

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**INFLUÊNCIA DA EXPRESSÃO CONSTITUTIVA DO GENE V DO VÍRUS  
PARAINFLUENZA 5 EM CÉLULAS CRIB SOBRE OS HERPESVÍRUS  
BOVINOS TIPOS 1 E 5**

FRANCISCO ESMAILE DE SALES LIMA  
Médico Veterinário

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil  
Fevereiro de 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

INFLUÊNCIA DA EXPRESSÃO CONSTITUTIVA DO GENE V DO VÍRUS  
PARAINFLUENZA 5 EM CÉLULAS CRIB SOBRE OS HERPESVÍRUS  
BOVINOS TIPOS 1 E 5

FRANCISCO ESMAILE DE SALES LIMA  
Médico Veterinário

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação  
em Microbiologia Agrícola e  
do Ambiente como um dos  
requisitos para a obtenção do  
Grau de Mestre em  
Microbiologia do Ambiente.

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil  
Fevereiro de 2011

Catálogo na Publicação  
UFRGS/ICBS/Biblioteca Setorial

L732i Lima, Francisco Esmale de Sales

Influência da expressão constitutiva do gene V do vírus parainfluenza 5 em células CRIB sobre os herpesvírus bovinos tipos 1 e 5 / Francisco Esmale de Sales Lima. – 2011.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, BR-RS, 2011.

Orientação : Prof. Ana Cláudia Franco

1. Vírus da parainfluenza 2. Herpesvírus bovino 1 3. Herpesvírus bovino 5 4. Receptores de interferon I. Franco, Ana Cláudia, orient. II. Título.

CDU 579.62 (043)

FRANCISCO ESMAILE SALES LIMA  
MÉDICO VETERINÁRIO  
UECE

## DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos  
Para obtenção do Grau de

## MESTRE EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 22/02/2011  
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 13/04/2011  
Por:



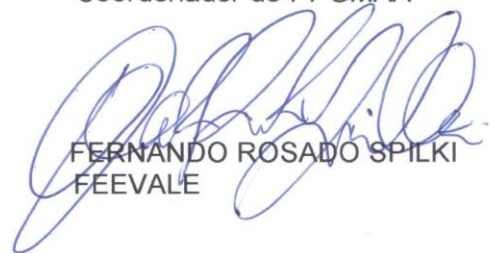
ANA CLÁUDIA FRANCO  
Orientadora ICBS-UFRGS



JOSE CARLOS GERMANI  
Coordenador do PPGMAA



AMAURI SIMONETTI  
ICBS/UFRGS



FERNANDO ROSADO SPILKI  
FEEVALE



SILVIA DE OLIVEIRA HÜBNER  
UFPeI

MARIA CRISTINA FACCONI HEUSER  
Diretora do ICBS - UFRGS

## **AGRADECIMENTOS**

A todos que estiveram envolvidos neste trabalho, o meu muito obrigado.

Um sincero e especial agradecimento à Profa.Dra. Ana Cláudia Franco pela sua dedicação e paciência em me orientar, e ainda, pelo apoio e total confiança em mim depositada.

Ao Dr. Frans Rijsewijk, agradeço o apoio, discussões, compreensão, obrigado pelas críticas e observações sempre pertinentes e pelo estímulo à pesquisa.

Ao Prof. Dr. Paulo Michel Roehe pelo apoio financeiro que suporta o laboratório, além de incentivo à pesquisa de qualidade

Aos amigos e colegas do Laboratório de virologia do ICBS/UFRGS: Bianca, Camila, Dadá, Fabrício, Fernando, Gustavo, Heltinho, Hiranzinho, Juliana, Karina, Lucas, Lu (Ludmilla), Marthinha, Thalita, Tiane e aos colegas do IPVDF: Ana Paula, Samuel e Thaís. A todos, meus sinceros agradecimentos pela convivência, auxílio nos momentos importantes e alegrias ao longo destes dois anos.

A todos meus familiares, em especial à minha mãe Maria (Masiha), meu pai Francisco (Chicão) e minha caríssima sorela Vivian, pois mesmo à distância, me deram forças para concluir este trabalho e não mediram esforços para que eu pudesse continuar. Agradeço por todo amor incondicional

Aos meus amigos de Fortaleza, Curitiba e Cabo Frio que mesmo distantes, sempre me enviaram palavras de apoio.

Às instituições IPVDF/FEPAGRO e a UFRGS, que mantiveram as portas abertas para a execução deste trabalho.

Aos funcionários, professores, colegas destas instituições, muitíssimo obrigado.

Ao CNPq pelos recursos fomentados para a realização deste estudo.

“O homem não pode desejar nada, a menos que antes, compreenda que ele só pode contar consigo, mesmo que esteja sozinho, abandonado na Terra, sem outros objetivos a não ser os que ele mesmo estabelecer, sem outro destino a não ser o que ele forjar”.

Jean Paul Sartre (1905-1980)

# INFLUÊNCIA DA EXPRESSÃO CONSTITUTIVA DO GENE V DO VÍRUS PARAINFLUENZA 5 EM CÉLULAS CRIB SOBRE OS HERPESVÍRUS BOVINOS TIPOS 1 E 5

Autor: Francisco Esmale de Sales Lima

Orientadora: Ana Cláudia Franco

## RESUMO

A capacidade dos vírus em inibir a resposta imune inata é uma condição que os permite manterem-se na natureza. O vírus parainfluenza 5 (PIV5), por exemplo, expressa a proteína V, a qual é descrita como uma inibidora da sinalização de interferon (IFN), assim antagonizando seu efeito antiviral. O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos do bloqueio do receptor de IFN-I no crescimento de herpesvírus bovino tipos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) *in vitro* e elucidar as relações entre a replicação viral e a resposta de IFN-I pela célula infectada. Para isso, foi modificada uma linhagem celular de bovinos (CRIB) que expressa de forma permanente a proteína V do PIV5. Esta linhagem celular foi denominada CRIB/V. Foram, então, realizados ensaios de penetração, tamanhos de placas virais e curvas de crescimento usando as amostras de BoHV-1 e BoHV-5 em células CRIB e CRIB/V. A análise com BoHV-1 não mostrou diferenças significativas nas cinéticas de penetração e crescimento. Entretanto os tamanhos de placa foram maiores em CRIB/V do que em CRIB. Para o BoHV-5, a penetração foi um pouco mais rápida em CRIB/V. Mesmo que os títulos finais não tenham sido diferentes nas duas células, o BoHV-5 alcançou títulos mais altos em CRIB/V do que em CRIB em períodos iniciais da curva de crescimento em CRIB/V em comparação a CRIB. Além disso, a média do tamanho de placa para BoHV-5 foi maior em CRIB/V do que nas células CRIB. Diferentemente das observações com BoHV-1, nossos resultados sugerem que o bloqueio do receptor de IFN-I pela proteína V facilitou a penetração, liberação e disseminação célula-célula do BoHV-5 nas células bovinas, suprimindo uma resposta antiviral, pelo menos, durante os estágios iniciais da infecção.

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Microbiologia do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (66p.) Fevereiro, 2011.

# INFLUENCE OF CONSTITUTIVE EXPRESSION OF THE PARAINFLUENZA VIRUS 5 V GENE ON CRIB CELLS ON BOVINE HERPESVIRUSES TYPES 1 AND 5<sup>2</sup>

Author: Francisco Esmale de Sales Lima  
Supervisor: Ana Cláudia Franco

## ABSTRACT

The ability of viruses to inhibit innate immune responses dictates a possibility to maintain in nature. For instance, Parainfluenza virus 5 (PIV5) expresses the V protein, which is described to inhibit type I interferon (IFN-I) signaling, then, antagonizing its antiviral effects. The aim of this work was to study the effect of blocking the IFN-I receptor signaling by this V protein on the growth properties of bovine herpesviruses types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) *in vitro*. A plasmid expressing the V protein of PIV5 was transfected into CRIB cells. We performed penetration kinetics, measured viral plaque sizes and determined one step growth curves using BoHV-1 and BoHV-5 strains in both CRIB and CRIB/V cells. The analysis on BoHV-1 showed no significant difference in penetration and growth kinetics. However the BoHV-5 viral plaques were bigger in CRIB/V than CRIB. The penetration of BoHV-5 in CRIB/V cells was slightly faster than in CRIB cells. Even though the final titers did not differ in both cells, BoHV-5 reached higher titers in CRIB/V than in CRIB at earlier time points of its growth. Moreover, the mean plaque size caused by BoHV-5 in CRIB/V cells was spectacularly bigger in CRIB/V than in CRIB cells. Unlike the observations with BoHV-1, our results suggest that blocking the signaling via the IFN-I receptor by the V protein facilitated penetration, release and cell-to-cell spread of BoHV-5 in bovine cells, counteracting an antiviral response, at least, during the early stages of infection.

<sup>2</sup> Master of Science Dissertation in Environment Microbiology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (66p.) February, 2011.



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....</b>	<b>X</b>
<b>1 – INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1– Objetivos gerais: .....	3
1.2 – Objetivos específicos:.....	3
<b>2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>5</b>
2.1 – Herpesvírus bovino tipos 1 e 5 .....	5
2.2 – Multiplicação viral .....	6
2.3 – Patogenia e sinais clínicos .....	7
2.4 – Interferons.....	10
2.5 – Tipos de interferons .....	11
2.5.1 – Interferon tipo I .....	13
2.6 – Vias de sinalização do interferon.....	14
2.7 – Efeitos do interferon nas células alvo.....	15
2.8 – Regulação da expressão do IFN-1.....	17
2.9 – Bloqueio viral da ação do interferon .....	17
2.10 – Proteína V/P dos paramixovírus.....	20
<b>3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
3.1 – Células e vírus .....	22
3.2 - Plasmídeos .....	22
3.3 – Semiquantificação dos DNAs extraídos .....	23
3.4 – Titulação de BoHV-1 e BoHV-5.....	23
3.5 – Transfecção do DNA plasmideal .....	23
3.6 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar a presença do gene V nas células transfectadas .....	24
3.7 – Cinética de penetração.....	25
3.8 – Ensaio do tamanho de placa .....	26
3.9 – Curvas de crescimento .....	26
3.10 – Análise estatística.....	27
<b>4 – RESULTADOS .....</b>	<b>28</b>
4.1 – Transfecção de células CRIB com pEF.IRES.neo.SV5 P/V .....	28
4.2 – Cinética de penetração.....	29
4.3 – Ensaio de tamanho de placa .....	31
4.5 – Curva de crescimento.....	33
<b>5 – DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>6 – CONCLUSÕES.....</b>	<b>41</b>
<b>7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>42</b>
<b>8 – ANEXO.....</b>	<b>55</b>

## LISTA DE FIGURAS

	Página	
FIGURA 1	Representação da via de sinalização dos receptores de IFN por fosforilação de diferentes quinases intracelulares.....	15
FIGURA 2	A reação de PCR para amplificação e quantificação do gene V após extração de DNA celular total das duas linhagens de células.....	29
FIGURA 3	Comparação da cinética de penetração de ISO 45/97 nas células CRIB e CRIB/V.....	30
FIGURA 4	Comparação da cinética de penetração de EVI 123 nas células CRIB e CRIB/V.....	31
FIGURA 5	Gráficos das médias dos tamanhos de placa em célula CRIB e CRIB/V inoculadas com ISO 45/97.....	32
FIGURA 6	Gráficos das médias dos tamanhos de placa em célula CRIB e CRIB/V inoculadas com EVI 123.....	32
FIGURA 7	Cinética de crescimento de ISO 45/97 em células CRIB e CRIB/V.....	34
FIGURA 8	Cinética de crescimento de EVI 123 em células CRIB e CRIB/V.....	34

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AAF: fator ativador de interferon alfa  
bICP0: "*bovine infected cell protein*"  
BoHV-1: *Herpesvírus bovino tipo 1*  
BoHV-5: *Herpesvírus bovino tipo 5*  
bp: "base par" ou pares de base  
CD: complex differentiation, por exemplo: CD8: complex differentiation 8  
CO<sub>2</sub>: gás carbônico  
CRIB: célula de rim bovino resistente à infecção por BVDV  
C-terminal: extremidade carboxi-terminal  
DMSO: dimetilsulfóxido  
DNA λ: DNA do bacteriófago lambda  
DNA: ácido desoxirribonucléico  
E: early ou precoce  
ECP: efeito citopático  
EMEM: meio mínimo essencial de "Eagle"  
elf-2α: fator de iniciação eucariótica 2α  
EVI: equipe de virologia  
Fig.: figura  
g: glicoproteína, por exemplo, *gB*: *glicoproteína B*  
GAS: sequência ativadora de interferon gamma  
GenBank: dados do NCBI ("National Center for Biotechnology Information")  
gene *TK*: gene *timidina quinase*  
HAdV-40: *adenovírus entérico humano tipo 40*  
HHV-1: *Herpesvírus humano tipo 1*  
hIPV2: *parainfluenza vírus humano tipo 2*  
IBR: Rinotraqueíte infecciosa bovina  
ICBS: Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
ICP: *infected cell protein*  
ICP0: *infected cell protein zero*  
IE: Immediate early ou imediatamente precoce  
IFN: interferon  
IFNα: interferon alfa  
IFNβ: interferon beta  
IFNγ: interferon gamma  
IFNR: interferon receptor  
IL: interleucina  
IPB: balanopostite pustular infecciosa  
IPV: vulvovaginite pustular infecciosa  
IPVDF: Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor  
IRF: interferon regulating factor  
ISGs: genes estimulados por IFN  
ISGF3: fator genético 3 estimulador de interferon  
ISO: isolado  
ISRE: elemento responsável pela estimulação de interferon  
JAK: Janus Kinase, por exemplo: JAK1: Janus kinase 1  
Kb: kilobases  
KCl: cloreto de potássio  
L: late  
LB: meio Luria Bertani  
M: marcador  
MDBK: células renais de bovino "Madin-Darby"  
mg: miligrama  
MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio  
Min.: minutos  
mL: mililitros

mM: milimolar  
M.O.I: multiplicidade de infecção  
mRNA: mensageiro do ácido ribonucléico  
n.: número  
NaCl: cloreto de sódio  
ng: nanogramas  
NI: não interpretável  
NK: *natural killer*  
NP: proteína do nucleocapsídeo  
N-terminal: região amino-terminal  
°C : graus Celsius  
OIE: organização mundial de sanidade animal  
p.: página  
p.a: pós adsorção  
PAMPs: padrões moleculares associados ao agente  
pb: pares de bases  
PBS:  
PCR: reação em cadeia da polimerase  
PF: oligonucleotídeo “forward”  
p.i.: pós infecção  
PIAS: *Protein Inhibitor of Activated STAT*  
PIV5: *parainfluenza vírus 5*  
PKR: *protein kinase R*  
PR: oligonucleotídeo “reverse”  
PRRs: receptores de reconhecimento padrão  
%: porcentagem  
RNA: ácido ribonucleico  
SDS: dodecil sulfato de sódio  
SFB: soro fetal bovino  
SNC: sistema nervoso central  
SOCS: *Supressor of Cytokine Signalling*  
STAT: *Signal transducer and activator of transcription, por exemplo: STAT1*  
SV5: *virus símio 5*  
SV40: *virus símio 40*  
Taq polimerase: enzima extraída da bactéria *Thermus aquaticus*  
TCID<sub>50</sub>: tissue culture infective dose  
TE: tampão Tris-EDTA  
Th1: célula T helper 1  
Th2: célula T helper 2  
TLR: *toll like receptor* por exemplo: TLR3: *toll like receptor 3*  
TR: sequência repetida terminal  
Tyk: tirosina-quinases, por exemplo: Tyk-2: tirosina quinase 2  
UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
u.f.p: unidade formadora de placa  
*UL*: região *única longa*  
*US*: região *única curta*  
UV: luz ultravioleta  
µg: micrograma  
µL: microlitro  
µM: micromolar  
v.: volume  
V: proteína ou gene V

## 1 – INTRODUÇÃO

Os herpesvírus bovinos tipos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5), membros da família *Herpesviridae*, são agentes de enfermidades que abrangem desde infecções respiratórias e reprodutivas até meningoencefalites em bovinos. Estas últimas são as manifestações mais graves da infecção, e podem causar a morte do animal infectado (Rissi et al., 2008, Hübner et al., 2005). A importância destes agentes na produção de bovinos está relacionada não somente às perdas econômicas causadas por abortos e mortalidade nas infecções clínicas aparentes, mas também às infecções subclínicas, que podem levar ao atraso no desenvolvimento, retorno ao cio e queda na produção de leite ou na qualidade do sêmen (Miller et al., 1991; Wyler et al., 1989). Aparentemente, os dois vírus encontram-se amplamente disseminados na população de bovinos no Brasil (Campos et al., 2009).

Assim como o que ocorre com outros membros da subfamília *Alphaherpesvirinae*, a infecção por BoHV-1 e 5 em células de bovinos causa rapidamente a morte celular. A expressão gênica durante a infecção produtiva por estes dois vírus é regulada de forma temporal e ocorre em três fases: *immediate early* ou imediatamente precoce (IE), *early* ou precoce (E) e *late* ou tardia (L). *In vivo*, em seu hospedeiro natural, após um estágio agudo de

infecção produtiva em células epiteliais em regiões mucocutâneas, tais o vírus são transportados a células neuronais que inervam os sítios primários de infecção, onde realiza uma infecção não produtiva resultando em latência.

Tanto durante a infecção produtiva, como durante a infecção latente por herpesvírus, vários mecanismos imunológicos do hospedeiro são ativados buscando controlar a infecção viral (Rouse & Babiuk, 1978). As células infectadas por BoHV-1 e 5 (células epiteliais e neurônios) possuem diversos mecanismos de resposta antiviral inata que são fundamentais no controle da infecção viral (Flint et al., 2000). Um dos mais importantes mecanismos de resposta antiviral inata é a produção e secreção de interferons tipo I (alfa e beta; IFN $\alpha$  e  $\beta$ ) e a subsequente ativação parácrina da via de sinalização IFN via ligação com os seus receptores. A ativação destas vias leva à expressão de genes estimulados por IFN (ISGs), os quais estão relacionados a diversos mecanismos que causam a inibição da replicação viral em diferentes estágios (Platanias, 2005). À medida que estes mecanismos imunes são ativados durante a infecção da célula, é lógico que os vírus desenvolvam mecanismos de contra-ataque, a fim de estabelecer uma infecção com sucesso no hospedeiro. A proteína V do parainfluenza vírus 5 foi a primeira a ser reconhecida como um inibidor da sinalização de IFN, e a expressão desta proteína em células humanas resultam em uma rápida perda de STAT1 (Signal transducer and activator of transcription – Fator de transcrição) mediada por degradação proteossômica (Didcock et al., 1999a). Vários estudos se dedicaram a descrever mecanismos de bloqueio da atividade de interferons por alphaherpesvírus, como o herpesvírus humano tipo 1 (HHV-1) e BoHV-1, entre

outros (Didcock et al., 1999a; Henderson et al., 2005).Recentemente foi observado por Saira et al (2007; 2009) que a proteína IE bICP0 do BoHV-1 inibe a atividade do promotor de IFN $\beta$  e induz a degradação do fator regulador 3 de IFN (IRF3), além de interagir e bloquear o fator regulador 7 do IFN (IRF7). Estes mecanismos levam à inibição da transativação do promotor do IFN $\beta$ , culminando na inibição da síntese de IFN $\beta$  nas células infectadas, o que favorece a infecção viral *in vitro* e provavelmente *in vivo* (Saira et al, 2007; 2009). Estes estudos confirmam que o BoHV-1 lança mão de pelo menos um mecanismo de bloqueio do IFN $\beta$ , logo no início da infecção na célula, indicando que a resposta imune inata é, de fato, um obstáculo a ser superado pelo BoHV-1. Apesar de compartilhar propriedades genômicas e biológicas com o BoHV-5, não é ainda conhecido se o último também lança mão destes mecanismos para bloquear a síntese de IFN $\beta$ .

### **1.1– Objetivos gerais:**

- Determinar como a expressão constitutiva do gene V do do parainfluenza vírus 5 (PIV5) afeta as características de crescimento *in vitro* do BoHV-1 e 5.

### **1.2 – Objetivos específicos:**

- Transfectar células CRIB com o plasmídeo pEF.IRES.neo.SV5 que contém o gene V do PIV5;

- Selecionar e multiplicar uma linhagem de células CRIB que expressa essa proteína de forma definitiva, através do uso do antibiótico Geneticina.

- Comparar a dinâmica e progressão da infecção pelas amostras EVI 123 de BoHV-1 e ISO 45/97 de BoHV-5 em células CRIB transfectadas e as células parentais, através de ensaios de penetração viral, tamanho de placa e cinética da replicação viral.



## 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 – Herpesvírus bovino tipos 1 e 5

Os Herpesvírus bovinos tipo 1 (BoHV-1) e tipo 5 (BoHV-5) são membros da família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*. Os vírus da subfamília *Alphaherpesvirinae* apresentam como características gerais, possuir um diâmetro de aproximadamente 70 a 110 nm, com genoma não segmentado e de uma única molécula de DNA dupla fita linear. Os genomas apresentam 135.870 pares de bases (pb) nucleotídicas (BoHV-1) e 138.390 pb (BoHV-5); sendo em torno de 75% desta composição formada por bases GC (Delhon et al., 2003). É composto de duas sequências únicas: uma única longa ou “long” (UL) e uma única curta ou “short” (US), sendo esta última flanqueada por sequências terminais repetidas inseridas de forma invertida no genoma: a região repetida interna (IR) e a região repetida terminal (TR) (Schwyzer & Ackermann, 1996). O BoHV-5 apresenta similaridade genômica de 85% com BoHV-1 (Delhon et al., 2003).

Ambos herpesvírus codificam várias enzimas envolvidas no metabolismo do ácido nucléico como a timidina kinase (TK), timidina sintetase, dUTPase e ribonucleotídeo redutase, além daquelas que participam da síntese

do DNA como a DNA polimerase, a helicase e a primase (Roizman et al., 1992).

São descritas 10 glicoproteínas do envelope viral, denominadas gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, e gM. Estas glicoproteínas possuem diferentes propriedades antigênicas, funções na replicação viral e interações com a célula infectada (Scwyzer & Ackermann, 1996; Rebordosa et al., 1996).

O BoHV-1 está associado a várias enfermidades, tais como a rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), vulvovaginite pustular infecciosa (IPV), balanopostite, conjuntivite e abortos. Além disso, vários estudos demonstram que este vírus pode ser o agente de meningoencefalites em bovinos (Metzler et al., 1986; Collins et al., 1993; d'Offay et al., 1993). Por outro lado, o BoHV-5 está relacionado principalmente com meningoencefalites virais, as quais podem causar sinais neurológicos graves e morte. De fato, a principal diferença entre o BoHV-1 e o BoHV-5 está na capacidade do BoHV-5 invadir e replicar-se no SNC, determinando a enfermidade neurológica (Roizman et al., 1992; Belknap et al., 1994; Meyer et al. 2001; Perez et al., 2002).

## **2.2 – Multiplicação viral**

A infecção pelo herpesvírus bovino em células permissivas é iniciada por três etapas no processo de entrada. A primeira interação envolve uma ligação de baixa afinidade entre a gB e/ou gC a receptores celulares de sulfato de heparina. Logo após, ocorre uma interação de alta afinidade entre a glicoproteína gD e a nectina 1 (membro da superfamília das imunoglobulinas) (Connolly et al., 2001). A seguir, ocorre a fusão do envelope viral com a

membrana celular e a liberação do tegumento e do nucleocapsídeo no citoplasma celular. O nucleocapsídeo é então carregado até a membrana nuclear, onde o capsídeo é conectado e o DNA liberado no núcleo (Muylkens et al., 2007).

Após, o DNA viral linear circulariza-se, o que é seguido de uma cascata de transcrições de genes virais, incluindo a expressão de três classes de genes: *immediate early* (IE), *early* (E) e *late* (L). Os seus respectivos RNAs mensageiros são transportados para o citoplasma onde codificam proteínas envolvidas na regulação do ciclo viral, na replicação do DNA viral e na morfogênese de novos vírions (Wirth et al., 1989). Em herpesvírus humano tipo 1 (HHV-1), que serve como protótipo para replicação de DNA de alfa herpesvírus, o genoma circular serve como molde para o primeiro ciclo de replicação, iniciando de uma sequência chamada “origem de replicação” (ORI) (Muylkens et al., 2007).

Ainda no núcleo, as moléculas de DNA viral são, por fim, empacotadas no capsídeo através do auxílio de várias proteínas virais (UL33; UL32; UL28; UL25; UL15; UL26,5) (Mettenleiter, 2002; Mettenleiter et al., 2006). Por fim, ocorre a associação do nucleocapsídeo com o envelope viral. O envelopamento dos nucleocapsídeos formados no núcleo ocorre por brotamento em vesículas derivadas do Complexo de Golgi. No citoplasma, os vírions acumulam-se dentro de vesículas para serem secretados para o meio extracelular ou ocorre a dispersão das partículas virais célula-a-célula (Mettenleiter, 2002; 2006).

### **2.3 – Patogenia e sinais clínicos**

A transmissão de BoHV-1 e 5 pode ocorrer pelo contato direto de animais durante a fase clínica da infecção, os quais excretam vírus infeccioso em secreções nasais, conjuntivais ou sêmen. Através do contato direto ou indireto com estas secreções com mucosas nasal, conjuntival ou genital, animais suscetíveis podem se contaminar e iniciar o desenvolvimento da infecção. A transmissão viral também pode ocorrer a curtas distâncias, por via aerógena (Mars et al., 2000). Neste caso a porta de entrada do vírus será principalmente a nasal.

Após a infecção e replicação nas células epiteliais e infecção de células nervosas que inervam a mucosa, o vírus é levado por um movimento retrógrado axonal até o núcleo celular no gânglio nervoso, onde permanecerá latente, em uma forma episomal, por toda a vida do hospedeiro (Smith et al., 2001). Durante infecção da mucosa genital ou nasal, pode ocorrer infecção dos gânglios paravertebrais, lombossacrais e trigêmios, respectivamente.

A infecção latente é uma importante estratégia de perpetuação dos alfa herpesvírus nos seus hospedeiros e provavelmente ocorre em todos os animais que desenvolvem uma primo-infecção. Eventualmente ocorre a reativação viral no animal latentemente infectado. Essa reativação pode ser induzida por estímulos naturais (estresse, transporte, parto, desmame) ou por tratamento com corticosteróides, e ocorre somente em uma pequena proporção dos neurônios (Jones et al., 2006). A partir do corpo do neurônio, os capsídeos são transportados de anterógrado, apresentando uma motilidade bi-direcional, até alcançar a extremidade axonal (Smith et al., 2001). Os axônios estão ligados a células da mucosa que promovem a montagem e liberação viral

(Enquist et al., 2002). Na mucosa epitelial, a intensidade da multiplicação viral vai depender fundamentalmente da resposta imune adquirida pela exposição natural ao vírus ou pela vacinação (Pastoret et al., 1979). Quando ocorre de forma abundante, a multiplicação viral consequente à reativação culmina com a disseminação e possível transmissão a hospedeiros suscetíveis (Narita et al., 1978; Ackermann et al., 1982; Thiry et al., 1987).

Seja após a infecção aguda ou durante a reativação viral, o BoHV-1 pode estar associado a uma variedade de manifestações clínicas, tais como, a rinotraqueíte (IBR), vulvovaginite (IPV), balanopostite (IPB), conjuntivite e ceratoconjuntivite, ocasionalmente encefalite e várias formas de problemas reprodutivos (Kahrs, 2001). Um dos efeitos mais graves relacionados aos problemas reprodutivos causados pelo BoHV-1 pode ser observado em animais prenhes. Quando a infecção torna-se sistêmica, o vírus pode passar pelo epitélio uterino e causar a morte embrionária ou fetal, levando ao aborto (Canant, 1984). Como há sincronização de cio na reprodução dos bovinos, o BoHV-1 pode, então, causar surtos de abortos em rebanhos inteiros (Wyler et al., 1989).

Em adultos, o BoHV-1 pode causar somente sinais clínicos brandos, mas em animais jovens, incluindo os recém-nascidos, pode ser o responsável por problemas mais graves como, por exemplo, dar início à doença respiratória de bovinos (BRD), pela sua habilidade em modificar o ambiente do trato respiratório superior e causar imunossupressão (Winkler et al., 1999; Lovato et al., 2003).

O BoHV-5 está associado com a meningoencefalite herpética em bovinos. A infecção natural e experimental de bovinos jovens com o BoHV-5 resulta em infecção respiratória, seguida da invasão e replicação viral no sistema nervoso central (SNC). Esta culmina com enfermidade neurológica de curso geralmente fatal (Lunardi et al., 2009).

## **2.4 – Interferons**

As células desenvolveram diversos mecanismos de resposta antiviral inata e adquirida para combater a infecção viral (Flint et al., 2000). Um dos mais importantes mecanismos de resposta antiviral inata é a produção e secreção de interferon (IFN) e subsequente ativação parácrina de sinalização via receptores de INF.

O complexo interferon (IFN) é uma família de glicoproteínas sintetizadas por células de diferentes origens. Há várias funções entre elas: 1- inibidora da multiplicação viral, 2- imunomoduladora, estimulando células NK e monócitos, 3- anti-angiogênica e anti-proliferativa (Haller et al., 2006).

Para que o sistema imune inato responda apropriadamente à presença de um agente patogênico, receptores de reconhecimento padrão do hospedeiro (PRR) têm de detectar padrões moleculares patógeno-associados (PAMPs). Como exemplos de PRRs, temos CD14, receptores de manose e receptores do tipo toll (TLR) em células do hospedeiro, como macrófagos (Lien et al., 1999; Medzhitov et al., 2002).

Os elementos da família TLR (toll like receptors) são componentes fundamentais da imunidade dos mamíferos, constituindo parte do sistema de

vigilância mais precoce na resposta à infecção. A sua ativação desencadeia a imunidade inata e é crucial na indução da imunidade adaptativa Th1/Th2 (Parker et al., 2007; Bowie, 2007). Cada TLR é capaz de reconhecer diferentes componentes virais e as vias de sinalização ativadas por estes receptores levam à indução da produção de citocinas e de IFN tipo I (Szabo & Dolganiuc, 2006). O TLR 3 reconhece RNA de fita dupla, TLR 7 e 8 reconhecem RNA de fita simples, o TLR 9 reconhece DNA viral (Akira & Takeda, 2004; Parker et al., 2007; Shimosato et al., 2005) Outros TLR (2 e 4) interagem com proteínas virais específicas e também desencadeiam a produção de IFN (Shinkai et al., 2006).

Outro exemplo de PRR é o PKR (protein-kinase R), que é um outro detector intracelular de RNA dupla fita e de poli(I:C) (um RNA dupla fita sintético usado para mimetizar infecção viral). A sua função principal é inibir a tradução do mRNA do hospedeiro através da fosforilação de fator de iniciação da tradução eIF2 $\alpha$  (Proud, 1995).

## **2.5 – Tipos de interferons**

Os interferons do tipo I ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\kappa$ ,  $\omega$ ,  $\tau$ ) são produzidos por precursores de células dendríticas e fibroblastos. Estas proteínas são expressas como a primeira linha de defesa contra infecções virais, sendo que seu papel principal é limitar a disseminação viral, durante os primeiros dias de infecção viral, permitindo tempo suficiente para geração de uma resposta imune adaptativa robusta contra a infecção (Biron, 1994; Stark et al., 1998; Roberts et al., 1999; Petska et al., 2004). O interferon do tipo II (IFN $\gamma$ ) possui algumas das atividades antivirais do IFN tipo I, mas o papel biológico

dominante do IFN $\gamma$  parece ser a resposta imune adaptativa, principalmente na ativação de células T, sendo produzidas por CD4+, ativando natural killer (NK) e CD8+ citotóxicas (Stark et al., 1998; Muller et al., 1994). Todos os interferons do tipo I interagem com um sistema de receptores multiméricos que consistem de duas subunidades (IFNR-1, IFNR-2) e são encontrados na maioria das células. Os interferons tipo I e II medeiam os seus efeitos através da interação com receptores específicos e não redundantes (Petska et al., 2004). Os ratos “knockout” para receptores  $\alpha/\beta$  ou para receptores do IFN $\gamma$  não conseguem estabelecer resposta imune eficaz. A existência destas famílias de genes leva-nos a considerar que o hospedeiro desenvolveu mecanismos para limitar a extensão da resposta ao IFN (Abril et al., 2004).

O tipo III inclui o IFN $\lambda$ , IL-28, IL-29, interagem com o receptor 1 do IFN $\lambda$  e com a cadeia IL-10R2. O IFN $\lambda$  tem uma ação semelhante ao IFN tipo I ao induzir uma proteção viral, tanto *in vitro*, como *in vivo* (Kotenko et al., 2003; Petska et al., 2004; Robek et al., 2005). O interferon do tipo III induz a transcrição de genes semelhante aos do tipo I, mas a resposta ao IFN tipo III é mais limitada, pois os seus receptores só se expressam num número limitado de tipos celulares (Ank et al., 2006).

Camundongos não são susceptíveis à infecção por BoHV-1 ou BoHV-5, entretanto, camundongos com deficiências genéticas na habilidade de produzir receptores de IFN $\alpha/\beta$  ou IFN $\gamma$  tornaram-se susceptíveis à infecção por BoHV-1 (Abril et al., 2004).



### 2.5.1 – Interferon tipo I

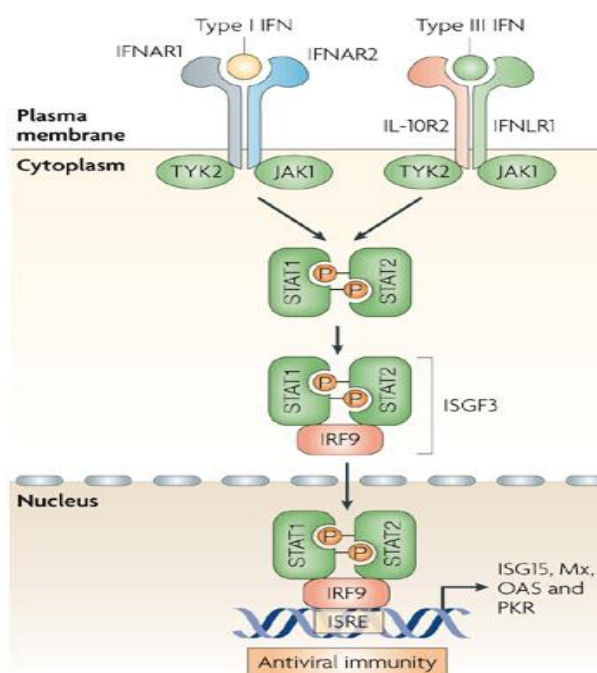
Em bovinos já foram identificados diversos subtipos de interferon tipo I, IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\omega$ , e ainda se observou a expressão de interferon-tau (IFN $\tau$ ), responsável pelo reconhecimento materno nessa espécie (Roberts et al., 1992; Roberts et al., 1999). Os interferons tipo I são proteínas compostas por 165 a 200 aminoácidos com formato helicoidal, constituídas por cinco  $\alpha$ -hélices (Mitsui & Senda, 1997). O domínio intracelular dos seus receptores está associado com tirosina-quinases específicas (Tyk-2) que, após interação com IFN tipo I são fosforiladas em outras tirosina-quinases (proteínas da família Janus quinase): JAK1 e JAK2. A ligação do IFN I ao receptor também resulta na fosforilação do receptor do interferon 1 (IFNR-1) por proteínas STAT1 e STAT2. Essas STATs recrutadas para a fosforilação do INFR-1 formam dois complexos denominados fator ativador de IFN- $\alpha$  (AAF) e fator genético 3 estimulador de IFN (ISGF3). Esses fatores são translocados para dentro do núcleo e unidos a seqüências de DNA chamadas GAS (sequência ativadora de IFN $\gamma$ ) e ISRE (elemento responsável pela estimulação de interferon). A sinalização de IFN resulta na indução da transcrição de centenas de genes-alvo, dentre eles, o gene p53, supressor de tumores (Honda et al., 2006).

Os IFN tipo I combatem os vírus diretamente através da inibição da sua replicação e indiretamente estimulando a resposta imunológica inata ou adaptativa. Por exemplo, induzem a citotoxicidade direta das células NK. (Stetson et al., 2006)

## 2.6 – Vias de sinalização do interferon

A via ativada após interação de IFN tipo I com o seu receptor é considerada um modelo de sinalização das citocinas. Os receptores dos interferons não têm atividade enzimática, mas desencadeiam uma via de sinalização complexa que culmina na transcrição de centenas de genes denominados de genes estimulados pelo interferon (ISGs) (Stark et al., 1998). As vias de sinalização e genes estimulados são determinantes no desfecho da infecção viral (Nagai et al., 2007).

Conforme representação mostrada na Figura 1, a ligação do IFN tipo I ou II aos receptores desencadeia a atividade de duas quinases associadas a estes receptores, JAK1 e TYK2. Estas quinases fosforilam as proteínas STAT, que formam complexos com outra proteína IRF-9. Este complexo designado por ISGF3 entra no núcleo e liga-se a sequências específicas (Interferon Stimulated Response Element, ISRE) na região promotora de múltiplos genes. Centenas de genes são expressos em resposta à ativação de STAT por IFN tipo I. (Stark et al., 1998; Tanabe et al., 2005).



**Figura 1.** Representação da via de sinalização dos receptores de IFN por fosforilação de diferentes quinases intracelulares. Fonte: Sadler & William, 2008.

O IFN tipo I também é capaz de induzir a expressão de proteínas que inibem a atividade do IFN, como em um sistema de auto-regulação. Os Supressor of Cytokine Signalling (SOCS), por exemplo, inibem a fosforilação de STAT pela ligação e inibição de JAKs ou competindo com STATs pelos sítios de ligação à fosfotirosina nos receptores de citocina, além da Protein Inhibitor of Activated STAT (PIAS) que age no núcleo e bloqueia a atividade transcricional de STAT (Gale. & Foy, 2005; Shuai, 2006).

### 2.7 – Efeitos do interferon nas células alvo

O efeito principal do IFN é a indução de genes com atividade antiviral, tais como PKR, proteínas resistentes a mixovírus (MxA, MxB) e RNaseL (Hovanessian, 2007)

Os IFN tipo I possuem efeitos antiproliferativos e apoptóticos. Também aqui existem diferenças de ação entre os vários subtipos de IFN tipo I, e a relativa potência neste efeito não se correlaciona com o efeito antiviral (Takaoka & Yanai, 2006).

O gene induzido pelo IFN tipo I mais estudado para herpesvírus é a proteína quinase de serina treonina ativada por RNA de dupla fita (PKR). O PKR ativado, por infecção viral, ou RNA de dupla fita, pode inibir vias reguladoras celulares, primariamente a tradução do mRNA e fatores da transcrição. Como o próprio IFN, RNA específicos dos vírus também ativam a PKR, que inibe a replicação e a produção de progênie viral (Chee & Roizman, 2004; Hovanessian, 2007).

As proteínas de resistência ao mixovírus (MxA e MxB) são GTPases induzidas pelo IFN-1. A sua função foi inicialmente determinada nos vírus influenza Thogoto. Estas proteínas celulares interferem com o acúmulo de RNA viral e proteínas deste vírus, bloqueando sua multiplicação (Frese et al., 1995). Essas proteínas também são capazes de se ligarem a proteínas do nucleocapsídeo de vírus da família *Bunyaviridae*, causando redistribuição das proteínas destes e levando à inibição da replicação viral (Billiau, 2006).

Além dos efeitos diretos sobre a replicação viral, os interferons I e II têm potentes ações imunomoduladoras. É provável que esta atividade envolva, não só a imunidade adaptativa, mas também a inata. As moléculas do MHC classe I e II apresentam peptídeos antigênicos derivados da degradação de proteínas virais, às células T CD8 e CD4 respectivamente. Durante uma infecção viral são ativadas células T CD8 de classe I, e T CD4 de classe II. O

IFN aumenta a expressão de MHC classe I e II, aumentando a resposta celular *in vivo*. Esta ação poderá contribuir para a recuperação da infecção e não apenas para a resposta inicial de defesa do hospedeiro (Petska et al., 2004; Plataniias, 2005; Amason, 1996).

### **2.8 – Regulação da expressão do IFN-1**

Conhecem-se dez fatores reguladores do IFN (Interferon regulating factors - IRF). IRF1 e IRF2 foram os primeiros a serem identificados pela sua capacidade de ativação e repressão da transcrição, respectivamente (Petska et al., 2004). São extremamente importantes durante a infecção e são alvos de regulação pelos vírus. Alguns vírus como o herpesvírus humano 8, vírus relacionado com Sarcoma de Kaposi, codificam homólogos de IRF, evadindo-se das defesas do hospedeiro (Lee et al., 2010). Os IRF1,IRF3,IRF5 e IRF7 atuam na transdução de vias de sinalização viral. Em resposta à infecção, estes fatores de transcrição são fosforilados e migram para o núcleo, onde ativam ou reprimem a transcrição de IFN ou dos genes regulados pelo IFN (Fuld et al., 2006).

### **2.9 – Bloqueio viral da ação do interferon**

Têm sido demonstrados, em diferentes vírus, mecanismos variados de defesa contra a resposta antiviral inata induzida por interferon (Leib, 2002). Por exemplo, os vírus podem codificar proteínas que bloqueiam o interferon, através da inibição da ação da proteína quinase induzida por interferon, o que resulta na inibição da ação das células NK, interferência com expressão de MHC na superfície celular, bloqueio da ativação do complemento, inibição da

sinalização de RNA de fita dupla, prevenção da indução da apoptose, inibição da biossíntese de interferon, entre outras ações (Didcock et al., 1999b; He et al., 2002; Wansley & Parks, 2002).

Quase todos os vírus desenvolveram estratégias de redução da atividade do PKR de forma que a sua replicação não esteja comprometida (Poppers et al., 2000). Há vários reguladores celulares, ativadores ou inibidores do PKR. Foi demonstrado também que as proteínas C, W e V do vírus Nipah inibem a transcrição viral e replicação de RNA (Sleeman et al., 2008). Essas proteínas formam interações de alta afinidade com STAT 1 e/ou 2 através de seus domínios N-terminais, assim como acontece com vírus Hendra (Shaw et al., 2004). A proteína V do gênero Henipavirus inibe a resposta do IFN ao sequestrar STAT1 e STAT2 em complexos citoplasmáticos, assim, prevenindo sua fosforilação de IFN mediada por tirosina (Rodrigues et al., 2002; 2003). A proteína W pode inibir a sinalização mediada por TLR3 devido à perda de atividade de IRF3, entretanto, o mecanismo pelo qual TLR3 leva à sinalização não foi ainda caracterizado (Shaw et al., 2005).

Em Herpesvírus humano tipo 1 (HHV-1), foi demonstrado que a proteína ICP 34.5 recruta uma fosfatase para desfosforilar a subunidade 2 alfa do fator de iniciação eucariótica (elf-2 $\alpha$ ) e assim impede a atividade de PKR, que desfosforila essa subunidade alfa em uma resposta inibitória à infecção (He et al., 1997). Assim, mutantes virais que são defectivos em ICP 34.5 exibem sensibilidade aumentada ao IFN (Poppers et al., 2000). Foi também demonstrado que a proteína US11 do HHV-1 previne a ativação de PKR (Cassady et al., 1998).

A proteína ICP0 do HHV-1 produzida nos estágios iniciais da infecção também pode inibir diferentes pontos da via de ativação do IFN-I. ICP0 é capaz de suprimir a indução dos genes estimulados por IFN (ISGs), e os vírus que não têm uma ICP0 funcional são, também, hipersensíveis ao IFN-I em cultivo (Eidson et al., 2002; Everett et al., 2004).

A proteína correspondente em BoHV-1 imediatamente precoce (IE) do BoHV-1, a *bovine infected cell protein 0* (bICP0) é conhecida como tendo uma importante atividade transativadora de promotores de genes virais (Zhang & Jones, 2001). Durante a infecção produtiva a expressão de bICP0 é constitutiva, pois o gene possui um promotor IE e um promotor E, e ambos os promotores são ativados pela própria bICP0 (Fraefel et al., 1994). bICP0 do BoHV-1 contém um dedo de zinco RING próximo ao seu domínio N-terminal que é necessária para ativar a transcrição, regular sua localização subcelular e inibir interferon dependente da transcrição (Saira et al., 2007).

Além de possuir a função de estímulo à expressão gênica, foi já demonstrado que a bICP0 inibe o promotor do IFN $\beta$  através da indução da degradação do fator 3 e 9 de resposta ao IFN (IRF3) e IRF9 (Henderson et al., 2005; Saira et al., 2007; 2009). Até o momento, a bICP0 é o único produto gênico conhecido que apresenta esta atividade (Zhang et al., 2005).

Foi demonstrado recentemente que a bICP0 do BoHV-5 pode complementar o seu homólogo BoHV-1 (Steiner et al., 2010). Assim, é provável que bICP0 de BoHV-5 tenha um papel no bloqueio da produção de IFN no hospedeiro, do mesmo modo que BoHV-1.

Tomando-se esses dados em conjunto, conclui-se que a resposta celular via produção de IFN-I é um aspecto importante da imunidade contra vários vírus, incluído alfa herpesvírus, e que, provavelmente, vírus que conseguem inibir esta resposta consigam infectar seu hospedeiro de forma mais eficaz e/ou duradoura.

### **2.10 – Proteína V/P dos paramixovírus**

Muitos paramixovírus suprimem a resposta de IFN-I ao bloquear a via de sinalização deste, utilizando diferentes mecanismos moleculares (Andrejeva, 2002). Muitos empregam a proteína V, codificada pelo parainfluenza vírus 5 (PIV5), vírus do sarampo e SV41, que bloqueia a sinalização de IFN ao direcionar STAT1 para degradação proteossômica, enquanto a proteína V do parainfluenza vírus humano tipo 2 (hIPV2) direciona STAT2 para degradação pela mesma via (Didcock et al., 1999b; Nishio et al., 2001). O vírus Sendai também bloqueia IFN-I, entretanto foi demonstrado que a proteína responsável por esta ação é a proteína C, e o processo não requer degradação de STAT, mas uma interação entre a proteína C e STAT (Kubota et al., 2001).

Até o momento, acredita-se que o domínio N-terminal e o domínio C-terminal, rico em cisteína da proteína V são essenciais para o processo de degradação. Evidências para um papel do domínio N-terminal surgiram a partir de observações em que a substituição de um único aminoácido nesta região influencia a capacidade da proteína V do SV5 em direcionar STAT1 para degradação em células de diferentes espécies (Komatsu et al., 2002).



As proteínas V e P do PIV5 são proteínas estruturais codificadas pelo mesmo gene V. Eles partilham dos mesmos 164 aminoácidos N terminais, mas foi demonstrado que é a proteína V, e não P, que bloqueia a via de sinalização de IFN ao direcionar STAT1 para degradação (Didcock et al., 1999a). A proteína V desse vírus também se liga à proteína solúvel do nucleocapsídeo viral (NP) e tem, assim, um papel na transcrição, replicação ou encapsidação do vírus (Randall et al., 1996). Entretanto, seu papel em direcionar STAT1 para degradação não depende da interação com a NP viral. De fato, células que expressam a proteína V constitutivamente na ausência de outras proteínas virais (células 2f/SV5-V), degradam STAT1 e não respondem a IFN  $\alpha$  ou  $\beta$ . Evento semelhante ocorre em células que expressam a proteína V do hPIV2, que não sintetizam STAT2 e não respondem a IFN $\alpha$  ou  $\beta$ , embora possam responder a INF $\gamma$  (Lyn et al., 2000; Andrejeva et al., 2002).

### 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 – Células e vírus

Para este trabalho, foram utilizadas células resistentes ao vírus da diarreia viral bovina (CRIB) que são derivadas de *Madin Darby Bovine Kidney cells* (MDBK) (Flores & Donis, 1995). As CRIB foram utilizadas para a multiplicação, titulação e os ensaios de crescimento *in vitro* de BoHV-1 e BoHV-5 e para as transfecções. Os cultivos celulares foram mantidos em meio mínimo essencial de Eagle (EMEM, *Gibco*) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB, *Cultilab*), antibiótico (2 mg/L de enrofloxacin, *Baytril/Bayer*) e antifúngico (2,0 µg/ml de anfotericina B, *Cristália*).

As amostras virais de BoHV-1 (EVI 123) e BoHV-5 (ISO 45/97) utilizadas neste estudo são oriundas do estoque de vírus do Laboratório de Virologia do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), isoladas respectivamente em 1998 e 1995 (Roehe et al., 1997; Souza et al., 2002).

#### 3.2 - Plasmídeos

O plasmídeo utilizado foi o pEF.IRES.neo.SV5 P/V possui um gene que codifica para a proteína V do parainfluenza vírus 5 (PIV5), o qual tem a função de inibir a função do interferon alfa e também expressa o gene para resistência ao G418 (Anexo A).

O plasmídeo foi multiplicado em células de *Escherichia coli* DH5α, após a sua transformação conforme protocolos usuais (Sambrook & Russell,

2001). Após a transformação destas células, procedeu-se à extração de DNA plasmideal através da técnica de lise alcalina (Sambrook & Russell, 2001). Em seguida, foram purificados com fenol (Invitrogen) e precipitados em etanol, segundo a técnica descrita por Sambrook & Russel (2001).

### **3.3 – Semiquantificação dos DNAs extraídos**

Para a semiquantificação, quantidades conhecidas de DNA de bacteriófago lambda (*Fermentas*) foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) a 1% com as amostras de DNA a serem analisadas. A semiquantificação foi feita por comparação da intensidade das bandas no gel com brometo de etídio (Invitrogen) sobre luz UV em transluminador.

### **3.4 – Titulação de BoHV-1 e BoHV-5**

Todos os testes *in vitro* foram feitos com os vírus previamente titulados em células CRIB. As células foram semeadas em placas de 96 poços com confluência de 100% e, logo após, foram adicionadas diluições seriadas na base 10 dos vírus BoHV-1 e BoHV-5. O resultado das titulações foi realizado sob microscópio óptico invertido, observando-se efeitos citopáticos (ECPs) após 3 dias de incubação a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.5 – Transfecção do DNA plasmideal**

Um dia anterior à transfecção, células CRIB foram semeadas em placas de 12 poços em uma densidade de  $2,0 \times 10^5$  células por poço. As células foram, então, transfectadas com 1,6 µg do plasmídeo homogeneizados a 4 µl de Lipofectamine2000™ (Invitrogen). O protocolo de transfecção foi o recomendado pelo fabricante do produto (Invitrogen) Para isolar células que

expressassem a proteína V do PIV5, as células transfectadas foram cultivadas após 72 h da transfecção, na presença de 400 µg de Geneticin/ml e as colônias de células resistentes a essa droga foram isoladas. As células sem o plasmídeo do PIV5 são referidas, a partir deste ponto, como CRIB, e aquelas com o plasmídeo, referidas como CRIB/V.

### **3.6 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar a presença do gene V nas células transfectadas**

As colônias selecionadas foram submetidas à extração de DNA e à PCR para detectar o gene V. Inicialmente, as células transfectadas foram digeridas com uma solução de lise de SDS (duodecil sulfato de sódio) a 1% e proteinase K (Invitrogen 20 mg/ml) por 1h a 37°C. O DNA celular total foi, então, extraído com fenol, precipitado com etanol e ressuspenso em 50 µl de TE ph 7,4 (10mM de Tris , 1 mM de EDTA) e armazenados a 4°C.). A análise da quantidade e qualidade dos DNAs obtidos foi realizada submetendo 5 µl da amostra extraída à eletroforese em gel de agarose a 1 % e comparando com quantidades conhecidas do DNA do bacteriófago Lambda. Os oligonucleotídeos utilizados no ensaio de PCR foram desenhados com base nas sequências do gene P do parainfluenza suíno, as quais estão disponíveis no banco de dados do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os oligonucleotídeos (oligonucleotídeo direto - PF 5“GTGCCAGCAGATGACAAAACAGTG3” e reverso – PR 5“AACCGGGTGCGATAGGATTCTC 3”) anelam na região do gene V e, amplificam um produto de 214 pb.

As reações de PCR foram realizadas com 1 mM de  $MgCl_2$  (*Invitrogen*); 0,8 pMol de cada oligonucleotídeo (*IDT*), 1U de Taq DNA polimerase (*Invitrogen*); 10 % de tampão de PCR (*Invitrogen*) e 0,4 mM de deoxinucleosídeos trifosfatos (*ABgene*) por reação, além de 50 ng de DNA total. Todas as reações foram feitas em um termociclador Eppendorf Mastercycler sob as seguintes condições: uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 1 min, seguida de 35 ciclos contendo: uma etapa de desnaturação a 95°C por 30s, uma de anelamento a 48°C por 30s e uma de extensão a 72°C por 30s; além disto, uma etapa final de extensão a 72°C por 5 min foi realizada.

Os resultados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% contendo brometo de etídeo (0,5 µg/mL), visualizados sob luz UV e comparados com marcador de peso molecular conhecido [50 bp DNA ladder (*Fermentas*)].

Além de detectar quais colônias de células possuíam o DNA plasmídeo, precedeu-se à detecção do número de cópias do plasmídeo presente nas células transfectadas. Para isso, foram preparadas reações de PCR, nas mesmas condições descritas acima, na presença de 50 ng de DNA de células CRIB e com diluições do plasmídeo original.

### **3.7 – Cinética de penetração**

O estabelecimento da cinética de penetração foi feito ao se permitir que 500 u.f.p (unidades formadoras de placa) (Franco et al., 2007) de BoHV-1 e BoHV-5 adsorvessem nas monocamadas pré-formadas em placas de seis poços de CRIB e CRIB/V por 1h a 37°C. Os cultivos celulares infectados foram

incubados por 2 minutos com uma solução de citrato de sódio (40 mM tri-Na-citrato-diidrato, 10mM de KCl, 135 mM de NaCl, ph 3,0) para inativar as partículas virais que não penetraram no referido tempo. Em seguida, as monocamadas foram lavadas duas vezes com PBS (Phosphate-buffered saline 1X) e 2 ml de meio fresco com soro foram adicionados. Em diferentes intervalos de tempo pós-adsorção (0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 e 120 min), os inóculos foram removidos e as células cobertas com meio semi-sólido (de forma que qualquer partícula viral produzida, como resultado da infecção não possa ultrapassar os limites do local de sua produção) e incubadas por cinco dias. Após esse tempo, as monocamadas foram fixadas e coradas com cristal violeta e as placas virais contadas para cada intervalo de tempo. As diferentes capacidades de BoHV-1 e BoHV-5 em penetrar nesses dois tipos celulares foi determinada comparando o número de placas em cada intervalo de tempo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

### **3.8 – Ensaio do tamanho de placa**

O ensaio do tamanho de placa foi realizado como anteriormente descrito por Franco et al (2007). Logo, as monocamadas confluentes de CRIB e CRIB/V foram preparadas em placas de seis poços, infectadas com 50 u.f.p de BoHV-1 e 50 u.f.p de BoHV-5 e mantidas sob meio semi-sólido por cinco dias. As monocamadas foram, posteriormente, fixadas, coradas e o diâmetro de 50 placas virais de cada tipo celular foi mensurado.

### **3.9 – Curvas de crescimento**

Curvas de crescimento *one step* foram realizadas, seguindo a infecção de células CRIB e CRIB/V em placas de 24 poços em multiplicidade de infecção (M.O.I) de 1 e 10, tanto para BoHV-1, quanto para BoHV-5. Uma hora após incubação, os cultivos infectados foram incubados com uma solução de citrato de sódio inativando vírus não penetrados, as monocamadas foram lavadas duas vezes com PBS e 1 ml de meio fresco foi adicionado em cada poço. Em vários intervalos de tempo pós-infecção (1,15; 3; 5; 7; 9; 11; 13; 15; 18; 24; 36 e 48h), o sobrenadante foi removido e armazenado a -80°C para posterior titulação de vírus extracelular presente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Títulos de vírus infecciosos foram calculados de acordo com método de Spearman-Karber e expressados como  $\log_{10}$  doses infecciosas para 50% de cultura de tecidos em 50  $\mu$ l (TCID<sub>50</sub>/50  $\mu$ l).

### **3.10 – Análise estatística**

A análise estatística foi feita usando o teste *t* Student e análise de variância (ANOVA), onde a menor diferença significativa em  $p=0,05$  seria determinada. O termo “significante” (estatisticamente significativo) no texto quer dizer  $p \leq 0,05$

## 4 – RESULTADOS

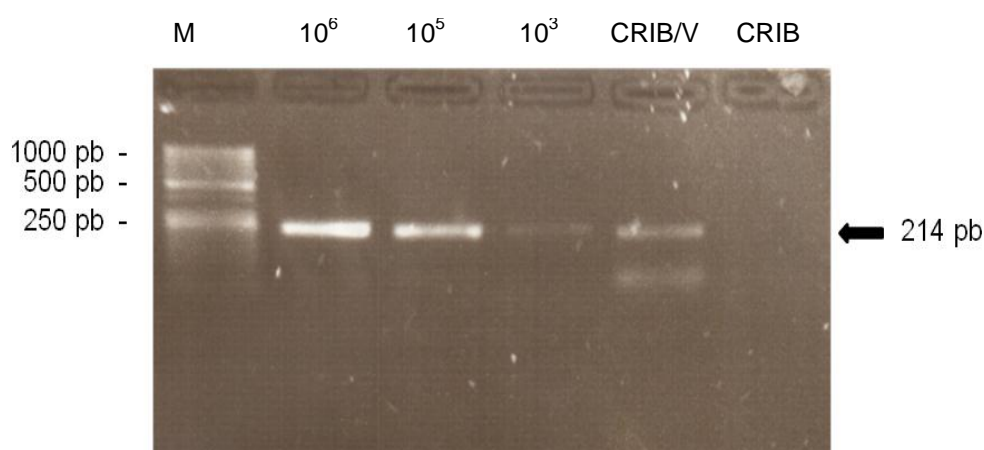
### 4.1 – Transfecção de células CRIB com pEF.IRES.neo.SV5 P/V

Com a finalidade de obter uma linhagem que expressasse de forma estável a proteína V celular estável, 1,6 µg do plasmídeo pEF.IRES.neo.SV5 P/V foi transfectado nas células CRIB. Após a transfecção, foi feita a seleção com antibiótico Geneticin para isolar as células que expressassem a proteína de interesse. Em torno de 42 colônias foram identificadas e clonadas. Dezesete colônias foram escolhidas, ao acaso, e testadas para a presença do gene V. Todas as colônias foram positivas na PCR para o gene V, utilizando-se a PCR anteriormente descrita. Todas as colônias foram positivas para o gene V, apresentando um produto de 214 pb. Todas as colônias apresentaram um produto de PCR com intensidade similar.

Uma dessas colônias foi, então, selecionada e chamada CRIB/V. Para estimar o número de cópias do plasmídeo por célula, o produto da PCR do gene V detectado em 50 ng de DNA de CRIB/V, foi comparado, em um gel de agarose, com diluições seriais de produtos de PCR de quantidades conhecidas do DNA plasmídeo pEF.IRES.neo.SV5 V/P misturados a 50 ng do DNA total de CRIB (Figura 1). Esta análise mostrou que em 50 ng do DNA de CRIB/V, aproximadamente,  $10^4$  cópias do plasmídeo pEF.IRES.neo.SV5 V/P



estavam presentes. Já que 50 ng de DNA genômico bovino é, aproximadamente, a quantidade encontrada em  $1,3 \times 10^4$  células bovinas, estimou-se que uma cópia do referido plasmídeo estava presente em cada célula CRIB/V. Este baixo número de cópias do plasmídeo nas colônias CRIB/V é, provavelmente, devido a uma seleção natural para células com uma baixa expressão de da proteína V, porque a hiperexpressão da proteína V em células desacelera o ciclo celular (Lin & Lamb, 2000).



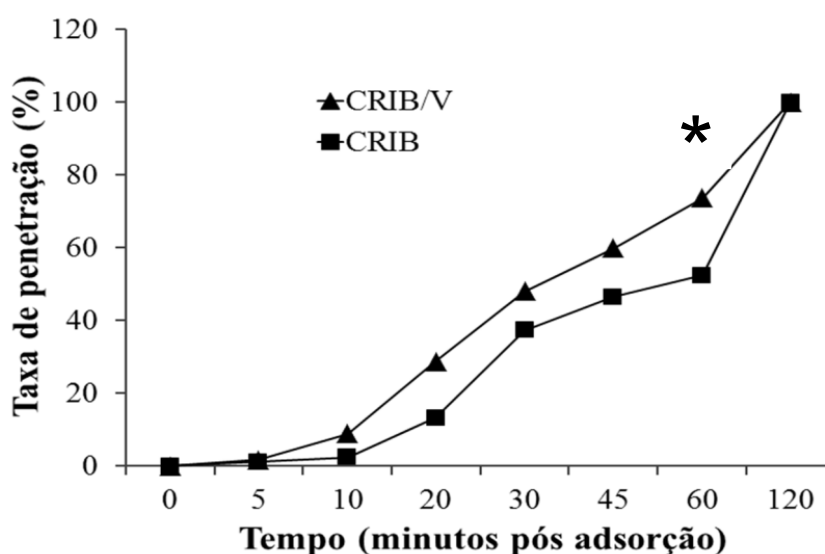
**FIGURA 2:** A reação de PCR para amplificação e quantificação do gene V após extração de DNA celular total das duas linhagens de células. Uma diluição serial (10X) do DNA plasmídeo de pEF.IRES.neo.SV5 V/P, assim como 50 ng de CRIB/V e DNA celular total de CRIB foram amplificados e 5  $\mu$ l da reação de PCR (25  $\mu$ l) foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%. 1) marcador de 50 pb (Fermentas). Diluições do plasmídeo contendo aproximadamente  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  e  $10^3$  moléculas do plasmídeo. Controle negativo: células CRIB.

#### 4.2 – Cinética de penetração

As curvas de penetração da amostra ISO 45/97 obtidas a partir dos ensaios com CRIB e CRIB/V estão apresentadas na figura 2. As placas virais começaram a ser observadas em ambos os tipos celulares no mesmo período (10 min pós-adsorção ou p.a). As porcentagens de penetração nas células

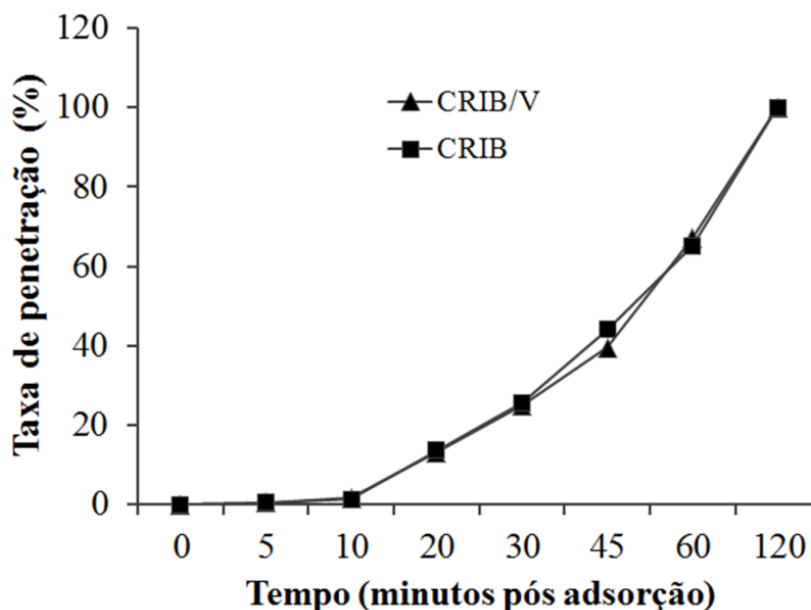
CRIB/V em 10, 20, 30, 45 e 60 min p.a foram maiores que em CRIB, mas esta diferença foi significativa apenas em 60 min, p.a \*, quando a penetração viral alcançou 70% em CRIB/V e 50% em CRIB. Aos 120 min. p.a, a penetração viral em ambas as células foram indistinguíveis, alcançando um nível de aproximadamente 95% de penetração viral.

Por outro lado, ao analisar a curva de penetração do BoHV-1 EVI 123, os dados obtidos mostraram uma situação inversa. De acordo com o gráfico na figura 3, as placas virais começaram a ser observadas em ambas as células após 10 min de adsorção e permaneceram indistinguíveis em todos os períodos alcançando um nível de penetração de 95% aos 120 min.



**Figura 3.** Comparação da cinética de penetração do ISO 45/97 nas células CRIB e CRIB/V.

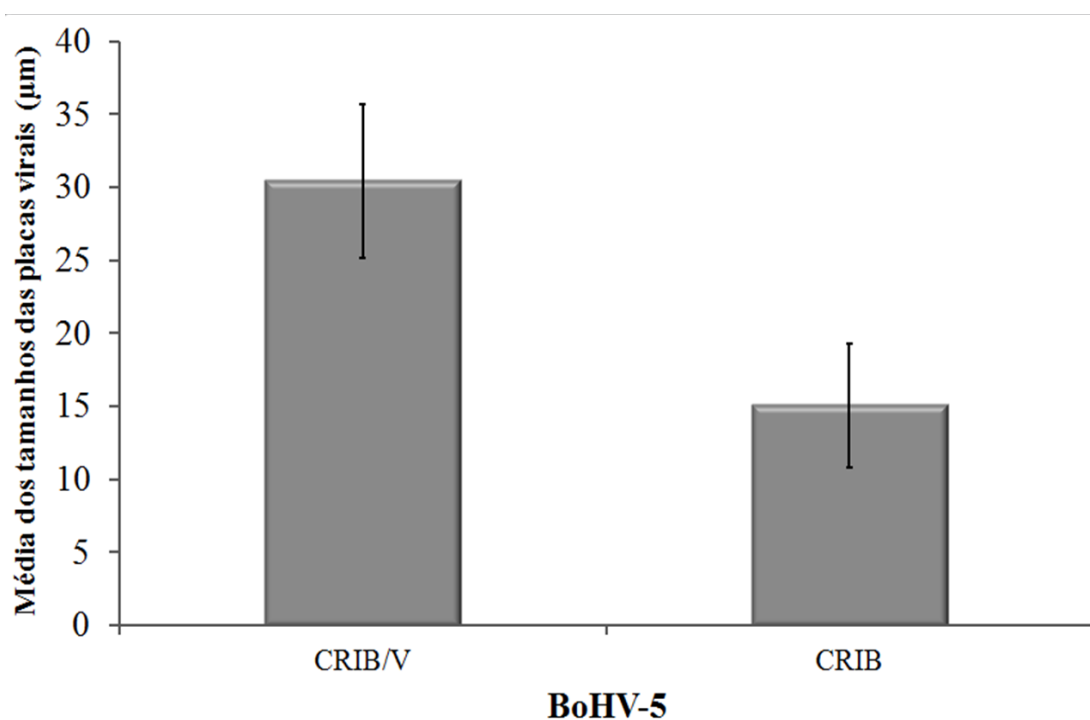
\*Estatisticamente significativo



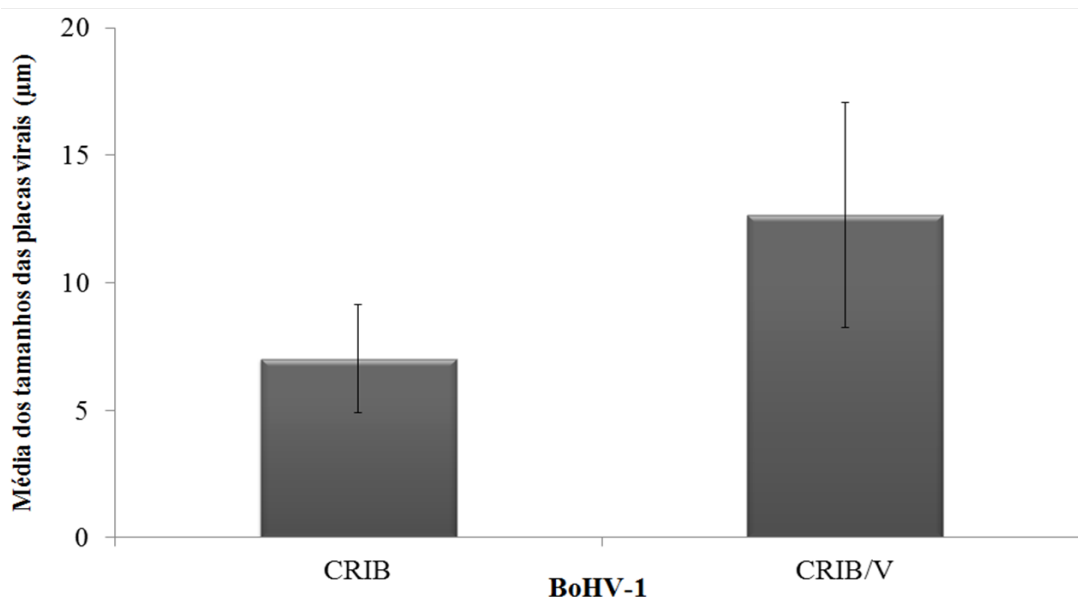
**Figura 4.** Comparação da cinética de penetração de EVI 123 nas células CRIB e CRIB/V.

#### 4.3 – Ensaio de tamanho de placa

Os tamanhos das placas virais em CRIB/V foram, claramente, maiores que as placas observadas em CRIB, tanto para a amostra ISO 45/97, quanto para a amostra EVI 123. O tamanho médio das placas de ISO 45/97 após 5 dias sob meio semi-sólido nas células CRIB foi de 15  $\mu\text{m}$  (+/- 8  $\mu\text{m}$ ), enquanto que em CRIB/V, o tamanho médio foi de 30  $\mu\text{m}$  (+/- 4  $\mu\text{m}$ ) (Fig. 4). O tamanho médio das placas de BoHV-1 EVI 123 (Fig. 5), nas mesmas condições também foram inferiores em CRIB ,com média de 7  $\mu\text{m}$  (+/- 3  $\mu\text{m}$ ), enquanto que em CRIB/V a média foi de 12  $\mu\text{m}$  (+/- 6  $\mu\text{m}$ ).



**Figura 5.** Representação gráfica da média dos tamanhos de placa em células CRIB e CRIB/V com seus desvios padrões. Os valores foram estimados ao medir 50 placas virais de cada linhagem celular infectada com ISO 45/97.



**Figura 6.** Representação gráfica da média dos tamanhos de placa em células CRIB e CRIB/V com seus desvios padrões. Os valores foram estimados ao medir 50 placas virais de cada linhagem celular infectada com EVI 123

Essas diferenças, tanto em BoHV-1 quanto em BoHV-5, foram consideradas estatisticamente significativas ( $p < 0,0001$ ).

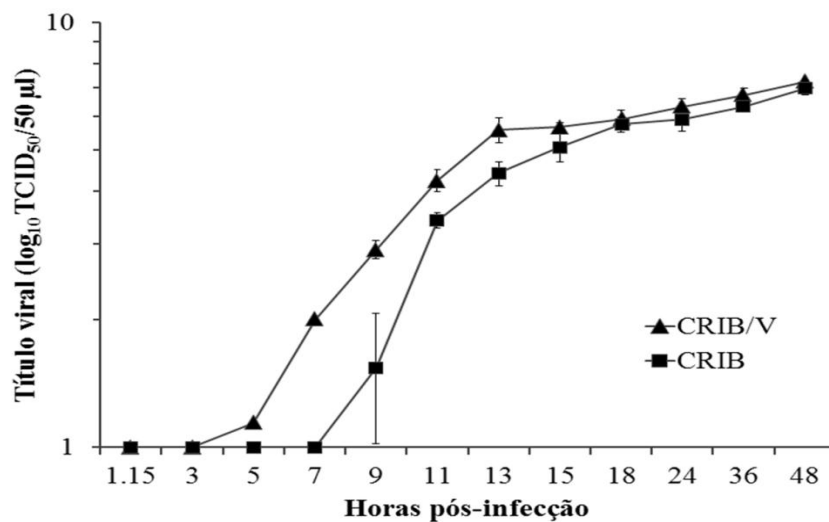
#### 4.5 – Curva de crescimento

A comparação das curvas de crescimento feitas por inoculação de 1 M.O.I das amostras EVI 123 e ISO 45/97 em CRIB e CRIB/V não mostrou diferenças significativas (dados não apresentados). Para ambos os vírus e células, as progênes virais começaram a surgir após 11h de inoculação e permaneceram similares em todos os períodos.

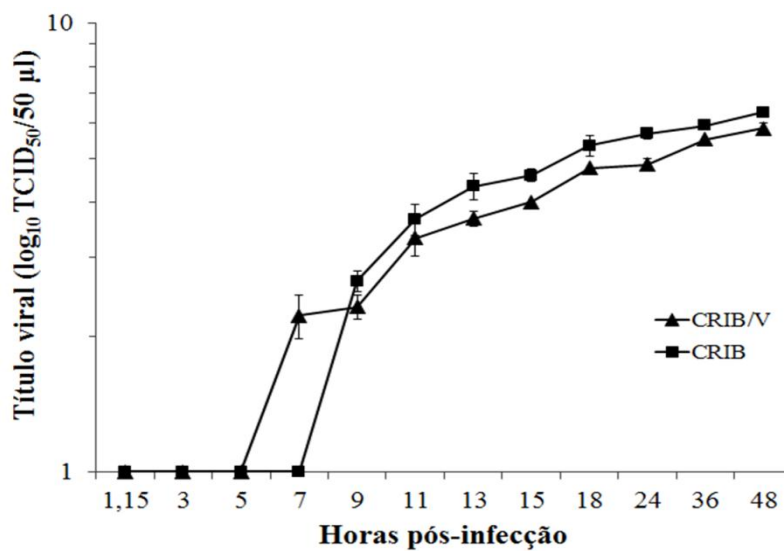
Entretanto, ao analisar a curva de crescimento feita por inoculação de 10 M.O.I de ISO 45/97 (Fig. 7), vírus infecciosos começaram a ser detectados previamente em células CRIB/V (em 5h p.i) em comparação com CRIB (em 9h p.i). Às 13h p.i., o título de ISO 45/97 permaneceu estatisticamente superior em CRIB/V ( $10^{4,57}$  TCID<sub>50</sub>/50μl) em comparação ao título encontrado em CRIB ( $10^{3,41}$ TCID<sub>50</sub>/50μl em 13h p.i.). A principal diferença nos títulos virais calculados foi de 1 log<sub>10</sub>. A partir de 15h p.i, os títulos virais em ambas as células não foram significativamente diferentes e os vírus alcançaram títulos similares às 48h p.i. ( $10^6$  TCID<sub>50</sub>/50μl em células CRIB e  $10^{6,25}$  TCID<sub>50</sub>/50μl) em células CRIB/V.

Por outro lado, analisando a curva de crescimento obtida por inoculação de 10 M.O.I de EVI 123 (Fig. 8), ocorreu uma situação diferente. Embora vírus infecciosos começassem a ser detectados em CRIB/V às 7 h p.i ( $10^{1,23}$  TCID<sub>50</sub>/50μl) e os títulos virais permaneceram superiores (não estatisticamente) até 9 h p.i., quando os títulos em CRIB começaram a ser detectados, a partir deste ponto, os títulos virais de EVI 123 permaneceram algumas vezes iguais ou superiores em CRIB ( $10^{2,65}$ ,  $10^{3,32}$ ,  $10^{3,58}$ ,  $10^{4,32}$ ,  $10^{4,66}$ ,  $10^{4,91}$ ,  $10^{5,33}$  TCID<sub>50</sub>/50μl em 11, 13, 15, 18, 24, 36 e 48 h p.i., respectivamente)

em comparação a CRIB/V ( $10^{2,32}$ ,  $10^{2,66}$ ,  $10^3$ ,  $10^{3,75}$ ,  $10^{3,83}$ ,  $10^{4,5}$ ,  $10^{4,83}$  TCID<sub>50</sub>/50µl em 11, 13, 15, 18, 24, 36 e 48 h p.i., respectivamente).



**Figura 7.** Cinética de crescimento de BoHV-5 em células CRIB e CRIB/V. Títulos virais estão expressos como TCID<sub>50</sub>/50 µl e indicados em uma escala log<sub>10</sub>.



**Figura 8.** Cinética de crescimento de BoHV-1 em células CRIB e CRIB/V. Títulos virais estão expressos como TCID<sub>50</sub>/50 µl e indicados em uma escala log<sub>10</sub>.

## 5 – DISCUSSÃO

Com a finalidade de compreender os efeitos da resposta inata de IFN tipo I na replicação de BoHV-1 e BoHV-5, estabelecemos uma linhagem celular (CRIB/V) que expressa a proteína V do PIV5 constitutivamente. Estas células foram utilizadas para estudar os diferentes aspectos da multiplicação de BoHV-1 e BoHV-5 em comparação com suas células parentais CRIB.

Os efeitos da expressão da proteína V do PIV5 na multiplicação do BoHV-1 e 5 foram diferentes. Observamos que a penetração do BoHV-5 nas células CRIB/V foi um pouco mais eficaz do que nas células CRIB e, aos 60 min pós adsorção, esta diferença foi estatisticamente significativa. Também se observou, nos ensaios de cinética da replicação, que o BoHV-5 alcançou títulos significativamente maiores em estágios iniciais do seu crescimento em células CRIB/V em comparação com células CRIB. Os títulos virais finais, no entanto, foram similares nos dois tipos celulares. Mais marcante foi a observação do tamanho médio das placas virais produzidas pelo BoHV-5 em CRIB/V que foram significativamente maiores que as médias encontradas nas células CRIB. Por outro lado, os dados sobre o crescimento *in vitro* de BoHV-1 aqui obtidos foram diferentes do observado com o BoHV-5. A penetração viral do BoHV-1 ocorreu com mais eficácia em células CRIB, e foram observadas diferenças estatísticas significativas entre 45 e 120 min. pós-adsorção em comparação

com CRIB/V. O baixo desempenho das CRIB/V após a infecção pelo BoHV-1 nas curvas de crescimento poderia ser explicado por haver ainda, nas células transfectadas (CRIB/V), um baixo nível de sinalização de interferon o que induziria um estado antiviral nestas células. Esse fenômeno foi observado por Young et al.(2003), que transfectaram células BF com o gene V, e, mesmo após a infecção com SV5, observaram que ainda havia um baixo nível de sinalização de IFN, mantendo estas células em um estado antiviral. De fato, tendo em vista que o bloqueio da sinalização de IFN é uma estratégia óbvia dos vírus, provavelmente as células possuem outras estratégias compensatórias para induzir respostas antivirais. A inibição induzida por interferon poderia ainda estar acontecendo anterior à infecção pelo BoHV-1, assim, um estado antiviral já estaria estabelecido antes que a proteína V pudesse ser expressa. Isso poderia ser desencadeado pela presença de um DNA plasmideal, que pode ser reconhecido por um sensor de DNA citosólico, desencadeando a produção de IFN (Alamares et al.,2010). Uma explicação adicional para estes dados poderia ser o fato das células CRIB infectadas com BoHV-1 terem continuado a crescer e se dividir em uma taxa mais baixa do que as células CRIB/V, que poderia estar passando por uma extensiva morte celular. Desta forma, a capacidade de BoHV-1 se disseminar pela população celular poderia estar subestimada devido à perda celular. No entanto, nenhuma destas explicações pode ser utilizada na interpretação dos resultados dos ensaios de tamanho de placa do BoHV-1, que foram semelhantes aos resultados de tamanho de placa do BoHV-5.



Interessante que camundongos que não expressam receptores de IFN tipos I e II morrem em poucos dias após uma infecção com BoHV-1 (Abril et al., 2004). Por outro lado, a infecção de camundongos normais não leva a sinais clínicos ou extensa replicação viral, o que acentua o importante papel que o IFN-I tem no controle da replicação e patogenicidade de BoHV-1 (Abril et al., 2004).

Vários estudos foram feitos com herpes simplex 1 ou herpesvírus humano 1 (HHV-1) que é outro membro da subfamília *Alphaherpesvirinae*, com o objetivo de entender o efeito do bloqueio do receptor de IFN-I pela proteína V do PIV5 na replicação deste vírus. Embora curvas de crescimento não tenham sido realizadas, Barreca e O'Hare (2004) mostraram que a infecção de HHV-1 progrediu mais rapidamente em células MDBK/V do que em células MDBK. Outros estudos analisaram a indução de IFN e ISGs e mostraram que a infecção por HHV-1 normalmente desencadeia uma resposta celular inicial, entretanto, posteriormente a suprime. A sinalização de IFN influencia o resultado da infecção em modelos murinos, enquanto que, em cultivo, HHV-1 é relativamente resistente a IFN-I e ao estado antiviral mediado por IFN-I (Leib et al., 1999).

As diferenças aqui encontradas nos tamanhos de placa do BoHV-5 estão de acordo com os resultados mostrados por Barreca e O'Hare (2004), que mensuraram e compararam os tamanhos de placa de HHV-1 em células MDBK e MDBK/V. Esses autores observaram tamanhos de placa viral maiores em MDBK/V do que em MDBK (Barreca e O'Hare; 2004).

Os dados aqui obtidos sugerem que o BoHV-5 sofre o efeito, pelo menos nas etapas iniciais da replicação, da produção de IFN-I pelas células infectadas. Consequentemente, parece lógico que estes vírus desenvolvam mecanismos que bloqueiam o efeito dessa proteína. Já foi demonstrado que a proteína ICP0 está envolvida na supressão de IFN-I e bloqueio da indução da ISG pelos HHV-1. O HHV-1 que não tem uma ICP0 funcional é muito mais sensível ao IFN-I (Mossmann et al.,2000). A proteína bICP0 do herpesvírus bovino tipo I é responsável por ativar uma infecção produtiva e expressão de genes virais. Foi demonstrado que esta proteína é capaz de degradar IRF-3 (Henderson et al., 2005) e, também, inibir a trans-ativação de IRF-7, desta forma, inibindo a estimulação da atividade do promotor de IFN $\beta$  (Saira et al., 2007 & 2009).

O quadro geral que emerge é que BoHV-5, assim como outros alfa herpesvírus, neutraliza a primeira fase da resposta imune inata antiviral ao bloquear a produção de IFN $\beta$ . A proteína responsável é provavelmente a ICP0 e as proteínas-alvo são os fatores de regulação de interferon 3 e 7 (IRF3 e IRF7). Baseados nos resultados de nosso estudo, nós podemos inferir que BoHV-5 não bloqueia, ou bloqueia somente de uma forma limitada a segunda fase das respostas antivirais, caracterizadas pela sinalização do receptor de IFN-I e uma posterior ativação dos genes estimulados pelo IFN (ISGs). Como consequência, a expressão constitutiva da proteína V do PIV5 foi vantajosa para a multiplicação de BoHV-5. A proteína V do PIV5 é capaz de bloquear a sinalização do receptor de IFN-I, mas também pode bloquear a produção de IFN $\beta$  (Andrejeva et al., 2004). Assim, a expressão da proteína V do PIV5 pode

afetar a primeira e segunda fase resposta imune inata. Como os alfaherpesvírus já bloqueiam a produção de IFN $\beta$ , é mais provável, embora não comprovado, que o bloqueio de IFN-I é responsável pela vantagem no crescimento que foi observado para BoHV-5 nas células CRIB/V.

Experimentos semelhantes foram realizados também com outros vírus. Young et al (2003), por exemplo, produziram diferentes linhagens de células humanas expressando a proteína V do PIV5 para bloquear a via de sinalização do receptor de IFN-I e observaram que o vírus respiratório sincicial (RSV) e o vírus *Bunyamwera*, que é um *Orthobunyavirus*, produziu títulos de 10 a 4000 vezes maiores nas células não responsivas a IFN-I, em comparação às células parentais. Por outro lado, Sherwood et al. (2007) analisaram a replicação do adenovírus entérico humano tipo 40 (HAdV-40) em células 293/V, comparando com as células parentais 293 e mostraram que a progênie viral resultante em ambas as células foram mais ou menos a mesma em 12h pós infecção.

É interessante notar que embora o BoHV-1 e o BoHV-5 sejam geneticamente e antigenicamente relacionados, eles aparentemente diferem na sua relação com a resposta imune inata. Foi aqui demonstrado que o efeito do bloqueio da via de sinalização de IFN-I pela proteína V é muito mais evidente em BoHV-5 do que BoHV-1, o que nos faz deduzir uma diferença fenotípica de sua resposta imune inata e adaptativa que possa ter ocorrido durante sua biologia evolutiva.

A falta de uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares da inibição da replicação de BoHVs mediada por IFN é devida, em parte, à falta

de um modelo adequado para estudar estes eventos. O desenvolvimento de células que apresentam modificações em genes relacionados à imunidade inata contribui para o esclarecimento de como ocorrem os primeiros passos da relação vírus-célula, o que, conseqüentemente, interfere no resultado final da infecção do hospedeiro. Futuros estudos visando a manipulação de outros genes celulares e virais, como a bICP0, deverão ser realizados, visando o aprofundamento dos dados aqui apresentados.

## 6 – CONCLUSÕES

Nossos resultados indicam que o bloqueio da via de sinalização do IFN-I pela proteína V do PIV5 facilitou a penetração, liberação e disseminação célula-célula do BoHV-5 em células bovinas. Estes dados sugerem que, embora o BoHV-5 bloqueie parte da resposta inata de IFN-I, ele ainda é sensível aos efeitos antivirais de IFN-I durante os estágios iniciais da infecção; Esta sensibilidade para IFN-I pode explicar os efeitos negativos de fortes indutores de IFN-I na replicação de BoHV-1 *in vivo* (Strube et al., 1989; Castrucci et al., 2000).

Por outro lado, a mesma conclusão não pode ser obtida a partir dos mesmos experimentos feitos com o BoHV-1. De fato, os dados obtidos com esse vírus parecem indicar que a multiplicação do BoHV-1 não é afetada pelo IFN-1 da mesma forma que ocorre com o BoHV-5. Nesse sentido, mais experimentos devem ser realizados para elucidar as interações entre o IFN-1 e a multiplicação do BoHV-1.

## 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRIL, C., ENGELS, M., LIMMAN, A., HILBE, M., ALBINI, S., FRANCHINI, M., SUTER, M., ACKERMAN, M. Both viral and host factors contribute to neurovirulence of bovine herpesvirus 1 and 5 in interferon receptor-deficient mice. **J. Virol.**, United States, v 78,p. 3644-3653, 2004.

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

AKIRA, S; TAKEDA, K..Toll-like receptor signaling. **Nature Reviews Immunology**, United Kingdom, v. 4, p. 499-511, 2004.

ALAMARES, J. G.; ELANKUMARAN, S.; SAMAL, S. K.; IORIO, M. K. The interferon antagonistic activities of the V proteins from two strains of Newcastle disease virus correlate with their known virulence properties. **Virus Res.**, United States, v. 147, p. 153-157, 2010.

ANDREJEVA, J.; YOUNG, D.F.; GOODBOURN, S.; RANDALL, R.E..Degradation of STAT1 and STAT2 by the V proteins of simian virus 5 and human parainfluenza virus type 2, respectively: consequences for virus replication in the presence of alpha/beta and gamma interferons. **J. Virol.** United States, v. 76, p. 2159–2167, 2002.

AMASON, B.G. Interferon beta in multiple sclerosis. **Clin Immunol Immunopath**, v. 81, p. 1-11, 1996.

ANK, N.; WEST, H.; BARTHOLDY, C.; ERIKSSON, K.; THOMSEN, A. R.; PALUDAN, S. R. Lambda interferon (IFN-lambda), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo. **J.Virol.**,United States, v 80,p. 4501-4509, 2006

BARRECA, C. & O'HARE, P. Suppression of herpes simplex virus 1 in MDBK cells via the interferon pathway. **J. Virol**, *United States*, v.78,p 8641-8653, 2004.

BELKNAP, E.B.; COLLINS, J.K.; AYERS, V.K.; SCHULTHEISS, P.C. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 1.3. **Vet. Pathol.**, *United States*, v.31, n.3, p.358-365, 1994.

BILLIAU, A. Interferon: the pathways of discovery I. Molecular and cellular aspects. **Cytokine Growth Factor Rev.**, *United States*, v.17,p.381-409, 2006.

BIRON, C. A. Cytokines in the generation of immune responses to, and resolution of, virus infection. **Curr Opin Immunol**, *England*, v. 6, p.530-538, 1994.

BOWIE, A. G. Translational mini-review series on Toll-like receptors: recent advances in understanding the role of Toll-like receptors in antiviral immunity. **Clin.Exp.Immunol.**,*United States*, v 147, p. 217-226, 2007.

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

CANANT, J. C. Diagnosis of the cause of bovine abortion. **Modern Veterinary Practice**, *United States*, v. 65, p. 929 – 931, 1984.

CASSADY, K. A.; GROSS, M.; ROIZMAN, B. The herpes simplex virus US11 protein effectively compensates for the gamma1(34.5) gene if present before activation of protein kinase R by precluding its phosphorylation and that of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. **J. Virol.**, *United States*, v.72, p.8620–8626, 1998.

CASTRUCCI, G., OSBURN, B.I., FRIGERI, F., FERRARI, M., SALVATORI, D., LO DICO, M., BARRECA, F. The use of immunomodulators in the control of infectious bovine rhinotracheitis. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, *United States*, V. 23,p. 163-173, 2000.

CHEE, A.V.; ROIZMAN B. Herpes simplex virus 1 gene products occlude the interferon signaling pathway at multiple sites. **J. Virol.** United States, v.78, p.4185–4196, 2004.

COLLINS, J. K. Antigenic differences between the major glycoproteins of bovine herpesvirus type 1.3, **J. Gen. Virol.**, England ,v.74, p.1509-1517, 1993.

CONNOLLY, S.A.; WHITBACK, J.C.; RUX, A.H.; KRUMMENACHER, C.; HURK, S.D.L.; COHEN, G.H.; EISENBERG, R.J. Glycoprotein D homologs in Herpes Simplex Virus Type 1, Pseudorabies Virus, and Bovine Herpesvirus type 1 bind directly to human HveC (Nectin-1) with different affinities, **Virology**, United States, v. 280, p. 7-18, 2001.

DELHON, G.; MORAES, M.P.; LU, Z.; AFONSO, C.L.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; KUTISH, G.F.; ROCK, D.L. Genome of bovine herpesvirus 5. **J. Virol.**, United States, v.77, n.19, p.10339-10347, 2003.

DIDCOCK, L., YOUNG, D.F., GOODBOURN, S., RANDALL, R.E. The V protein of simian virus 5 inhibits interferon signaling by targeting STAT1 for proteasome-mediated degradation. **J. Virol.**, United States, v. 73, p. 9928-9933, 1999a.

DIDCOCK, L., YOUNG, D.F., GOODBOURN, S., RANDALL, R.E. Sendai virus and SV5 block activation of IFN-responsive genes: importance of virus pathogenesis. **J. Virol.**, United States, v. 73, p. 3125-3133, 1999b.

D'OFFAY, J.M.; MOCK, R.E.; FULTON, R.W. Isolation and characterization of encephalitic bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle in North America. **Am. J. Vet. Res.**, United States, v.54, n.4, p.534-539, 1993.

EIDSON, K. HOBBS, W.E.; MANNING, B.J.; CARLSON, P.; DELUCA, N.A. Expression of herpes simplex virus ICP0 inhibits the induction of interferon-stimulated genes by viral infection. **J. Virol.** United States, v 76, p.2180–2191, 2002.

ENQUIST, L.W.; TOMISHIMA, M.J.; GROSS, S.; SMITH, G.A. Directional spread of an  $\alpha$ -herpesvirus in the nervous system. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.86, p.5-16, 2002.



EVERETT, R. D., BOUTELL, C.; ORR, A.. 2004. Phenotype of a herpes simplexvirus type 1 mutant that fails to express immediate-early regulatory protein ICP0. **J. Virol.** United States, v 78, p.1763–1774, 2004.

FRANCO, A.C., HÜBNER, S.O., OLIVEIRA, A.P., BATISTA, H.B.C.R., ROEHE, P.M., RIJSEWIJK, F. Construction and characterization of a bovine herpesvirus 5 mutant with a deletion of the gI, gE and US9 genes. **Braz. J. Microbiol.** v 38, p. 667-673, 2007

FLINT, M.; McKEATING, J.A. The role of hepatitis C glycoproteins in infection. **Reviews in Medical Virology**, v.10, p. 101-117, 2000.

FLORES, E.F., DONIS, R.. Isolation of a mutant MDBK cell line resistant to bovine virus diarrhea virus (BVDV) due to a block in viral entry. **Virology**, United States, v. 208, p 565-575, 1995.

FRESE, M.; KOCHS, G.; DIETER-MEIER, U.; SIBLER, J.; HALLER, O. Human MxA protein inhibits tick-borne Thogoto virus but not Dhori virus. **J. Virol**, United States, v.69, p. 3904-3909, 1995.

FULD S.; CUNNINGHAM, C.; KLUCHER, K.; DAVISON, A. J.; BLACKBOURN, D. J. Inhibition of interferon signaling by the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus full-length viral interferon regulatory factor 2 protein. **J. Virol.** United States, v. 80, p. 3092–3097, 2006.

GALE, M. & FOY, E. M.. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. **Nature**, United Kingdom, v. 436, p. 939-945, 2005.

HALLER, O.; KOCHS, G.; WEBER, F. The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. **Virology**, United States, v. 344, p.119-130, 2006

HE, B.; GROSS, M.; ROIZMAN, B. The gamma(1)34.5 protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1alpha to dephosphorylate the alpha subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase. **Proc. Natl. Acad. Sci.** United States, v. 94, p. 843–848, 1997.

HENDERSON, G., ZHANG, Y., JONES, C. The bovine herpesvirus 1 gene encoding infected cell protein 0 (bICP0) can inhibit interferon-dependent transcription in the absence of other viral genes. **J. Gen. Virol.**, England, v. 86, p 2697-2702, 2005.

HONDA, K.; TAKAOKA, A.; TANGUCHI, T.; Type I interferon gene induction by the regulatory factor family of transcription factors. **Immunity**, United States, v. 24, p.349-360, 2006.

HOVANESSIAN, A.G. On the discovery of interferon-inducible, double-stranded RNA activated enzymes: The 2'-5'oligoadenylate synthetases and the protein kinase PKR. **Cytokine Growth Factor Rev.**, United States, v. 18, p 351-361, 2007.

HÜBNER, S.O.; OLIVEIRA, A.P.; FRANCO, A.C.; ESTEVES, P.A.; SILVA, A.D.; SPILKI, F.R.; RIJSEWIJK, F.A.M.; ROEHE, P.M. Experimental infection of calves with a gI, gE, US9 negative bovine herpesvirus type 5. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, England, v.28, p.187-196, 2005.

JONES, C.; GEISER, V.; HENDERSON, G.; JIANG, Y.; MEYER, F.; PEREZ, S.; ZHANG, Y.; Functional analysis of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) genes expressed during latency. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.113, p.199-210, 2006.

KAHRS, R.F. **Viral Diseases of Cattle**. Iowa: Published by Blackwell Publishing. 2001. p.324.

KOMATSU, T.; TAKEUCHI, K., YOKOO J.; GOTOH, B. Sendai virus C protein impairs both phosphorylation and dephosphorylation processes of Stat1. **FEBS Lett.**, Netherlands, v. 511, p. 139–144, 2002.

KOTENKO, S. V.; GALLAGHER, G.; BAURIN, V.V.; LEWIS-ANTES, A.; SHEN, M.; SHAH, N.K.; LANGER, J.A.; SHEIKH, F.; DICKENSHEETS, H.; AND R. P. DONNELLY, R.P. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. **Nat Immunol** , United States, v.4, p.69-77, 2003.

KUBOTA, T.; YOKOSAWA, N.; YOKOTA, S.; FUJII, N.. C terminal CYSRICH region of mumps virus structural V protein correlates with block of interferon alpha and gamma signal transduction pathway through decrease

of STAT 1-alpha. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, United States, v.283, p. 255–259, 2001.

LEE, H.; LEE, S.; CHAUDHARY, P.M.; GILL, P.; JUNG, U.J. Immune evasion by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. **Future Microbiology**, United States, v. 5, p. 1349-1365, 2010.

LEIB, D.A., HARRISON, T.E., LASLO, K.M., MACHALEK, MOORMAN, N.J., VIRGIN, H.W. Interferons regulate the phenotype of wild-type and mutant herpes simplex viruses in vivo. **J. Exp. Med.**, United States, v.189, p. 663-672, 1999.

LEIB, D. A. 2002. Counteraction of interferon-induced antiviral responses by herpes simplex viruses. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** Germany, v, 269, p. 171–185, 2002.

LIEN, E.; SELLATI, T.; YOSHIMURA, A.; FLO, T. H.; RAWADI, R.; FINBERG, R. W.; CARROLL, J.; ESPEVIK, T.; INGALLS, R.; RADOLF, J.; GOLENBOCK, D. T. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. **J. Biol. Chem.** United States, v. 274, p.33419–33425, 1999

LIN, G. Y., LAMB, R.A.. The paramyxovirus simian virus 5 V protein slows progression of the cell cycle. **J. Virol.** United States, v. 74, p.9152–9166, 2000.

LOVATO, L., INMAN, M., HENDERSON, G., DOSTER, A., JONES, C. Infection of Cattle with a Bovine Herpesvirus 1 Strain That Contains a Mutation in the Latency-Related Gene Leads to Increased Apoptosis in Trigeminal Ganglia during the Transition from Acute Infection to Latency. **J. Virol.**, United States, v. 77, p. 4848-4857, 2003.

LUNARDI, M.; CLAUS, M.P.; LISBOA, J.A.N.; AMUDE, A.M.; HEADLEY, S.A.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Neurological and Epidemiological Aspects of a BoHV-5 Meningoencephalitis Outbreak. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, Brasil, v.52, p.77-85, 2009.

MARS, M.H.; DE JONG, M.C.; VAN MAANEN, C.; HAGE, J.J.; VAN OIRSCHOT, J.T. Airborne transmission of bovine herpesvirus 1 infections in calves under field conditions. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.76, p.1–13, 2000.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. J. Decoding the patterns of self and non-self by the innate immune system. **Science**, United States, v. 296, p.298–300, 2002.

METTENLEITER, T. C. Herpesvirus Assembly and Egress. **J. Virol.**, United States, v.76, n.4, p.1537-1547, 2002.

METTENLEITER, T.C.; KLUPP, B.G.; GRANZOW, H. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. **Curr. Opin. Microbiol.**, England, v.9, p.423-429, 2006.

METZLER, A.E.; SCHUDEL, A.A.; ENGELS, M. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease **Arch. Virol.**, Austria, v.87, n.3-4, p.205-217, 1986.

MEYER, G.; LEMAIRE, M.; ROS, C.; BELAK, K.; GABRIEL, A.; CASSART, D.; COIGNOUL, F.; BELAK, S.; THIRY, E. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. **Arch. Virol.**, Austria, v.146, n.4, p.633-52, 2001.

MILLER, J.M.; WHETSTONE, C.A.; VAN DER MAATEN, M.J. Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA, **Am. J. Vet. Res.**, United States, v.52, p.458-461, 1991.

MITSUI, Y. & SENDA, T. Elucidation of the basic three-dimensional structure of type I interferons and its functional and evolutionary implications. **J. Interferon Cytokine Res.** United States, v. 17, p. 319-326, 1997.

MOSSMAN, K. L., SAFFRAN, H.A., SMILEY, J.R. Herpes simplex virus ICP0 mutants are hypersensitive to interferon. **J. Virol.**, United States, v. 74, p 2052-2056, 2000.

MULLER, U.; STEINHOFF, U.; REIS, S.; HEMMI, S.; PAVLOVIC, J.; ZINKERNAGEL, R.M.; AGUET, M. 1994. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. **Science**, v. 264, p. 1918-1921, 1994.

MUYLKENS, B.; THIRY, J.; KIRTEN, F.S.; THIRY, E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Vet. Res.**, France, v.38, p.181-209, 2007.

NAGAI,T.; DEVERGNE,O.; MUELLER, T.F.; PERKINS,D.L.; VAN SEVENTER, J.M.; VAN SEVENTER. G.A. Timing of IFN-beta exposure during human dendritic cell maturation and naive Th cell stimulation has contrasting effects on Th1 subset generation: A role for IFN-beta-mediated regulation of IL-12 family cytokines and IL-18 in naive Th cell differentiation. **J. Immunol.**, United States, v. 10, p. 5233-5243, 2007.

NARITA, M.; INUI, S.; NAMBA, K.; SHIMIZU, Y. Neural changes in calves after intraconjunctival inoculation with infectious bovine rhinotracheitis virus in calves treated with dexamethasone. **Am. J. Vet. Res.**, United States, v.39, p.1399-1403, 1978.

NISHIO, M.; TSURUDOME, M.; ITO, M.; KAWANO,M.; KOMADA,H.; ITO, Y. High resistance of human parainfluenza type 2 virus protein-expressing cells to the antiviral and anti-cell proliferative activities of alpha/beta interferons: cysteine-rich V-specific domain is required for high resistance to the interferons. **J. Virol.**United States, v 75, p.9165–9176, 2001.

PARKER, L.C.; PRINCE, L.R.; SABROE, I. Translational mini-reviews series on toll-like receptors: networks regulated mediate innate and adaptive immunity. **Clinical and Experimental Immunology**, United Kingdom, v.147, p.199-207, 2007.

PASTORET, P.P.; AGUILAR-SETIEN, A.; BURTONBOY, G.; MAGER, J.; JETTEUR, P.; SCHOENAERS, F. Effect of repeated treatment with dexamethasone on the reexcretion pattern of infectious bovine rhinotracheitis virus and humoral immune response. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.4, p.149-159, 1979.

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

PESTKA, S.; KRAUSE, C.D.; WALTER, M.R. Interferons, Interferons like-cytokines and their receptors . **Immunol Rev**, United States, v. 202: p. 8-32, 2004.

PLATANIAS, L.C., 2005. Mechanisms of type-I and type-II-interferon mediated signaling. **Nat. Rev. Immunol.** v. **5**, p 375-386, 2005.

POPPERS, J.; MULVEY, M.; KHOO, D.; MOHR, I. Inhibition of PKR activation by the proline-rich RNA binding domain of the herpes simplex virus type 1 Us11 protein. **J. Virol.**, United States, v.74, p. 11215–11221, 2000.

PROUD, C.G. PKR: A new name and new roles. **Trends in Biochemical Sciences**, Netherlands, v.20, p.241-246, 1995.

RANDALL, R. E. & BERMINGHAM, A.. NP:P and NP:V interactions of the paramyxovirus simian virus 5 examined using a novel protein:protein capture assay. **Virology**, United States, v. 224, p.121–129, 1996.

REBORDOSA, X.; PINOL, J.; PEREZ-PONS, J.A.; LLOBERAS, J.; NAVAL, J.; SERRA-HARTMANN, X.; ESPUNA, E.; QUEROL, E. Glycoprotein E of bovine herpesvirus type 1 is involved in virus transmission by direct cell-to-cell spread. **Virus Res.**, Netherlands, v.45, p.59-68, 1996.

RISSI, D.R.; PIEREZAN, F.; SILVA, M.S.; FLORES, E.F.; BARROS, C.S.L. Neurological disease in cattle in southern Brazil associated with Bovine herpesvirus infection. **J. Vet. Diagn. Invest.**, United States, v.20, p.346-349, 2008.

ROBERTS R.M.; LEAMAN, D.W.; CROSS, J.C. Role of interferons in maternal recognition of pregnancy in ruminants. **Proc Soc Exp Biol Med**, United States, v.200, p.7-18, 1992

ROBERTS, R.M.; EALY, A.D.; ALEXENKO, A.P.; HAN, C.S.; EZASHI, T.. Trophoblast interferons. **Placenta**, United States, v.20, p.259-264, 1999.

ROBEK, M. D.; BOYD, B.S.; CHISARI, F.V. Lambda Interferon Inhibits Hepatitis B and C Virus Replication. **J. Virol.** United States, v. 79, p. 3851-3854, 2005.

RODRIGUEZ, J.J; PARISIEN, J.P.; HORVATH, C.M. Nipah virus V protein evades alpha and gamma interferons by preventing STAT1 and STAT2 activation and nuclear accumulation. **J Virol** United States, v.76, p. 11476–11483, 2002.

RODRIGUEZ, J.J; WANG, L.F; HORVATH, C.M.. Hendra virus V protein inhibits interferon signaling by preventing STAT1 and STAT2 nuclear accumulation. **J Virol** United States, v.77, p.11842–11845, 2003.

ROEHE, P.M.; SILVA, T.C.; NARDI, N.B.; OLIVEIRA, L.G.; ROSA, J.C.A. Diferenciação entre os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e herpesvírus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais. **Pesqui. Vet. Bras.**, Brasil, v.17, p. 41-44, 1997

ROIZMAN, B.; DESROSIERS, R.C.; FLECKENSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON, A.C.; STUDDERT, M.J. The family Herpesviridae: an update. **Arch. Virol.**, Austria, v.123, n.3-4, p.425-448, 1992.

ROUSE, B. T; BABIUK, L.A.. Mechanisms of recovery from Herpesvirus infections -a review. **J Comp Med**, Canada v: 42; p. 414–427, 1978.

SAIRA, K; ZHOU, Y; JONES, C. The infected cell protein 0 encoded by bovine herpesvirus 1 (bICP0) induces degradation of interferon response factor 3 and, consequently, inhibits beta interferon promoter activity. **J Virol.**, United States, v.81, p.3077-3086, 2007

SAIRA, K.; ZHOU, Y.; JONES, C. The infected cell protein 0 encoded by bovine herpesvirus 1 (bICP0) associates with interferon regulatory factor 7 and consequently inhibits beta interferon promoter activity. **J.Virol.**, United States, v.83, p.3977-3981, 2009.

SAMBROOK, J. & RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHWYZER, M. & ACKERMANN, M. Molecular virology of ruminants. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v. 53, n. 1-2, p. 17-29, 1996.

SHAW, M.L.; GARCIA-SASTRE, A.; PALESE, P.; BASLER, C.F.. Nipah virus V and W proteins have a common STAT1-binding domain yet inhibit STAT1 activation from the cytoplasmic and nuclear compartments, respectively. **J Virol.**, United States, v.78, p. 5633–5641, 2004.

SHAW, M.L.; CARDENAS, W.B.; ZAMARIN, D.; PALESE, P.; BASLER, C.F. Nuclear localization of the Nipah virus W protein allows for inhibition of both

virus- and toll-like receptor 3-triggered signaling pathways. **J Virol** United States, v. 79, p.6078–6088, 2005.

SHERWOOD, V., BUGERT, H.G., CHEN, Y.H., SANGHERA, S., KATAFIGIOTIS, S., RANDALL, R.E., CONNERTON, I., MELLITS, K.H., Improved growth of enteric adenovirus type 40 in a modified cell line that can no longer respond to interferon stimulation. **J. Gen Virol**, England, v. 88,p. 71-76, 2007.

SHIMOSATO, T.; TOHNO, M.; KITASAWA, H.; KATOH, S.;WATANABE, K.; KAWAI, Y.; ASO, H.; YAMAGUCHI, T.; SAITO, T. Toll like receptor 9 is expressed on follicle associated epithelia containing M cells in swine Peyer's patches. **Immunology Letters**, United States, v.98, p. 83-89, 2005.

SHINKAI, H.; MUNETA, Y.; SUZUKI, K.; EGUSHI-OGAWA, T.; AWATA, T.; UENISHI, H.. Biased distribution of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in porcine Toll-like receptors 1 (TLR1), TLR2, TLR4, TLR5 and TLR6 genes. **Immunogenetics**, United Kingdom, v 58, p. 324-330, 2006.

SHUAI, K. Regulation of cytokine signaling pathways by PIAS proteins. **Cell Res**.United States, v. 16, p.196-202, 2006.

SLEEMAN, K.; BANKAMP, B.; HUMMEL, K. B.; LO, M.K.;BELLINI, W.J.; ROTA, P.A. The C, V and W proteins of Nipah virus inhibit minigenome replication. **J Gen Virol** ,England, v. 89, p. 1300–1308, 2008.

SMITH, G.A.; GROSS, S.P.; ENQUIST, L.W. Herpesviruses use bidirectional fast-axonal transport to spread in sensory neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, United States, v.98, p.3466-3470, 2001.

STARK, G. R.; KERR, I.M.; WILLIAMS, B.R.; SILVERMAN,R.H., SCHREIBER. R.D. How cells respond to interferons. **Annu Rev Biochem**, United States, v. 67, p.227-264, 1998.

STEINER, F., ZUMSTEG, A., VOGT, B., ACKERMANN, M., SCHWYZER, M., Bovine herpesvirus 5 BICP0 complements the bovine herpesvirus 1 homolog. **Veterinary Microbiology**, Netherlands, v. 143, p. 37-44, 2010.

STETSON, D.B.; MEDZHITOV, R. Type I interferons in host defense. **Immunity**, United States, v. 25, p.373-381, 2006.



STRUBE, W., KRETZDORN, D., GRUNMACH, J., BERGLE R.D., THEIN, P. The effectiveness of the paramunity inducer Baypamun (PIND-ORF) for the prevention and metaphylaxis of an experimental infection with the infectious bovine rhinotracheitis virus in cattle. **Tierarztl. Prax.**, Germany, v. 17, p 267-272, 1989.

SZABO, G. & DOLGANIUC, A.. HCV immunopathogenesis: virus-induced strategies against host immunity. **Clin.Liver Dis.**,United States, v. 10, p. 753-771, 2006.

TAKAOKA, A. & YANAI, H. Interferon signalling network in innate defense. **Cell Microbiol.**,England, v. 8, p 907-922, 2006.

TANABE,Y.; NISHIBORI, T; SU, L.; ARDUINI,R.M.; BAKER, D.P.; DAVID, M.. Cutting edge: role of STAT1, STAT3, and STAT5 in IFN-alpha beta responses in T lymphocytes. **J. Immunol** , United States, v.174, p 609-613, 2005.

THIRY, E.; SALIKI, J.; BUBLOT, M.; PASTORET, P.P. Reactivation of infectious bovine rhinotracheitis virus by transport. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, England, v.10, n.1, p.59-63, 1987.

WANSLEY, E. K. & PARKS, G. D. Naturally occurring substitutions in the P/V gene convert the noncytopathic paramyxovirus simian virus 5 into a virus that induces alpha/beta interferon synthesis and cell death. **J. Virol** v.76, p.10109–10121, 2002.

WINKLER, M. T.; DOSTER, A.; JONES, C. Bovine herpesvirus 1 can infect CD4(+) T lymphocytes and induce programmed cell death during acute infection of cattle. **J. Virol.**, United States, v.73, n.10, p.8657-8668, 1999.

WIRTH, U.V.; GUNKEL, K.; ENGELS, M.; SCHWYZER, M. Spatial and temporal distribution of bovine herpesvirus 1 transcripts. **J. Virol.**, United States, v.63, p.4882-4889, 1989

WYLER, R.; ENGELS, M.; SCHWYZR, M. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV-1). In: WITTMANN, G. Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs. Boston: **Kluwer Academic Publishers**, p.1-72, 1989.

YOUNG, D.F.; ANDREJEVA, L.; LIVINGSTONE, A.; GOODBOURN, S.; LAMB, R.A., COLLINS, P.L.; ELLIOTT, R.M.; RANDALL, R.E., Virus replication in engineered human cells that do not respond to interferons. **J. Virol**, United States, v. 77, p.2174-2181, 2003.

ZHANG, Y; ZHOU, J.; JONES, C. Identification of functional domains within the bICP0 protein encoded by bovine herpesvirus 1. **J Gen.Virol**, England, v.86, p.879-886, 2005.

## 8 – ANEXO

### ANEXO A- Plasmídeo pEF.IRES.neo.SV5 P/V

