, Dec. 1977.

ERIKSSON, B. et al. Pyrophosphate analogs as inhibitors of DNA polymerases of cytomegalovirus, herpes simplex virus and cellular origin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 696, n. 2, p. 115-123, Feb. 1982.

FELDMAN, P. L. et al. Irreversible inactivation of macrophage and brain nitric oxide synthase by L-NG-methylarginine requires NADPH-dependent hydroxylation. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 36, n. 4, p. 491-496, Feb. 1993.

FIELD, A.K.; BIRON, K.K. "The end of innocence" revisited: resistance of herpesviruses to antiviral drugs. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 7, n. 1, p. 1-13, Jan 1994.

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

FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Herpesviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia Veterinária**, Santa Maria: editora UFSM, 2007. Cap. 17, p. 433-488, 2007.

FUJII, S. et al. Role of nitric oxide in pathogenesis of herpes simplex virus encephalitis in rats. **Virology**, Evanston, v. 256, n. 2, p. 203-212, Apr. 1999.

GARRÉ, B. et al. In vitro susceptibility of six isolates of equine herpesvirus 1 to acyclovir, ganciclovir, cidofovir, adefovir, PMEDAP and foscarnet. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 122, n. 1-2, p. 43-51, May 2007.

GIBBS, E.P.; RWEYEMAMU, M.M. Bovine herpesviruses. Part II. Bovine herpesviruses 2 and 3. **Veterinary Bull**, v. 47, p. 411-425, 1977.

GLOTOV, A. G. et al. Study of antiviral activity of different drugs against bovine herpes virus and pestivirus. **Antibiotiki i Khimioterapiia**, Moscow, v. 49, n. 6, p. 06-09, 2004.

GOODY, R. J. et al. Reovirus infection of the CNS enhances iNOS expression in areas of virus induced injury. **Experimental Neurology**, Michigan, v. 195, n. 2, p. 379-390, Oct. 2005.

GOMES, L. I. et al. Detecção de herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) em bovinos do Sudeste Brasileiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54, n. 2, p. 217-220, abril 2002.

GUPTA, P. K. et al. Induction of nitric oxide in bovine peripheral blood mononuclear cells by bovine herpesvirus 1. **Acta Virologica**, Bratislava, v. 43, n. 5, p. 321-324, Oct. 1999.

HOOPER, D. C. et al. Local nitric oxide production in viral and autoimmune diseases of the central nervous system. **Proceedings of the National Academic Science of the United States of America**, Washington, v. 92, n. 12, p. 5312-5316, June 1995.

HUSSEIN, I. T. M. et al. Penciclovir is a potent inhibitor of feline herpesvirus-1 with susceptibility determined at the level of virus-encoded thymidine kinase. **Antiviral Research**, Leuven, v. 78, n. 3, p. 268-274, June 2008.

JABS, D. A. et al. Cytomegalovirus retinitis and viral resistance : ganciclovir resistance. CMV retinitis and viral resistance study group. **Journal of Infectious Disease**, Chicago, v. 177, p. 770-773, Mar. 1998.

KENNEDY, P. G. E.; CHAUDHURI, A. Herpes simplex encephalitis. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, London, v. 73, n. 3, p. 237-238, Sept. 2002.

KOPROWSKI, H. et al. In vivo expression of inducible nitric oxide synthase in experimentally induced neurologic diseases. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 90, n. 7, p. 3024-3027, Apr. 1993.

LEE, B. J. et al. Spread of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in the rabbit brain after intranasal inoculation. **Journal of NeuroVirology**, Philadelphia, v. 5, n. 5, p. 474-484, Oct. 1999.

LUNDBERG, P. et al. The immune response to herpes simplex virus type 1 infection in susceptible mice is a major cause of central nervous system pathology resulting in fatal encephalitis. **Journal of Virology**, Washington, v. 82, n. 14, p. 7078-7088, July 2008.

LURAIN, N. S. et al. Point mutations in the DNA polymerase gene of human cytomegalovirus that result in resistance to antiviral agents. **Journal of Virology**, Washington, v. 66, n. 12, p. 7146-7152, Dec. 1992.

MARCACCINI, A. et al. Pseudorabies virus induces a rapid up-regulation of nitric oxide synthases in the nervous system of swine. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 125, n. 3-4, p. 232-243, Dec. 2007.

MARLEY, M. S. D. et al. Effect of phosphonoformic acid in the development of bovine embryos in vitro. **Veterinary Therapeutics**, Yardley, v. 7, n. 2, p. 156-166, summer 2006.

MARQUES, C. P. et al. Microglial cells initiate vigorous yet non-protective immune responses during HSV-1 brain infection. **Virus Research**, Atlanta, v. 121, n. 1, p. 1-10, Oct. 2006.

MARQUES, C. P. et al. Microglia are the major cellular source of inducible nitric oxide synthase during experimental herpes encephalitis. **Journal of NeuroVirology**, Philadelphia, v. 14, n. 13, p. 229-238, May 2008.

MAGGS, D. J.; CLARKE, H. E. In vitro efficacy of ganciclovir, cidofovir, penciclovir, foscarnet, idoxuridine, and acyclovir against feline herpesvirus type-1. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 65, n. 4, p. 399-403, Apr. 2004.

McCANN, S. M. et al. The nitric oxide hypothesis of aging. **Experimental Gerontology**.

Boulder, v. 33, n. 7-8, p. 813-26, Nov. 1998.

MEULEN, K. et al. In vitro comparison of antiviral drugs against feline herpesvirus 1. **BMC Veterinary Research**, London, v. 2, n. 13, p. 01-07, Apr. 2006.

MEYDING-LAMADÉ, U. et al. Experimental herpes simplex virus encephalitis: inhibition of the expression of inducible nitric oxide synthase in mouse brain tissue. **Neuroscience Letters**, West Haven, v. 318, n. 1, p. 21-24, Jan. 2002.

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

MIRANDA, K. M. et al. A rapid, simple, spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Nitric oxide**, Birmingham, v. 5, n. 1, p. 62-71, Feb. 2001.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, Bethesda, v. 6, n. 12, p. 3051-3064, Sept. 1992.

PACHER, P. L.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 87, n. 1, p. 315-424, Jan. 2007.

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

PERSICHINI, T. et al. Cross-talk between constitutive and inducible NO synthase: an update. **Antioxidants & Redox Signaling**, New Rochelle, v. 8, n. 5-6, p. 949-954, May-Jun. 2006.

REID, R. et al. Insertion and extension of acyclic, dideoxy, and ara nucleotides by herpesviridae, human alpha and human beta polymerases. A unique inhibition mechanism for 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine triphosphate. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, n. 263, p. 3898-3904, Mar. 1988.

RIET-CORREA, F. et al. Meningoencefalite e necrose no córtex cerebral em bovinos causadas por herpesvirus bovino-1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 1-2, p. 13-16, jan.-jun. 1989.

RISSI, D. R. et al. Epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões encefálicas em bovinos afetados por meningoencefalite por herpesvirus bovino-5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 2, p. 123-132, jun. 2006.

ROCK, D. L.; REED, D. E. Persistent infection with bovine herpesvirus type 1: rabbit model. **Infection and Immunity**, Washington, v. 35, n. 1, p. 371-373, Jan. 1982.

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

ROIZMANN, B. et al. The family Herpesviridae: an update. The herpesvirus study group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Archives of Virology**, Viena, v. 123, n. 3-4, p. 425-449, Sept. 1992.

ROYES, L. F. F. et al. The role of nitric oxide on the convulsive behavior and oxidative stress induced by methylmalonate: An electroencephalographic and neurochemical study. **Epilepsy Research**, Kuopio, v. 73, n. 3, p.228-237, Nov. 2006.

SAHA, R; PAHAN, K. Signals for the induction of nitric oxide synthase in astrocytes. **Neurochemistry International**, Budapest, v. 49, n. 2, p. 154-163, July 2006.

SALVADOR, C. S. et al. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 2, p. 76-83, Apr. 1998.

SERRANO, F. et al. Pseudorabies virus-induced expression of nitric oxide synthase isoforms. **Physiology & behavior**, Haren, v. 77, n. 4, p. 557-563, Dec. 2002.

SCHWERS, A. et al. Comparison of the effect of trisodium phosphonoformate on the mean plaque size of pseudorabies virus, infectious bovine rhinotracheitis virus and pigeon herpesvirus. **Journal of Comparative Pathology**, Bristol, v. 90, n. 4, p. 625-633, Oct. 1980.

SILVA, A. M., et al. Pathogenesis of meningoencephalitis in rabbits by bovine herpesvirus type-5 (BHV-5). **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 22-31, Oct. 1999.

SILVA, M. S. et al. Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987-2006). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 10, p. 403-408, Oct. 2007.

SOUZA, V. F. et al. Caracterização de herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 1, p. 13-18, Jan. 2002.

SPARROW, J. R. Inducible nitric oxide synthase in the central nervous system. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 5, n. 4, p. 219-229, Jan. 1994.

THIRY, E. et al. In vivo and in vitro effect of acyclovir on pseudorabies vírus, infectious bovine rhinotracheitis vírus and pigeon herpesvirus, **Annales Recherches Vétérinaires**, Paris, v. 14, n. 3, p. 239-245, 1983.

TROY, S. B. et al. Severe encephalomyelitis in an immunocompetent adult with chromosomally integrated human herpesvirus 6 and clinical response to treatment with foscarnet plus ganciclovir. **Clinical Infectious Disease**, Chicago, v. 47, n. 12, p. 93-96, Dez. 2008.

TORRE, D. et al. Role of nitric oxide in HIV-1 infection: friend or foe? **Lancet Infectious Disease**, London, v. 2, n. 5, p. 273-280, May 2002.

TORRES, F.D. et al. Prevalência de anticorpos contra o vírus da mamilita herpética em bovinos do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.

UBOL, S. et al. Inducible nitric oxide synthase inhibition delays death of rabies virus-infected mice. **Journal of Medical Microbiology**, Spencers Wood, v. 50, n. 3, p. 238-242, Mar. 2001.

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 Virology**, Washington, v. 41, n. 10, p. 4512-4520, Oct. 2003.

WEBER, K. S. C. et al. Selective recruitment of Th2-type cells and evasion from a cytotoxic immune response mediated by viral macrophage inhibitory protein-II. **European Journal of immunology**, Weinheim, v. 31, n. 8, p. 2458-2466, Aug. 2001.

WEIBLEN R. et al. Bovine meningo-encefalitis from IBR virus. **Veterinary Record**. London, v.

124, n. 25, p. 666-667, Jun. 1989.

WHITLEY, R. J.; ROIZMANN, B. Herpes simplex virus infections. **Lancet**, London, v. 357, n. 9257, p. 1513-1518, May 2001.

ZHAO, M. L. et al. Expression of inducible nitric oxide synthase, interleukin-1 and caspase-1 in HIV-1 encephalitis. **The Journal of Neuroimmunology**, Bethesda, v. 115, n. 1-2, p. 182-191, Apr. 2001.

ZHENG, Y. M. et al. Severity of neurological signs and degree of inflammatory lesions in the brains of rats with borna disease correlate with the induction of nitric oxide synthase. **Journal of Virology**, Washington, v. 67, n. 10, p. 5786-5791, Oct. 1993.