

Artigo de Revisão

Neuropatogênese experimental da infecção pelo herpesvírus bovino tipo 5 em coelhos¹

Eduardo Furtado Flores^{2*}, Rudi Weiblen², Fernanda Silveira Flores Vogel², Renata Dezengrini², Sabrina Ribeiro de Almeida³, Fernando Rosado Spilki⁴ e Paulo Michel Roehe^{5,6}

ABSTRACT.- Flores E.F., Weiblen R, Vogel F.S.F., Dezengrini R., Almeida S.R., Spilki F.R. & Roehe P.M. 2009. [**Experimental neuropathogenesis of bovine herpesvirus 5 infection in rabbits.**] Neuropatogênese experimental da infecção pelo herpesvírus bovino tipo 5 em coelhos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 29(1):1-16. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva. Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS. Brazil. E-mail: eduardofurtadoflores@gmail.com

Several aspects of the biology of bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) have been studied in rabbits, which develop acute infection and neurological disease upon experimental inoculation. The acute infection is followed by the establishment of latent infection, which can be naturally or artificially reactivated. The first experiments in rabbits established a protocol for virus inoculation and monitoring the infection, and characterized the main virological, clinical and pathological aspects of the acute infection. The pathogenesis of acute infection, from the initial viral replication at site of inoculation, pathways and kinetics of viral transport to the brain, distribution and virus replication in the central nervous system (CNS), cellular and tissue tropism, clinical signs and CNS pathology have been extensively studied using this animal model. Subsequently, several biological and molecular aspects of latent BoHV-5 infection have also been elucidated upon inoculation of rabbits. Rabbits have also been used to investigate the phenotype (neuroinvasiveness, neurogrowth) of field isolates and recombinant vaccine candidates, protection by passive immunity, vaccine protection, the efficacy of anti-viral drugs and support therapies for neurological disease. This animal model was also used to investigate the origin and distribution of electric impulses involved in seizures - a hallmark of BoHV-5 induced neurological infection - and also to test the efficacy of anti-convulsivants. In spite of the possible differences between rabbits and cattle - the natural host of the virus - the observations taken from this experimental model have greatly contributed to the knowledge of the biology of BoHV-5 infection. The present article presents a review of the main published and unpublished results and observations by our group, comprising more than a decade of studies on the pathogenesis of BoHV-5 infection in the rabbit model.

INDEX TERMS: Bovine herpesvirus 5, BoHV-5, rabbits, experimental model.

¹ Recebido em 2 de junho de 2008.

Aceito para publicação em 6 de agosto de 2008.

² Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS 97105-900, Brasil. *Autor para correspondência: eduardofurtadoflores@gmail.com

³ Laboratório de Virologia e Terapia Experimental, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fiocruz, Recife, PE 50670-420, Brasil.

⁴ Instituto de Ciências da Saúde, Centro Universitário Feevale, Av.

Dr. Maurício Cardoso 510, Bairro Hamburgo Velho, Novo Hamburgo, RS 93510-250, Brasil.

⁵ Laboratório de Virologia, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Fepagro Saúde Animal, Eldorado do Sul, RS 92990-000, Brasil.

⁶ Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, RS 90050-170, Brasil.

RESUMO.- Vários aspectos da biologia do herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) têm sido estudados em coelhos, que desenvolvem infecção aguda e doença neurológica após inoculação experimental. A infecção aguda é seguida pelo estabelecimento de infecção latente, que pode ser reativada natural ou artificialmente. Os primeiros experimentos nesta espécie estabeleceram um protocolo de inoculação e monitoramento da infecção, e caracterizaram os principais aspectos virológicos, clínicos e patológicos da infecção aguda. A patogenia da infecção aguda, desde a replicação viral nos sítios de inoculação, vias e cinética de transporte viral até o encéfalo, distribuição e replicação viral no sistema nervoso central (SNC), tropismo celular e tecidual, manifestações clínicas e patologia no SNC foram detalhadamente estudados nestes animais. Posteriormente, vários aspectos biológicos e moleculares da infecção latente também foram elucidados a partir de inoculações de coelhos. Os coelhos também têm sido utilizados para estudar o fenótipo (neuroinvasividade, neurovirulência) de isolados de campo e de cepas vacinais recombinantes, proteção por imunidade passiva, proteção vacinal, eficácia de drogas anti-virais e terapêuticas de suporte da infecção neurológica. Este modelo experimental também foi utilizado para o estudo da origem e distribuição dos estímulos elétricos produzidos durante as convulsões – uma característica da infecção neurológica pelo BoHV-5 –, e para testes de medicamentos anti-convulsivantes. Ressalvadas as diferenças que certamente existem entre bovinos - os hospedeiros naturais - e coelhos, as observações oriundas deste modelo experimental tem contribuído sobremaneira para o conhecimento da biologia do BoHV-5. O presente trabalho apresenta uma coletânea de resultados e observações, publicadas ou não pelo grupo, ao longo de mais de uma década, envolvendo inoculações de coelhos para estudar diversos aspectos da infecção pelo BoHV-5.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Herpesvírus bovino tipo 5, BoHV-5, coelhos, modelo experimental.

INTRODUÇÃO

O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) é um alfa herpesvírus associado à infecções neurológicas acompanhadas de meningoencefalite, de curso geralmente fatal, que acometem principalmente bovinos jovens (Studdert 1990). O BoHV-5 é geneticamente e antigenicamente relacionado a outro importante herpesvírus de bovinos, o BoHV-1, agente da rinotraqueíte infecciosa (IBR) e balanopostite/vulvovaginite pustular bovina (IPB/IPV) (Kahrs 2001). Casos esporádicos ou pequenos surtos da infecção pelo BoHV-5 já foram relatados em vários países, mas a doença é particularmente freqüente na Argentina e no Brasil, onde dezenas de surtos são relatados a cada ano (Carrilo et al. 1983, Riet-Corrêa et al. 1989, Weiblen et al. 1989, Rissi et al. 2006, 2007). Nestes países, a doença neurológica pelo BoHV-5 possui importante repercussão sanitária e econômica, muitas vezes confundindo-se com

a raiva, a causa mais comum de encefalite em bovinos nas Américas. Assim como outros herpesvírus, o BoHV-5 é capaz de estabelecer e reativar infecção latente em seus hospedeiros (Vogel et al. 2003), o que é crucial para a perpetuação destes agentes na natureza (Rock 1994).

A patogenia da infecção aguda e latente pelo BoHV-5 tem sido estudada nos hospedeiros naturais (Belknap et al. 1994, Perez et al. 2002, Vogel et al. 2003), em ovinos (Bélak et al. 1999, Silva et al. 1999a) e, mais recentemente, em caprinos (Diel et al. 2007). Em particular, os coelhos têm sido amplamente utilizados para estudar vários aspectos da neuropatogenia da infecção pelo BoHV-5, pois desenvolvem infecção e doença neurológica com certas similaridades àquela observada em bovinos (Meyer et al. 1996, Chowdhury et al. 1997, Silva et al. 1999b).

O grupo de pesquisadores do Setor de Virologia da UFSM (SV/UFSM) e do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF/Fepagro), em eventual colaboração com os grupos do Dr. Shafiq Chowdhury (Kansas State University) e Dr. Fernando Osório (University of Nebraska at Lincoln, NE) possui um histórico de mais de uma década utilizando coelhos como modelo experimental para o BoHV-5. Os primeiros estudos nesta espécie foram realizados para caracterizar os aspectos virológicos, clínicos e patológicos da infecção neurológica aguda, e avaliar a adequação desta espécie como modelo experimental para esse vírus (Silva et al. 1999b). A partir desses estudos, vários aspectos relacionados com a patogenia, imunidade e terapia antiviral foram abordados (Beltrão et al. 2000, Spilki et al. 2000, 2002, Diel et al. 2005, Dezengrini et al. 2008a). Alguns estudos também foram realizados para investigar e caracterizar a infecção latente nessa espécie (Caron et al. 2002, Mayer et al. 2006).

O objetivo do presente trabalho é apresentar uma revisão crítica e discutida dos experimentos em coelhos, com ênfase aos trabalhos realizados no SV/UFSM e IPVDF/Fepagro. Além dos trabalhos já publicados, as seções a seguir apresentam uma quantidade considerável de resultados e observações não publicadas, frutos de mais de três dezenas de inoculações experimentais com finalidades diversas. Cabe ressaltar que todos os experimentos foram realizados sob supervisão veterinária e de acordo com os Princípios Éticos para Experimentação Animal propostos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a Lei Federal nº 6.638 de 8 de maio de 1979, após aprovação pelos comitês de ética em pesquisa das respectivas Instituições.

Coelhos como modelo experimental para o BoHV-5

Os coelhos são susceptíveis à infecção experimental pelo BoHV-5. Animais dessa espécie já haviam sido utilizados para estudos sobre as infecções latentes pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) (Rock & Reed 1982, Rock et al. 1982, 1992). No entanto, devido às peculiaridades anatômicas da mesma, os estudos clássicos utilizaram a via conjuntival (IC) para a inoculação viral. Os coelhos possuem a abertura anterior da cavidade nasal

muito estreita, além de apresentarem uma sensibilidade muito grande nas narinas. Sem prévia anestesia ou sedação, os animais reagem ao contato com essa região, e freqüentemente espirram após a inoculação. Essas características dificultam a inoculação de material através da abertura anterior das narinas e também a coleta de suabes nasais para monitoramento da replicação viral. Por isso, os estudos iniciais com o BoHV-1 utilizaram a via IC. No entanto, além de não ser a via natural de infecção, essa via permite apenas a inoculação de volumes pequenos. Um marco importante nos estudos de patogenia de vírus respiratórios em coelhos foi o estabelecimento da inoculação intranasal (IN) através das aberturas dos seios paranasais, descrita por Brown & Field (1990) para o BoHV-1 e posteriormente adaptada e simplificada por Silva et al. (1999b) para o BoHV-5.

Estudos pioneiros

Três estudos realizados em um curto espaço de tempo foram pioneiros no estudo da patogenia da infecção pelo BoHV-5 em coelhos. Meyer et al. (1996) reproduziram a infecção aguda e a doença neurológica fatal em coelhos da raça Nova Zelândia, de um mês de idade, pela inoculação de duas cepas do BoHV-5 (N569 e A663). Das três vias testadas (IC, IN [nos seios paranasais] e intracerebral), a via IN foi a mais eficiente, e 75% dos coelhos inoculados por esta via desenvolveram doença neurológica. A inoculação viral pela via IC resultou apenas em conjuntivite e rinite; a inoculação intracerebral resultou em doença e morte em 75% (3/4) dos animais. Esses resultados demonstraram que coelhos são susceptíveis à infecção e doença neurológica pelo BoHV-5, podendo assim ser utilizados como modelos experimentais.

Chowdhury et al. (1997) descreveram os aspectos virológicos e patológicos da infecção neurológica pelo BoHV-5, inoculando a cepa TX89 em coelhos recém-desmamados (30 dias, 500-600g). A inoculação foi realizada nos seios paranasais, pelo protocolo original descrito por Brown & Field (1990), após anestesia com xilazina (Rompun, 5mg.kg⁻¹) e ketamina (Ketaset, 10mg.kg⁻¹). Dentre as três inoculações realizadas, apenas aquelas acompanhadas de administração de dexametasona (Dx, 0.3mg por dia, nos dias - 2, -1, 0 e + 1 pós-inoculação, pi) resultaram em morbidade e mortalidade de aproximadamente 70% dos animais. Concluiu-se que a Dx - por mecanismos não esclarecidos - aumentou o potencial neuropatogênico do BoHV-5. Assim, esse protocolo passou a ser rotineiramente utilizado pelo laboratório do Dr. Chowdhury. Os animais inoculados (70%) apresentaram um quadro neurológico típico, a partir do dia 5 pi, com hiperestesia, bruxismo, opistótono e convulsões, seguido de morte. A distribuição do vírus (e de antígenos virais) no encéfalo sugeriu que a invasão viral ocorreu principalmente pela via olfatória. Em contraste, os coelhos inoculados com o BoHV-1 (cepa Cooper) não apresentaram sinais neurológicos, e o vírus não foi detectado no cérebro destes animais.

Silva et al. (1999b) realizaram uma descrição detalhada da patogenia da infecção pelo BoHV-5 em coelhos recém-desmamados, testando três isolados (EVI-88, A663 e 613). Dentre as três cepas testadas, apenas o EVI-88 e 613 produziram doença neurológica, em níveis comparáveis, após inoculação IN. O tratamento com Dx, anteriormente preconizado por Chowdhury et al. (1997), para a produção da infecção neurológica, não resultou em aumento nos níveis de morbidade e mortalidade. Assim, esse protocolo não foi mais utilizado nos experimentos do grupo. Uma importante observação foi a de que vários animais que desenvolvem doença neurológica precoce e de curta duração não apresentam alterações histológicas marcantes no encéfalo. Além disso, outra contribuição importante deste estudo foi a adaptação e simplificação do protocolo de inoculação viral. A constatação de que o vírus podia ser inoculado diretamente nos seios paranasais, sem a necessidade de anestesia geral e cirurgia, com conseqüências virológicas, clínicas e patológicas semelhantes às descritas por Meyer et al. (1996) e Chowdhury et al. (1997), deram início a uma série de experimentos que contribuíram significativamente para o conhecimento da patogenia da infecção neurológica pelo BoHV-5.

Animais utilizados

Coelhos de todas as idades são susceptíveis à infecção e enfermidade neurológica pelo BoHV-5. Entretanto, foi demonstrado que os índices de morbidade e mortalidade decrescem gradativamente com a idade, dependendo da dose infectante e da amostra viral utilizada (Quadro 1). A maioria dos estudos realizados com as cepas padrão EVI-88 e SV-507 utilizou animais recém-desmamados, com idade aproximada de 30-35 dias (28-40 dias) e peso entre 300 e 400g. Nestes animais, a inoculação do SV-507 em título de 10^{7,5 a 8,0} TCID₅₀ (dose infectante para 50% dos cultivos celulares) produz tipicamente doença em 70 a 90% dos animais, sendo que a letalidade aproxima-se de 100%. Algumas inoculações produziram 100% de mortalidade. A cepa EVI-88 requer títulos mais altos (10^{8,0-8,5} TCID₅₀) para produzir índices comparáveis de morbidade e mortalidade.

O aumento da idade dos animais inoculados é acompanhado de redução da morbidade e mortalidade (principalmente para a cepa EVI-88), assim como um retardo no início dos sinais neurológicos. Coelhos da raça Nova Zelândia brancos têm sido utilizados na maioria dos experimentos da equipe. Coelhos da raça Chinchila apresentam manifestações neurológicas um pouco diferentes, além de índices inferiores de morbidade quando comparados aos coelhos Nova Zelândia brancos (6/10 versus x 6/7 [Silva et al. 1999b]). Assim, para estudos de patogenia em que se objetiva produzir doença no maior número possível de animais, se recomenda o uso de animais da raça Nova Zelândia recém-desmamados (30-35 dias de idade).

A inoculação de coelhos lactentes (8 dias de idade) também já foi realizada (cepa SV-507, título de 10^{6,5}

Quadro 1. Resumo das inoculações experimentais de coelhos como o herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) realizadas no SV/UFSM e CPVDF/Fepagro^a

Cepa	Título viral (log ₁₀ TCID ₅₀)	Via	Idade	Nº	Morbidade (%)	Mortalidade (%)	Referência
EVI-88	8,22	IN	30-35d	10	7(70)	7(70)	Silva et al. 1999
EVI-88	7,81	IN	30-35d	34	26(76,4)	27(79,4)	Beltrão et al. 2000
EVI-88	7,64	IN	6-8m	20	1(5)	1(5)	Beltrão et al. 2000
EVI-88	7,51	IC	6-8m	10	0(0)	0(0)	Beltrão et al. 2000
EVI-88	6,81	IC	3-4m	10	4(40)	4(40)	Beltrão et al. 2000
EVI-88	7,8	IN	5-6m	19	1(5,2)	1(5,2)	Caron et al. 2002
EVI-88	7,3	IC	5-6m	10	0(0)	1(10)	Caron et al. 2002
EVI-88	7,3	IN	3-4m	5	0(0)	0(0)	Caron et al. 2002
EVI-88	7,3	IN	3-4m	5	0(0)	0(0)	Caron et al. 2002
EVI-88	7,5	IT	30-35d	4	4 (100)	4 (100)	Spilki et al. 2002
EVI-88	7,5	IN	30-35d	8	8 (100)	8 (100)	Spilki et al. 2002
EVI-88	8,3	IN	60d	5	3(60)	3(60)	Silva et al. 2006
EVI-88	7,5	IT	30-35d	4	4 (100)	4 (100)	Spilki et al. 2002
EVI-88	7,5	IN	30-35d	8	8 (100)	8 (100)	Spilki et al. 2002
EVI-88	8,3	IN	60d	5	3(60)	3(60)	Silva et al. 2006
A663	6,11	IN	30-35d	6	0(0)	0(0)	Beltrão et al. 2000
A663	7,3	IN	30-35d	6	0(0)	0(0)	Spilki F. R. não publicado
613	6,81	IN	30-35d	8	6(75)	6(75)	Beltrão et al. 2000
613	6,81	IN	6-8m	11	6(54,5)	6(54,5)	Beltrão et al. 2000
613	6,6	IN	5-6m	12	6(50)	5(41,6)	Caron et al. 2002
613	6,6	IC	5-6m	10	2(20)	2(20)	Caron et al. 2002
613	6,3	IC	3-4m	5	0(0)	0(0)	Caron et al. 2002
SV-507	7	IN	30-35d	18	3 (16,6)	3 (16,6)	Mayer et al. 2006
SV-507	8,3	IN	30-35d	10	10 (100)	9 (90)	Diel et al. 2005
SV-507	8,3	IC	30-35d	12	10 (83,3)	8 (66,6)	Diel et al. 2005
SV-507	7,8	IN	30-35d	65	56(86,1)	54(83)	Almeida, S.R não publicado
SV-507	6,5	IN	8 d	7	7(100)	7(100)	Dezengrini, R. não publicado
SV-507	7,8	IN	23d	10	10(10)	10(10)	Dezengrini, R. não publicado
SV-507	10,3	IN	35d	9	6(66,6)	6(66,6)	Dezengrini, R. não publicado

^a Os experimentos estão listados por isolado/cepa e incluem os experimentos iniciais de caracterização da infecção aguda, além dos demais experimentos realizados com diversas finalidades.

TCID₅₀) e resultou em morbidade e mortalidade de 100% dos animais. O curso clínico iniciou no quarto dia e, em geral, foi mais rápido do que aquele observado em coelhos recém-desmamados. A infecção de animais desta idade pode ser indicada para determinadas finalidades, mas não apresenta vantagens evidentes em relação ao modelo padrão (30-40 dias de idade).

A origem e condição sanitária dos animais experimentais também devem ser observadas. Em um experimento realizado para estudar a reativação da infecção latente, foram utilizados coelhos de procedência diferente daquela empregada rotineiramente. Após a administração de Dx, alguns coelhos controles (não inoculados com o BoHV-5) apresentaram depressão e alguns sinais neurológicos. O exame histológico do encéfalo desses animais relevou a presença do protozoário *Encephalytozon cuniculli*. Por isso é importante assegurar-se da origem e condição sanitária dos animais, sob o risco de interferência nos resultados e nas conclusões obtidas.

Cepa ou isolado viral

A morbidade e a mortalidade produzidas pela inoculação viral apresentam variações, em função da cepa viral, da idade dos animais e da via de inoculação (Quadro 1). Experimentos utilizando as cepas EVI-88 (Dr. Paulo

Roehe, IPVDF/Fepagro, RS) e 613 (gentilmente cedida pela Dra Elba Laura Weber, Inta Castelar, Argentina) demonstraram índices semelhantes de morbidade (aproximadamente 70%) (Silva et al. 1999b). O tratamento com Dx (0,4mg.kg⁻¹.dia⁻¹) nos três dias que precederam e nos dois dias seguintes à inoculação viral não aumentou a morbidade em coelhos inoculados com o EVI-88. Esse tratamento tem sido utilizado por outros grupos, e parece ser necessário para a produção de doença neurológica pela cepa TX89 (Chowdhury et al. 1997). A cepa A663 não produziu doença neurológica em nenhum dos seis coelhos inoculados (Beltrão et al. 2000), observações confirmadas posteriormente (Spilki F.R., dados não publicados). Estas cepas foram posteriormente testadas em animais com mais idade, e uma redução significativa de morbidade foi observada para a cepa EVI-88, e em menor grau para a cepa 613. A inoculação dessas cepas pela via IC em animais de 3-4, 5-6 ou 6-8 meses também foi seguida de redução de morbidade, mais pronunciada para a cepa EVI-88 (Beltrão et al. 2000, Caron et al. 2002).

A cepa SV-507 somente foi utilizada a partir do ano 2000, após uma caracterização inicial e a verificação de sua alta neurovirulência para coelhos. A partir daí, esse vírus tem sido amplamente utilizado em estudos de patogenia em bovinos, coelhos e caprinos (Vogel et al. 2003,

Diel et al. 2005, 2007, Dezengrini et al. 2008). Além disto, é o único isolado de BoHV-5 cujo genoma foi seqüenciado integralmente (Delhon et al. 2003). Em coelhos recém-desmamados, o SV-507 (em títulos de $10^{7,5}$ a $10^{8,0}$ TCID₅₀) produz uma morbidade de aproximadamente 80% (70 - 100%). Títulos de 10^6 TCID₅₀ produzem 60-70% de morbidade ao passo que títulos de $10^{5,6}$ TCID₅₀ produzem doença em 30-50% dos animais. Em coelhos com 3-4 meses de idade, a morbidade se reduz para aproximadamente 50-60%. Coelhos adultos (5-6 meses) apresentam morbidade de aproximadamente 40-50%, mas o curso da doença é geralmente retardado e mais longo. A principal vantagem do SV-507 em relação ao vírus inicialmente utilizado (EVI-88), é a de que, mesmo títulos não muito altos ($10^{7-7,5}$ TCID₅₀) produzem morbidade em níveis semelhantes aos produzidos pelo EVI-88 em títulos superiores a 10^8 TCID₅₀. Curiosamente, alguns experimentos indicam que o EVI-88 parece ser mais neurovirulento do que o SV-507 para bezerros. Outras três amostras de BoHV-5 isoladas de casos de doença neurológica em bovinos também demonstraram o seu potencial neuropatogênico em coelhos (Silva et al. 2007).

As cepas EVI-88 e SV-507 têm sido geralmente utilizadas para a inoculação com um número de passagens inferior a 10, não tendo sido observadas diferenças aparentes de patogenicidade ou virulência entre diferentes passagens. Assim, acredita-se que estas amostras, mantidas em baixo número de passagens, apresentam características bastante representativas daquelas apresentadas pelos isolados originais.

A inoculação viral

Brown & Field (1990) estabeleceram um método alternativo de inoculação viral pela via intranasal (IN). Neste protocolo, a suspensão viral é inoculada diretamente nos seios paranasais, através de aberturas localizadas bilateralmente na parede dorso-lateral das narinas. Volumes de 0,5-1,0mL podem ser inoculados em cada narina e o inóculo tem acesso direto à cavidade nasal. O protocolo original - ainda utilizado por alguns laboratórios - prevê anestesia geral seguida de procedimento cirúrgico, no qual a pele previamente tricotomizada e submetida a antissepsia, é incidida (incisões de aprox. 1cm, de cada lado da linha média) para exposição do perióstio. Após, realiza-se raspagem/curetagem para remover o perióstio e expor as aberturas dos seios paranasais. A suspensão viral é então inoculada e subseqüentemente procede-se a sutura das incisões da pele, pelo método tradicional (sutura simples) ou por *clamping*. Esse procedimento, embora tenha sido pioneiro e viabilizado a realização de vários experimentos, mostra-se demorado, laborioso e invasivo. O procedimento integral leva aproximadamente 15-20min por animal, e torna-se pouco viável para a inoculação de um número grande de animais. O pós-operatório também representa uma restrição, pois exige a administração de antibióticos e anti-inflamatórios, além de antissepsia diária da ferida cirúrgica.



Fig.1. Inoculação intranasal, através das aberturas dos seios paranasais, sem a necessidade de incisão cirúrgica. Animal em sedação profunda (Silva et al. 1999b).

Silva et al. (1999b) descreveram uma adaptação do protocolo original, o que tornou a técnica extremamente simples, rápida e viável para a realização em um grande número de animais. Nessa adaptação, a suspensão viral é depositada percutaneamente nos seios paranasais, através das suas aberturas dorso-laterais, sem a necessidade de incisões e suturas (Fig.1). O ponto-chave é a correta localização das aberturas dos seios, o que pode ser facilmente obtido pelas referências anatômicas e pelo tato. A simplificação do procedimento também preclui a indução de anestesia geral, e apenas uma sedação profunda é realizada. Em geral, para coelhos com peso de 300-400g (idade de 30-40 dias), 100-200µL de Zoletil 50® (Tiletamina/Zolazepan, Virbac, São Paulo, Brasil) induzem sedação e analgesia suficientes (15-30min) para a inoculação, após o qual os animais recuperam-se rapidamente.

Após a localização das aberturas dos seios pelo tato, a suspensão viral (0,5-1,0mL por narina) é inoculada através da pele, com o uso de seringas/agulhas de insulina. Com a cabeça posicionada na posição horizontal, a seringa é posicionada em um ângulo aproximado de 45° em relação ao plano, na direção antero-posterior. Em relação ao plano sagital da cabeça, a seringa (agulha) deve ser introduzida em um ângulo entre 15 e 30 graus, na direção latero-medial (Fig.1). A introdução da agulha apresenta uma leve resistência logo abaixo da pele, ao transpor uma fina camada cartilaginosa que recobre as aberturas. A agulha deve ser introduzida em aproximadamente metade (0,5cm) de sua extensão para o seu orifício anterior atingir o lúmen dos seios, após o qual se inocula a suspensão viral lentamente. Após o procedimento, a extremidade anterior da cabeça deve ser mantida elevada por alguns segundos, para facilitar a penetração e distribuição do inóculo nas cavidades nasais e evitar o refluxo. Considerando-se apenas a inoculação (estando os animais já anestesiados/sedados), o procedimento pode ser facilmente realizado em menos de 1 min por animal. O

pós-operatório não exige nenhum cuidado adicional, dispensando o uso de fármacos e/ou antissepsia local. Um protocolo alternativo de inoculação IN foi também descrito, e aparentemente é eficiente na reprodução da infecção e doença neurológica (Valera et al. 2008).

A via IC também tem sido utilizada em alguns experimentos para estudar a patogenia da infecção pelo BoHV-5. Além dos estudos iniciais, essa via foi utilizada especificamente para investigar as vias de acesso do vírus ao sistema nervoso central (SNC), e a cinética e importância da via trigeminal no acesso do vírus ao encéfalo durante a infecção aguda (Diel et al. 2005). A via IC também foi utilizada em um experimento para comparar a frequência e eficiência de reativação espontânea de BoHV-1 e BoHV-5 (Mayer S.V., dados não publicados). Em geral, a inoculação pela via IC resulta em índices levemente inferiores de morbidade, cujo grau de redução varia com a cepa utilizada e com a idade dos animais (Quadro 1). Outra característica da doença neurológica após a inoculação IC é o curso mais tardio, em comparação com a inoculação IN (Diel et al. 2005).

A limitação do volume da suspensão viral a ser inoculada, imposta pela pequena capacidade do saco conjuntival, pode ser superada pela inoculação seqüencial de pequenos volumes (0,1 mL) a determinados intervalos de tempo (30-60 minutos). Assim, pode-se inocular uma dose elevada de vírus, mesmo que o título viral na suspensão não seja tão alto. A inoculação IC não exige anestesia e/ou sedação e os animais geralmente toleram bem este procedimento, assim como a coleta diária de *swabs* para o monitoramento da replicação viral. Alguns animais desenvolvem sinais leves de conjuntivite de curta duração (3-5 dias) e de regressão espontânea. Estudos anteriores com o BoHV-1 relatam a produção de opacidade e pequenas ulcerações na córnea (Rock et al. 1992), o que não tem sido observado após inoculação do BoHV-5.

A inoculação intracerebral, pela via intratecal (IT), também já foi realizada, para avaliação da capacidade do vírus replicar no encéfalo, independentemente de sua neuroinvasividade. Para isto, os coelhos devem ser anestesiados e colocados em decúbito lateral. Deve-se proceder a tricotomia e assepsia da região da nuca. Para a inoculação, deve-se localizar o espaço subaracnóide. Para facilitar o acesso a este espaço, o queixo do animal deve ser aproximado do peito em posição de emprostotono. Localizado o espaço subaracnóide, procede-se a inoculação do vírus com auxílio de uma agulha calibre 22G. A suspensão viral deve ser aquecida a 37°C e administrada lentamente (Laskin & Griffin 1987, Spilki et al. 2002). Cuidados especiais devem ser tomados quanto à profundidade da inserção da agulha, sendo o local adequado facilmente determinado pela sensação do rompimento da dura-máter e o extravasamento de líquido através da agulha, que deve ser inserida inicialmente desacoplada da seringa. Recomenda-se que um volume de inóculo inferior a 0,5 mL seja administrado pela via IT, mas a inoculação de volumes de até 0,8 mL de solução estéril em coe-

lhos pesando 400g não provocou alterações neurológicas nestes animais (Spilki F.R. dados não publicados).

A INFECÇÃO AGUDA

Replicação e excreção viral

Após a inoculação IN ou IC, o vírus replica nos locais de inoculação durante alguns dias. O monitoramento da replicação pode ser realizado pela pesquisa de vírus em secreções coletadas com *swabs*. A coleta de *swabs* da cavidade nasal para o monitoramento da replicação viral, no entanto, apresenta dificuldades. Uma coleta minuciosa exige sedação dos animais e o uso de suabes confeccionados especialmente com esta finalidade. Esses *swabs* devem ser confeccionados em algodão estéril, sem antissépticos, cuidadosamente recobrimdo uma haste fina (1mm de diâmetro) e flexível (plástico), que possua uma ponta romba para evitar lesões na mucosa nasal durante a coleta. O uso de sedação diária durante um longo período pode se tornar difícil e de custo alto. Na maioria dos experimentos, o monitoramento da replicação viral durante a infecção aguda e/ou reativação da latência tem sido realizado pela coleta diária de animais alternados ou pela coleta de todos os animais a intervalos de 2 ou 3 dias. Em algumas oportunidades, uma leve sedação com Zoletil 50® foi utilizada, mas na maioria dos experimentos a coleta foi feita sem sedação. A quantificação de vírus em secreções nasais deve ser considerada de valor relativo, pois a amostra coletada pode não representar com exatidão a quantidade de vírus presente na cavidade nasal no momento da coleta. Durante a infecção aguda, a excreção viral em secreções nasais raramente ultrapassa os dias 10-12 pi; os títulos raramente excedem $10^{4,5-5,0} \text{TCID}_{50}$. Os maiores títulos são geralmente detectados entre os dias 3 e 4 pi. Após inoculação IC, a excreção viral durante a infecção aguda cessa um pouco mais precocemente, por volta dos 7-9pi. Após a reativação induzida por Dexametasona (Dx), geralmente precede-se a coleta de *swabs* até o dia 12 pDx, pois a excreção viral geralmente inicia 2 a 4 dias após o início do tratamento.

Manifestações clínicas

Coelhos inoculados com o BoHV-5 pelas vias IN ou IC não apresentam quaisquer alterações perceptíveis ao monitoramento de rotina nos 4 dias que se sucedem a inoculação. Ao exame minucioso, no entanto, alguns animais podem apresentar secreção nasal serosa, e eventualmente espirrar. Esses sinais, no entanto, requerem muita atenção do examinador, pois podem passar facilmente despercebidos a um monitoramento pouco detalhado. A ocorrência de sinais neurológicos nessa fase é rara, mas já foi observada em um animal no dia 3pi (Chowdhury S., comunicação pessoal). Neste caso, é possível que o vírus tenha atingido o cérebro pela via sangüínea, pois o trânsito pelas vias nervosas é mais demorado (Chowdhury et al. 1997, Diel et al. 2005).

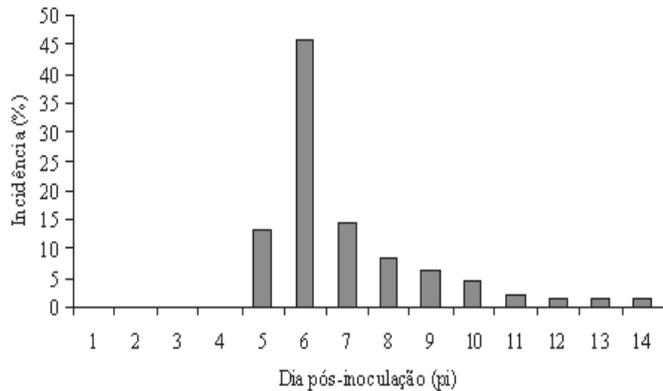


Fig.2. Incidência da doença neurológica após inoculação intranasal do herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5), cepas EVI-88 e SV-507, em coelhos recém-desmamados. As barras representam o número de animais que apresentam os sinais neurológicos iniciais nos respectivos dias.

Em coelhos inoculados com o EVI-88 ou SV-507 pela via IN, os sinais neurológicos – assim como outros sinais inespecíficos – começam a ser apresentados no dia 5pi em uma parcela pequena dos animais (10-15%), aumentando de freqüência no dia 6 (50%), reduzindo-se gradativamente nos dias seguintes (Fig.2). Alguns animais começam a manifestar sinais neurológicos tardiamente (dias 12-14pi), mas a freqüência é baixa (<10%). Estima-

se que aproximadamente 80-90% dos animais que desenvolvem doença neurológica manifestem os primeiros sinais clínicos até o dia 12pi.

Os sinais mais observados após inoculação IN ou IC do BoHV-5 incluem apreensão, bruxismo, depressão ou excitação/agitação, hiperestesia, opistótono, convulsões do tipo Jacksonianas (Fig.3), cegueira, paralisia dos posteriores, andar em círculos, ataxia, movimentos de pedalagem, prostração, depressão profunda e morte. Esses sinais nem sempre são apresentados conjuntamente, e diferentes combinações podem ser observadas. As manifestações tipicamente neurológicas (bruxismo, opistótono, convulsões) ocorrem sob a forma de crises, com duração e espaçamento variáveis. No início da doença, as crises são pouco freqüentes, de intensidade leve, podendo inclusive passar despercebidas a um exame rápido. Nesses casos, um indicador importante são os pêlos das patas e cabeça molhados, pois os animais ficam agitados, correm pela gaiola e acabam se molhando nos bebedouros. Por isso, no início da doença, recomenda-se um monitoramento mais demorado (10-15 min) três ou quatro vezes ao dia. Com o decorrer do tempo, as crises tornam-se gradativamente mais severas, duradouras e freqüentes.

Na experiência do grupo, constatou-se que os animais que desenvolvem o quadro neurológico típico, com opis-

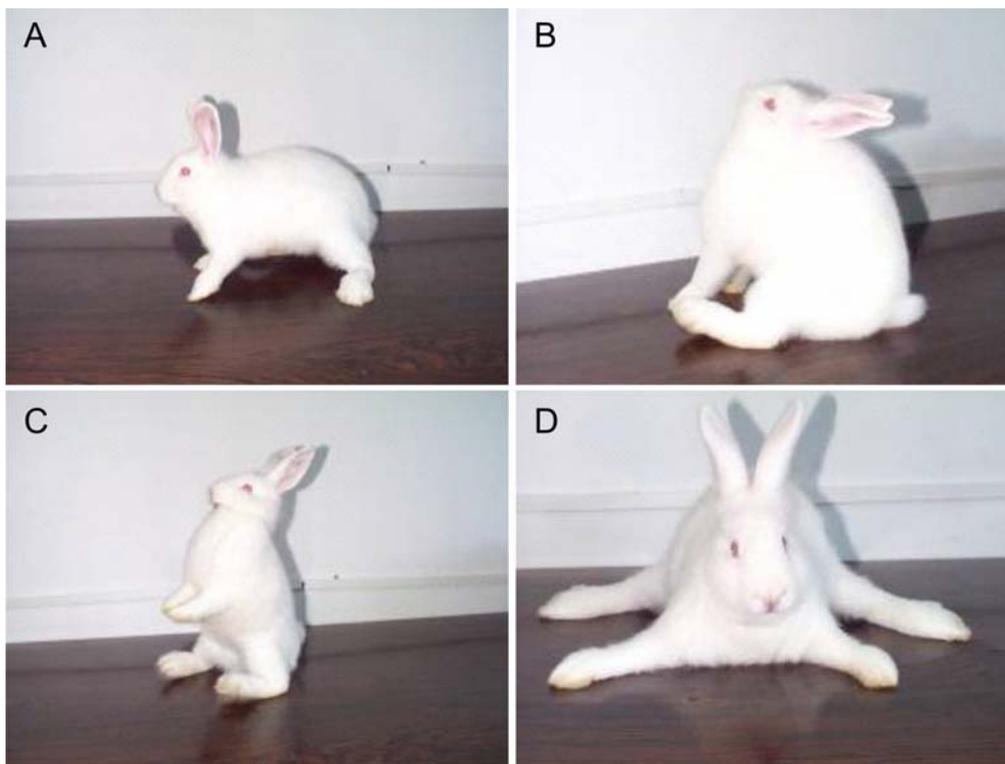


Fig.3. Seqüência de eventos de uma convulsão do tipo Jacksoniana em um coelho (dois meses de idade) infectado com o herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5; EVI-88), no dia 11 pi. (A) Arqueamento da coluna, tremores na face; (B) Opistótono, tremores se estendem aos membros anteriores; (C) Elevação do tronco, tremores e queda para um dos lados. (D) Prostração que tipicamente sucede tais eventos convulsivos.

tótono e convulsões, raramente sobrevivem. Alguns animais (<5%) desenvolvem apenas um quadro leve, com bruxismo e excitação, e podem se recuperar após alguns dias. Não são raros os casos de animais que não apresentam quadro neurológico típico, apenas depressão profunda, e acabam morrendo após um período de prostração. Esses casos parecem ser mais freqüentes em animais inoculados com mais de 45-50 dias de idade (Spilki F.R., não publicado). Não se pode descartar a possibilidade de estes animais terem apresentado episódios neurológicos (convulsões, opistótono) durante a noite, por exemplo, que tenham fugido à observação dos examinadores. Animais que sucumbem sem doença prévia também têm sido ocasionalmente observados, sobretudo em fases tardias (15-20 dias pi). Quadros de cegueira têm sido relatados, mas podem facilmente passar despercebidos. Em alguns animais - sobretudo da raça Chinchila - as orelhas dobradas são sinais do início da doença neurológica. Ptilismo também é observado com certa freqüência. Alguns animais apresentam grande excitação e correm em círculos pela gaiola.

A duração da doença é muitas vezes de difícil determinação, pois os protocolos de bem-estar animal recomendam a eutanásia assim que os animais apresentem sinais manifestos de doença. Além disso, o início da doença nem sempre é observado, principalmente nos animais em que os sinais iniciam-se durante a noite ou que apresentam raras manifestações ao longo do dia. Assim, a duração do quadro clínico é variável, e a sua descrição correta depende muito da freqüência e detalhamento do monitoramento clínico. Em geral, o tempo decorrido entre o início dos sinais clínicos e a morte (ou eutanásia *in extremis*) varia entre menos de 12h e 3-4 dias, com uma maior freqüência provavelmente entre 24 e 48h. Não são raros os casos de morte sem manifestação prévia de doença, assim como casos de doença de longa duração (5 – 6 dias). Alguns animais podem desenvolver doença neurológica tardia, aos 28, 30, 40 dias pi, porém não é possível diferenciar uma doença aguda tardia de reativação da infecção latente.

Vírus e antígenos virais

Títulos virais baixos a moderados (geralmente inferiores a $10^{5,0}$ TCID₅₀/g de tecido) podem ser detectados em várias áreas do encéfalo dos animais que desenvolvem doença neurológica. Em geral, os títulos mais altos são detectados nos córtices anterior, dorso-lateral e ventrolateral (entre $10^{3,5}$ e $10^{5,0}$ TCID₅₀/g), seguidos do córtex posterior, tálamo, cerebelo (títulos geralmente entre $10^{2,0}$ e $10^{3,5}$ TCID₅₀/g). O bulbo olfatório, ponte, bulbo e medula cervical ocasionalmente são positivos para vírus, e geralmente contêm baixos títulos (Silva et al. 1999b, Dezengrini et al. 2008a, Flores E.F. dados não publicados).

Antígenos e ácidos nucléicos virais podem ser detectados por imunistoquímica (IHQ) e hibridização *in situ* (ISH), respectivamente, principalmente em células com morfologia de neurônios, mas também de astrócitos, em

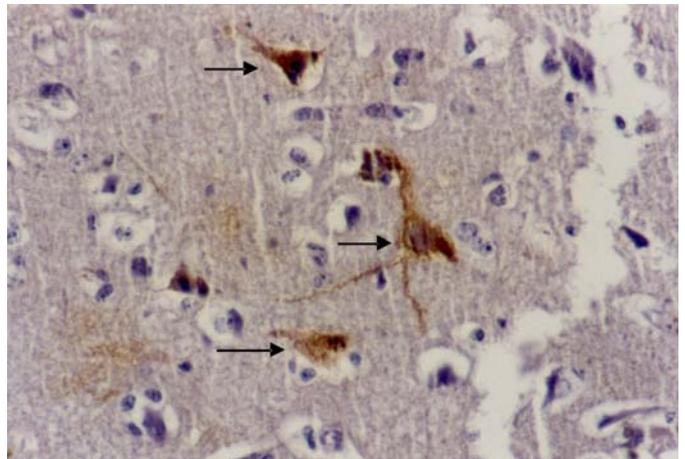


Fig.4. Antígenos virais em neurônios (setas) do córtex anterior de um coelho que desenvolveu doença neurológica aguda após inoculação IN do herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5). Os antígenos foram detectados pela técnica de imunoperoxidase, utilizando um anticorpo monoclonal anti-BoHV-5 (Oldoni et al. 2003).

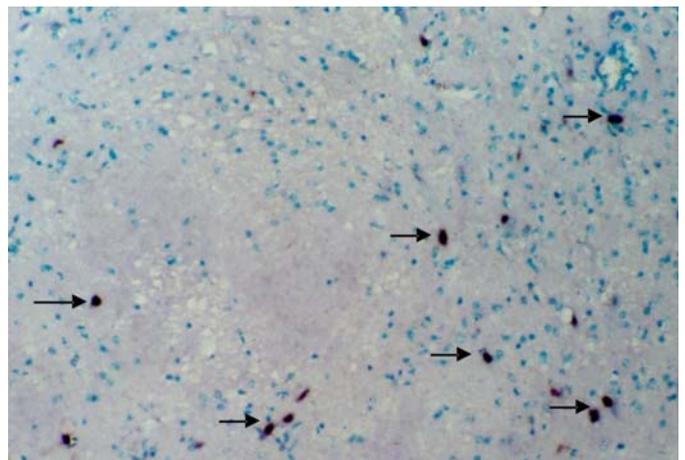


Fig.5. Ácidos nucléicos virais, detectados por hibridização *in situ*, em neurônios do córtex cerebral (setas) de um coelho que desenvolveu doença neurológica após inoculação IN do herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5).

várias áreas do encéfalo, sobretudo no córtex cerebral (Fig.4 e 5). As células positivas para antígenos virais (ou ácidos nucléicos) não estão distribuídas uniformemente nos cortes, mas em grupos geralmente com 5-20 células. Esses grupos de neurônios positivos geralmente ocupam a mesma localização no corte tecidual, em animais diferentes, provavelmente representando grupos de neurônios anatomicamente e funcionalmente relacionados (Caron et al. 2002, Flores E.F. dados não publicados).

Achados macro e microscópicos

Alterações macroscópicas são observadas apenas ocasionalmente no encéfalo, e incluem congestão das meninges e espessamento dos vasos sangüíneos. Histologicamente, observa-se meningoencefalite não supura-

tiva, de intensidade variável e geralmente correlacionada com a duração e severidade do curso clínico (Chowdhury et al. 1997, Silva et al. 1999b). Os achados mais freqüentes são gliose focal ou difusa e infiltrado perivascular mononuclear (Silva et al. 1999b, Caron et al. 2002, Spilki et al. 2002). Pequenas hemorragias focais ou multifocais e congestão das meninges também são achados freqüentes (Caron et al. 2002). A degeneração e necrose neuronal, que são achados comuns na doença neurológica pelo BoHV-5 em bovinos, são menos freqüentes em coelhos, e são observadas principalmente nos animais que apresentam curso clínico longo. Em grande parte dos animais que desenvolvem doença precoce (dias 5-6pi) e de curta duração (12h), as alterações histológicas no encéfalo são leves ou mesmo inexistentes. Esses achados contrastam com a maioria dos casos de doença neurológica em bovinos, em que alterações histológicas marcantes, com degeneração e necrose neuronal, além de inclusões intranucleares, são comumente observadas. No entanto, casos de doença neurológica pelo BoHV-5 em bovinos, sem alterações histológicas no encéfalo, também parecem ocorrer com certa freqüência (Rissi et al. 2006, Silva et al. 2007). Um achado incidental em coelhos, e de observação rara em bovinos, é a presença de pneumonia intersticial aguda, caracterizada macroscopicamente por lesões hemorrágicas difusas ou petequiais, geralmente observável em todos os lobos pulmonares, em alguns animais inoculados pela via IN, com a presença de vírus nas lesões (Spilki F.R. dados não publicados).

Vias de invasão viral do sistema nervoso central

As vias de transporte dos alfa herpesvírus humanos e animais ao SNC após a replicação inicial nos sítios de penetração estão entre os aspectos mais estudados da neuropatogenia desses agentes. Chowdhury et al. (1997) demonstraram a importância da via olfatória em relação a trigeminal no transporte do BoHV-5 até o cérebro, após inoculação IN. Lee et al. (1999) investigaram a disseminação do BoHV-5 no cérebro de coelhos inoculados pela via IN, monitorando a presença de vírus e antígenos virais em diferentes seções do SNC a intervalos após a inoculação. Os resultados indicaram que a invasão e disseminação do BoHV-5 a partir da cavidade nasal ocorre predominantemente pela via olfatória e, secundariamente, pela via trigeminal.

Beltrão et al. (2000) estudaram a cinética da distribuição da infecção pelo BoHV-5 em coelhos inoculados com a cepa EVI-88 pela via IN. Para isto, seções do encéfalo de coelhos eutanasiados a diferentes intervalos após inoculação foram submetidas à pesquisa de vírus. O vírus foi inicialmente detectado nos bulbos olfatórios (BOs) às 48h, seguido do córtex olfatório (48/72h) e mais tardiamente nos gânglios trigêmeos (TGs) às 72/96h. Esses resultados também indicaram que a invasão e disseminação do vírus no SNC em fases iniciais da infecção ocorrem principalmente pela via olfatória. Para avaliação da importância da via olfatória no transporte do vírus até o encéfalo, dois outros experimentos foram conduzidos. No primeiro, coelhos foram inoculados com o BoHV-5 no saco conjuntival (via IC). Estes animais também desenvolveram doença nervosa, porém com menor freqüência e mais tardiamente do que aqueles inoculados pela via IN. No segundo experimento, um grupo de coelhos foi submetido à ablação cirúrgica dos BOs (Fonseca et al. 2006) e posteriormente inoculado com o BoHV-5 pela via IN ou IC (Diel et al. 2005). Os resultados de morbidade, curso clínico e mortalidade estão apresentados no Quadro 2. Esses resultados demonstraram que o BoHV-5 pode utilizar tanto a via olfatória quanto a trigeminal para invadir o encéfalo, dependendo da via de inoculação. A inoculação pela via IN é seguida de transporte rápido e eficiente pela via olfatória, e mais tardiamente pela via trigeminal. A inoculação IC resulta em transporte pela via trigeminal, em cinética semelhante àquela observada após a inoculação IN.

Neuroinvasividade e neurovirulência

Spilki et al. (2002) avaliaram a neuroinvasividade e neurovirulência de uma cepa de BoHV-5 (EVI-88). Para isto, coelhos com idade de 30-35 dias foram inoculados pelas vias IT e IN. Independente da via de inoculação, todos os coelhos inoculados desenvolveram sinais neurológicos e morreram. Nos animais inoculados pela via IT os sinais clínicos da infecção foram mais precoces em relação aos animais do grupo inoculado pela via IN. No entanto, os títulos virais detectados no SNC destes coelhos foram superiores aos dos animais inoculados pela via IT. Estes resultados indicaram que a cepa EVI-88 foi capaz de invadir o SNC, replicar eficientemente no encéfalo e produzir doença neurológica. Também demonstra-

Quadro 2. Resumo do curso clínico, morbidade e mortalidade em coelhos inoculados com o herpesvírus bovino tipo 5

Grupo	Tratamento	Número	Morbidade	Início dos sinais dpi (média)	Mortalidade
1	Ablação do BO + inoculação intranasal	11	1 (9,1%)	17	1 (9,1%)
2	Controle + inoculação intranasal	10	10 (100%)	5-10 (7,5)	9 (90%)
3	Ablação do BO + Inoculação conjuntival	12	10 (83,3%)	9-15 (12,7%)	9 (75%)
4	Controle + Inoculação conjuntival	12	10 (83,3%)	11-20 (15,3)	10 (83,3%)

ram que a replicação eficiente no sítio de penetração é importante para assegurar a invasão e replicação no SNC. Em contraste, a cepa Cooper de BoHV-1 inoculada pela via IN não apresentou neuroinvasividade.

O papel do óxido nítrico (NO) na patogenia da doença neurológica

Uma parcela dos coelhos que desenvolve doença neurológica após a inoculação do BoHV-5 não apresenta alterações histológicas evidentes no encéfalo. Alguns animais não apresentam qualquer histopatologia. Da mesma forma, o número de neurônios positivos para antígenos virais é muitas vezes pequeno nesses animais. A ausência (ou intensidade leve) de alterações histológicas e o pequeno número de neurônios infectados contrastam com a severidade do quadro clínico. Essas observações levaram o grupo a investigar o possível papel de mediadores químicos na neuropatogenia da infecção. O óxido nítrico (NO), molécula envolvida na resposta inata contra vários patógenos, tem sido envolvido na patogenia de alguns vírus neurotrópicos, incluindo o HSV, PRV e HIV, entre outros (Fujii et al. 1999, Serrano et al. 2002). Tem sido proposto que NO, produzido principalmente por células da glia e astrócitos, poderia ter atividade anti-viral no início da infecção, mas em fases mais avançadas e em níveis maiores, poderia ser neurotóxico. Assim, um experimento foi delineado para determinar os níveis de NO no encéfalo de coelhos durante a infecção neurológica pelo BoHV-5. Os níveis de NO foram determinados pela mensuração dos seus produtos estáveis de degradação (nitritos e nitratos) por espectrofotometria. No cérebro de coelhos examinados durante a doença neurológica, os níveis de NO estavam significativamente aumentados em várias áreas, coincidindo com a detecção de vírus (Fig.6). Ou seja, a replicação do BoHV-5 no encéfalo é acompanhada de elevação significativa dos níveis de NO. Como os animais examinados já estavam apresentando episódios convulsivos e convulsões também podem induzir um aumento na produção de NO (Royes et al. 2005), um estudo subsequente foi realizado para determinar se o aumento dos níveis de NO precedia ou sucedia as convulsões. Para isso, coelhos foram inoculados com o BoHV-5 e os seus encéfalos foram examinados para a presença de vírus e determinação dos níveis de NO a diferentes intervalos após a inoculação. Os resultados obtidos demonstraram que os níveis de NO foram aumentando nas diferentes seções do encéfalo à medida que o vírus invadiu e replicou no SNC. Ou seja, a replicação viral foi acompanhada do aumento da produção de NO, que precedeu o desenvolvimento de sinais neurológicos (Dezengrini et al. 2008a). Assim, sugere-se que a síntese aumentada do NO, que acompanha a disseminação e replicação viral no encéfalo, é um componente da patogenia da doença neurológica pelo BoHV-5. É possível que a superprodução de NO durante a infecção aguda contribua para a toxicidade e disfunção neuronal, resultando em sinais neurológicos. O uso de drogas inibidoras

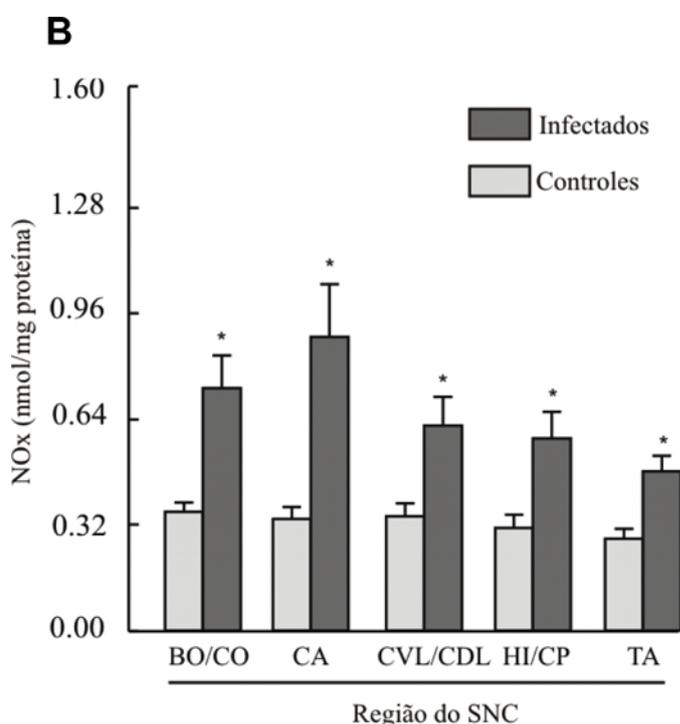
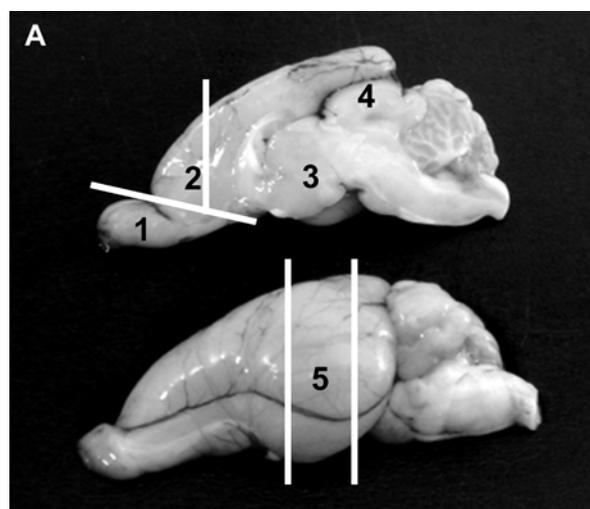


Fig.6. (A) Cortes do encéfalo examinados para níveis de NO e presença de vírus, após inoculação IN do BoHV-5 cepa SV-507. 1. Bulbo olfatório (BO) e córtex olfatório (CO); 2. córtex anterior (CA); 3. tálamo (Th); 4. hipocampo/córtex posterior (HC/CP); 5. córtices dorso- e ventro-lateral (CDL/CVL). (B) Níveis de óxido nítrico (NO) em diferentes áreas do encéfalo de coelhos durante a infecção neurológica aguda.

da produção de NO, associado ou não com drogas antivirais e anticonvulsivantes, pode auxiliar na determinação do real papel do NO na patogenia da infecção.

Origem e natureza das convulsões

As alterações histológicas no cérebro de coelhos que desenvolvem doença neurológica pelo BoHV-5 são observadas principalmente nas regiões anteriores do encéfalo, como o bulbo e córtex olfatório e o córtex anterior

(Diel et al. 2005, Dezengrini et al. 2008a). Chowdhury et al. (1997) demonstraram que as convulsões observadas em coelhos com doença neurológica aguda pelo BoHV-5 são do tipo "Jacksoniano", com origem na região do focinho e propagação para o pescoço e membros, com duração de 5-10 minutos. As convulsões jacksonianas são parciais ou focais complexas e envolvem alterações de movimento, sensação e função neural produzidas por atividade elétrica anormal no córtex motor primário (Ropper & Brown 2007).

Estudos preliminares do grupo em colaboração com o laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia da UFSM foram conduzidos com o objetivo de caracterizar as convulsões produzidas pelo BoHV-5, determinando o local de origem, o tipo e a exata duração dos episódios convulsivos em coelhos. Para isso, adaptou-se a técnica de inserção de eletrodos no crânio de ratos para realização de eletroencefalograma (EEG) para coelhos (Andersen 2001). Eletrodos foram inseridos no córtex olfatório, córtex anterior e córtex parietal de dez coelhos, selecionando-se o cerebelo para inserção de um eletrodo de referência, pois o EEG reflete as diferenças de potencial entre dois pontos, em μV por segundo. O registro eletroencefalográfico (EEG) realizado cinco a sete dias após a inserção dos eletrodos e inoculação de seis animais com o BoHV-5 SV-507 revelou que as convulsões produzidas pelo BoHV-5 em coelhos com doença neurológica aguda iniciam nas regiões anteriores do córtex, podendo ser detectadas alterações no EEG previamente ao início de alterações comportamentais, como espasmos, tonia e clonia dos membros anteriores e posteriores, características das convulsões induzidas pelo BoHV-5. Esses achados demonstram que o EEG pode fornecer dados precisos sobre os episódios convulsivos e, se realizado com um número maior de animais, pode elucidar as características elétricas da doença neurológica produzida pelo BoHV-5 em coelhos, o que poderia auxiliar na escolha de anticonvulsivantes que podem ser associados a antivirais e anti-inflamatórios na terapia da infecção neurológica pelo BoHV-5 e, por extensão, por outros alfa herpesvírus de animais.

A INFECÇÃO LATENTE

Coelhos já haviam sido utilizados com sucesso no estudo de vários aspectos das infecções latentes pelo BoHV-1 (Rock et al. 1982, 1986, 1987, Rock & Reed 1982). Esses estudos, e as similaridades biológicas e moleculares entre BoHV-1 e BoHV-5, serviram de base para os experimentos sobre infecções latentes pelo BoHV-5 em coelhos. Para tanto, os animais foram inicialmente inoculados pela via IN ou IC com amostras de BoHV-5 em títulos relativamente baixos ($10^{6,5-7,0}\text{TCID}_{50}$) buscando minimizar a ocorrência de doença neurológica aguda. Os coelhos que sobreviveram à infecção aguda foram tratados com Dx ($0,5, 1,6$ ou $2,6\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$ via IM) durante cinco dias, entre os dias 56 e 62pi. Excreção viral nas secreções conjuntivais ou nasais foi detectada em 25 de 44 coelhos

(56,8%), sendo mais freqüente nos animais inoculados pela via IC (10/15) do que nos inoculados pela via IN (15/29). As três doses de Dx testadas foram eficazes na indução de reativação. A excreção viral foi inicialmente detectada no segundo dia após o término da administração de Dx, e durou entre um e 11 dias (média de 3,5 dias). Além dessas observações, este estudo revelou outros dois achados interessantes, e até certo ponto surpreendentes. Primeiro: em torno de 20% dos animais submetidos à administração de Dx desenvolveram doença neurológica nos dias subsequentes ao tratamento. A doença foi clinicamente semelhante àquela da fase aguda, com alterações histológicas e antígenos virais no encéfalo desses animais. Essas observações, confirmadas em uma série de experimentos posteriores, contrariam os conceitos clássicos de que a reativação de latência por herpesvírus animais raramente cursa com recrudescência clínica. A segunda observação surpreendente foi a ocorrência relativamente freqüente (em torno de 5%) de doença neurológica tardia (34, 41 e 56 dias pi; 31 e 54 dias pDx), cuja etiologia também foi confirmada pela presença de vírus no SNC. Até o presente não está esclarecido se estes eventos tardios se devem à replicação viral prolongada (após a infecção aguda e reativação) ou se representam episódios de reativação da infecção latente (Caron et al. 2002).

Um segundo experimento foi realizado para investigar a distribuição do DNA viral no SNC de coelhos durante a infecção latente (Mayer et al. 2006). Embora se considere que os sítios principais de infecção latente por alfa herpesvírus humanos e animais sejam os gânglios sensoriais (trigêmeos [TG], lombo-sacrais), um estudo recente havia demonstrado uma ampla distribuição do DNA latente do BoHV-5 no SNC de bezerras infectadas experimentalmente (Vogel et al. 2003). Em coelhos inoculados com o BoHV-5 pela via IN, o DNA viral foi detectado por PCR, no dia 60pi, consistentemente nos TGs, mas também em outras áreas, como o córtex cerebral, cerebelo, ponte e bulbo (Quadro 3). Em coelhos inoculados com o BoHV-1 (SV-265), o DNA viral latente foi detectado quase exclusivamente nos TGs, mas esporadicamente também na ponte e pedúnculo cerebral (não mostrado). Em um grupo de coelhos eutanasiados 60 dias após a administração de Dx, o DNA viral latente do BoHV-5 foi detectado por PCR em um número notadamente maior de áreas (Quadro 3). Esses resultados corroboraram observações anteriores em bezerras (Vogel et al. 2003), de que o BoHV-5 estabelece infecção latente em vários sítios do SNC, além dos TGs, e sugerem que a reativação provavelmente é seguida da colonização de sítios adicionais. O significado biológico da latência em outros sítios, que não os TGs, permanece desconhecido.

Em um estudo realizado por Diel et al. (2005), coelhos submetidos à ablação cirúrgica dos BOs e posteriormente inoculados com o BoHV-5 excretaram o vírus em secreções nasais após o tratamento com Dx. Esse experimento demonstrou que, embora a via olfatória seja im-

Quadro 3. Distribuição do DNA latente do herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) no encéfalo de coelhos, aos 60 dias pós-infecção e 60 dias pós-reativação

Animal	Área ^a									
	bo	ca	cvl	cdl	cp	cb	tg	po	pc	th
60 dias pós-inoculação										
07	- ^b	-	-	+ ^c	-	+	+	-	-	-
11	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
12	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
18	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
20	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
22	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
24	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-
60 dias pós-reativação										
01	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
02	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-
04	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
06	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
08	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
10	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
14	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+

^a bo: bulbo olfatório; cortices: ca: anterior; cvl: ventro-lateral; cdl: dorso-lateral; cp: posterior; cb: cerebelo; tg: gânglios trigêmeos; po: ponte-medula oblonga; pc: pedúnculo cerebral; th: tálamo. ^b negativo. ^c positivo.

portante para a invasão viral do SNC durante a infecção aguda, a sua integridade não é necessária para o estabelecimento e reativação da latência, que provavelmente ocorre pela via trigeminal.

Estudos realizados em bezerros e coelhos no SV-UFSM indicaram que o período de replicação do BoHV-5 durante a infecção aguda é mais longo do que o do BoHV-1 (Flores E.F., dados não publicados). Observações de Caron et al. (2002) - ocorrência de doença neurológica tardia após a infecção aguda - reforçaram a hipótese de que o BoHV-5 é capaz de replicar por um período maior do que o BoHV-1, antes da infecção ser controlada pelo sistema imunológico do hospedeiro. Além disso, evidências sugerem que o BoHV-5 pode ser reativado da latência com mais facilidade do que o BoHV-1 (Flores E.F. não publicado). No entanto, o monitoramento da reativação da infecção pelo BoHV-1 e BoHV-5 em coelhos, durante aproximadamente 100 dias, não revelou diferenças evidentes na frequência de reativação espontânea do BoHV-5 em comparação com o BoHV-1.

A reativação espontânea pode ser observada ainda como efeito de alterações nas condições de ambiência do biotério onde são mantidos os animais, devendo ser observados especialmente a ventilação e manejo adequado da temperatura. Eventos de calor excessivo podem estar associados a reativação da infecção, com sinais clínicos evidentes, óbito, isolamento de vírus do SNC e lesões histopatológicas compatíveis com a doença neurológica induzida pelo BoHV-5, mesmo em períodos da ordem de 90 dias após a inoculação (Spilki F.R., dados não publicados).

Para finalizar, alguns aspectos importantes devem ser

considerados no estudo da infecção latente pelo BoHV-5 em coelhos: 1) Devido a morbidade e mortalidade durante a infecção aguda, deve-se usar títulos virais baixos e/ou animais com mais idade; 2) A possibilidade de ocorrência de doença neurológica tardia durante a infecção aguda (25-35 dias pi) deve ser considerada. Por isso, para assegurar-se de que os animais estão realmente atravessando a fase latente da infecção, recomenda-se deixá-los pelo menos 40-50 dias após a inoculação; 3) A soroconversão após a administração de Dx não deve ser considerada o único indicador de reativação. É comum ocorrer reativação (com excreção viral) sem aumento nos títulos de anticorpos neutralizantes. Por isso, a confirmação da reativação deve considerar a combinação de excreção viral e soroconversão; 4) Reativações espontâneas com recrudescência de doença neurológica podem ocorrer a longos intervalos após a inoculação. Mortes que ocorram muitos dias após a inoculação (>30 dias), com ou sem manifestações neurológicas, devem ser seguidas de investigação da presença de vírus no SNC, para confirmar a *causa mortis*; e 5) Recomenda-se também um cuidado especial na escolha da marca comercial de Dx a ser utilizada na reativação. Algumas falhas em reativar a infecção, tanto em coelhos como em bezerros, podem ser devidas à qualidade do produto. Recomenda-se o uso de Azium (Schering-Plough, Ltda), Decadron (Aché), Decadronal (Aché) ou Cort-Trad SM Injetável (Química Santa Marina S/A). Essas drogas têm sido utilizadas com sucesso em vários experimentos, tanto em coelhos quanto em bezerros.

TERAPÊUTICA ANTIVIRAL

Coelhos também têm sido utilizados como modelo para avaliar a eficácia de drogas e terapêuticas antivirais em infecções pelo BoHV-5. O valproato de sódio, anticonvulsivante utilizado associado com drogas antivirais no tratamento de encefalites experimentais pelo HIV-1 em ratos (Jha et al. 2004) foi testado sem sucesso no tratamento de doença neurológica pelo BoHV-5 em coelhos (Flores E.F. dados não publicados).

Um estudo recente demonstrou que a droga antiviral Foscarnet foi capaz de reduzir em 60% a morbidade e mortalidade de coelhos inoculados com o BoHV-5 (mortalidade de 10/10 nos controles; 4/10 nos tratados), quando administrada em doses de 100µg.kg⁻¹.dia⁻¹ a partir do dia 1pi, durante 6 dias (Dezengrini et al. 2008b). Essa droga havia demonstrado alta atividade anti-BoHV-5 *in vitro*, ao contrário do Aciclovir e Ganciclovir, que apresentaram atividade antiviral baixa ou negligível *in vitro* (Dezengrini et al. 2008b). Parece haver também variabilidade entre as cepas de BoHV-5 quanto à eficácia do Aciclovir, mas a eficácia da droga sobre esse vírus é sempre inferior quando comparada ao seu efeito sobre a replicação do BoHV-1 ou do HSV (Batista et al. 2003).

Independentemente dos resultados obtidos com drogas específicas, esses experimentos demonstram que os coelhos podem ser utilizados para avaliar a eficácia de

drogas antivirais, assim como a combinação de antivirais e protocolos terapêuticos para o tratamento da doença neurológica pelo BoHV-5, bem como para elucidar aspectos da patogenia da infecção nesta espécie. Embora o uso dessas drogas em bovinos seja aparentemente inviável, observações derivadas desses estudos podem ter aplicação no tratamento de encefalites pelo HSV em humanos, e também no tratamento de encefalites por herpesvírus de pequenos animais e de eqüinos de alto valor econômico.

Estudos imunológicos

Estudos imunológicos relacionados ao BoHV-5 também têm sido realizados em coelhos, incluindo a avaliação de proteção por imunidade passiva natural (transplacentária) e artificial (soro hiperimune), além de testes de proteção vacinal.

Imunidade passiva e proteção

Embora a imunidade humoral pareça desempenhar um papel secundário na proteção contra os herpesvírus, a presença de anticorpos no plasma e em outros fluidos corporais provavelmente contribui para restringir a disseminação viral e assim, auxiliar na proteção contra a infecção (ou reinfeção). Nesse sentido, estudos preliminares em coelhos podem ser úteis na medida em que acrescentam novas informações e possam direcionar estudos subsequentes nos hospedeiros naturais.

Em um experimento inicial realizado por Silva et al. (1999b) duas matrizes foram imunizadas duas vezes com o BoHV-5 (pela via subcutânea) e 30 dias após foram colocadas em cobertura. No dia da cobertura, as fêmeas apresentavam títulos neutralizantes de 32 e 64. Os coelhos nascidos dessas fêmeas, juntamente com coelhos filhos de coelhas não-imunizadas, foram inoculados com o BoHV-5 aos 34 dias de idade e monitorados clinicamente. A imunização passiva resultou em um retardo no início dos sinais clínicos (média de 7,2 dias versus 5,4 dias), prolongamento do curso clínico (médias: 3,1 dias versus 1,8 dias) e redução da morbidade (41,6% [5/12] versus 70% [7/10]) nos filhos de coelhas imunizadas. Em resumo, esse experimento demonstrou que a imunidade passiva natural foi capaz de conferir proteção parcial frente ao desafio com o vírus homólogo.

A proteção por imunidade passiva também pode ser estudada em animais submetidos à administração de soro hiperimune específico. Quatro coelhos recém-desmamados foram inoculados pela via intraperitoneal (IP) com 10mL de um soro anti-BoHV-5 produzido em cabras (título de 256). Testes de soro-neutralização (SN) revelaram que títulos neutralizantes entre 4 e 16 podem ser detectados no soro já as 12h após a inoculação; e títulos de 4, 8 e 16 estavam presentes as 48h. A duração dos níveis de anticorpos não foi avaliada; nem os animais foram submetidos ao desafio. Não obstante, esse experimento demonstrou que os anticorpos administrados pela via IP são eficientemente absorvidos e atingem níveis séricos con-

sideráveis em um curto intervalo de tempo. Com isso, esse protocolo pode ser utilizado para avaliar o efeito da imunidade passiva na prevenção e/ou tratamento da infecção neurológica, a exemplo do que tem sido realizado na doença neurológica experimental pelo HSV-1 em camundongos (Erlich & Mills 1986).

Proteção vacinal

Além das restrições inerentes ao uso de modelos animais - e das incertezas com relação à validade da extrapolação dos resultados - os testes de proteção vacinal contra o BoHV-5 em coelhos apresentam restrições adicionais. Primeiro: a idade mais apropriada para a realização do desafio é de 30-35 dias de idade, pois resulta em alta morbidade e mortalidade. Para a realização do desafio nesta idade, a imunização deve ser feita pelo menos 20 dias antes (10-20 dias de idade). Em animais desta idade, a maturidade e capacidade funcional do sistema imunológico - e a capacidade de responder à imunização - se constituem em uma incógnita. Por outro lado, a opção pelo desafio mais tardio (60-90 dias) teoricamente minimiza o risco de se imunizar animais com o sistema imune parcialmente maduro. No entanto, a morbidade em animais inoculados com essa idade se reduz drasticamente, o que dificulta a comparação entre os grupos vacinado e controle, para o cálculo estatístico. Por outro lado, a obtenção de um número passível de análise estatística adequada, pode requerer o uso de um número excessivamente alto de animais.

Outra importante restrição ao uso de coelhos para se avaliar proteção vacinal frente ao BoHV-5 é a dose utilizada no desafio. Os títulos virais necessários para produzir doença em 70-80% dos animais são excessivamente altos, e altamente improváveis de ocorrer em condições naturais, resguardando-se as comparações coelhos/bovinos. Por isso, eventuais falhas da vacinação de conferir proteção em coelhos devem ser interpretadas com cautela, pois o título viral utilizado no desafio é geralmente muito alto. Assim, o uso de coelhos com essa finalidade deve ser reavaliado e, se indicado, adaptações ao protocolo de vacinação e desafio devem ser consideradas.

Em um experimento inicial, Beltrão et al. (2000) utilizaram dois grupos de coelhos com idade de 20 dias, que foram imunizados com o BoHV-1 (cepa Cooper, $10^{7,64}$ TCID₅₀) ou BoHV-5 (EVI-88, $10^{6,81}$ TCID₅₀) pela via subcutânea e desafiados 20 dias após com a cepa EVI-88 ($10^{7,64}$ TCID₅₀) pela via IN. No dia do desafio, os coelhos imunizados com o BoHV-1 apresentavam títulos neutralizantes entre 4 e 32; e os imunizados com o BoHV-5 possuíam anticorpos em títulos entre 8 e 16. Os coelhos imunizados com o BoHV-1 ficaram protegidos da doença clínica; apenas 2 de 10 apresentaram sinais leves (duração de 2-7 dias) e se recuperaram. Os coelhos imunizados com o BoHV-5 também ficaram protegidos, porém em menor grau; 6/10 apresentaram sinais neurológicos leves e cinco se recuperaram; apenas um animal foi a óbito. Esses resultados demonstraram que a imunização ativa

foi capaz de proteger os animais da doença neurológica, e que houve proteção heteróloga parcial.

Silva et al. (2006) investigaram a proteção cruzada entre BoHV-1 x BoHV-5 em coelhos imunizados com uma cepa de BoHV-1 defectiva na glicoproteína E (gE). O desafio foi realizado 16 dias após a vacinação, pela inoculação IN da cepa EVI-88 ($10^{9.1}$ TCID₅₀). Dois dos cinco coelhos vacinados desenvolveram doença neurológica, contra 3/5 no grupo controle. Esses resultados sugeriram ausência de proteção cruzada, porém devem ser interpretados com cautela, pelas seguintes razões: 1) O tempo entre a imunização e o desafio foi muito curto; 2) A dose viral utilizada no desafio foi excessivamente alta, e 3) Não havia grupo controle vacinado e desafiado com o BoHV-1. De fato, estudos posteriores em bezerros confirmaram observações *in vitro*, demonstrando a ocorrência de neutralização e proteção cruzada entre o BoHV-1 x BoHV-5 em níveis semelhantes à proteção homóloga (Del Medico et al. 2006).

ESTUDO DA FUNÇÃO DE GENES VIRAIS E FENÓTIPO DE VÍRUS RECOMBINANTES

As semelhanças na biologia da infecção pelo BoHV-5 em coelhos e bovinos têm permitido também estudos da função de produtos gênicos, do fenótipo de vírus recombinantes e cepas vacinais. Estudos do grupo do Dr Chowdhury, investigaram a importância das glicoproteínas E (gE), gC, gI e US9 na neuroinvasividade, neurovirulência e tropismo do BoHV-5, por meio da construção e inoculação, em coelhos, de recombinantes defectivos nessas proteínas (Chowdhury et al. 2000a,b, 2002, 2006, Al-Mubarak & Chowdhury 2004, Al-Mubarak et al. 2007).

A capacidade de produzir doença neurológica em coelhos foi utilizada na caracterização de amostras de campo de BoHV envolvidas em doença neurológica de bovinos (Silva et al. 2007). Cinco amostras isoladas do cérebro de bovinos com doença nervosa foram identificadas como BoHV-1, por métodos moleculares (PCR, seqüenciamento do gene da glicoproteína C) e antigênicos (reatividade com anticorpos monoclonais e neutralização). No entanto, nenhuma dessas amostras produziu doença neurológica após inoculação IN em coelhos (n=4, para cada vírus), ao contrário de quatro amostras identificadas como BoHV-5, que produziram mortalidade em 2/4 e 3 de 4 animais, respectivamente. Concluiu-se que algumas amostras de BoHV-1, sob certas condições, são capazes de produzir doença neurológica em bovinos, não sendo necessariamente neurovirulentas para coelhos (Silva et al. 2007). Assim, a capacidade de produzir doença neurológica em coelhos pode ser utilizada como um parâmetro a mais na diferenciação entre BoHV-1 e BoHV-5. A exceção se faz a uma única cepa de BoHV-1, a cepa padrão Los Angeles, que induziu doença com sinais neurológicos em coelhos, após inoculação pela via IN (Spilki et al 2002). A mesma cepa não produz doença neurológica em bovinos, mas características antigênicas e genômicas (Engels et al. 1985) demonstram diferenças entre esta cepa e outras amostras de BoHV-1.

Coelhos também foram utilizados para estudar o potencial neurovirulento de mutantes do BoHV-5 produzidos *in vitro*. Mutantes do BoHV-5, cepa SV-507, foram selecionados pela resistência a bromovinildeoxiuridina, e possivelmente são defectivos na atividade da enzima timidina kinase (TK). A inoculação IN de 4 coelhos com um destes mutantes não resultou em doença neurológica, em contraste com 100% (4 de 4) de morbidade e mortalidade resultantes da inoculação da cepa parental SV-507 (Brum M.C., comunicação pessoal).

A inoculação de coelhos com um vírus recombinante construído a partir da amostra EVI-88, com deleção nos genes que codificam as glicoproteínas gI, gE e a proteína US9 resultou em doença neurológica em 4 de 13 animais inoculados. Os sinais clínicos, extensão dos membros torácicos e pélvicos, foram distintos daqueles geralmente observados após a inoculação com a cepa parental. As lesões se restringiram ao diencéfalo dos animais, não havendo disseminação do vírus ao córtex cerebral. Esse experimento, demonstra que a deleção destes genes afeta a disseminação do BoHV-5 no encéfalo de coelhos, o que pode alterar as manifestações clínicas resultantes da infecção neurológica (Spilki R.F. comunicação pessoal).

O fenótipo de recombinantes do BoHV-5 defectivos na enzima timidina quinase (TK), gE e TK/gE, construídos para uso potencial em vacinas, está sendo estudado em coelhos. Estudos preliminares demonstraram que o mutante duplo (TK-gE-) não é neurovirulento para esses animais, ao contrário da cepa parental (SV-507) (Brum M.C. comunicação pessoal). Após os estudos iniciais neste modelo, estudos semelhantes serão conduzidos nos hospedeiros naturais, para confirmar a abolição/atenuação do fenótipo neurovirulento e a conseqüente adequação para uso em vacinas.

Outros usos

Além dos estudos já descritos, a susceptibilidade de coelhos à infecção e doença neurológica pelo BoHV-5 tem sido utilizada com outras finalidades específicas: 1) Produção de anti-soro específico para BoHV-1 e BoHV-5; 2) Uso de cérebros infectados como controles positivos em testes de diagnóstico (IFA, PCR, isolamento); 3) Uso de cérebros positivos para a padronização da técnica de imuno-histoquímica; 4) Padronização da técnica de hibridização *in situ* (ISH); e 5) Teste de reatividade de anticorpos monoclonais nas técnicas de imunofluorescência e IHQ, entre outros.

OUTROS MODELOS EXPERIMENTAIS PARA O BoHV-5

Outros modelos experimentais que apresentassem as mesmas vantagens dos coelhos (susceptibilidade ao BoHV-5, pequeno porte, baixo custo de aquisição e manutenção) foram buscados no período em que se desenvolveram estas pesquisas. Em especial, camundongos seriam de grande interesse; todavia, a inoculação pela

via IC de seis amostras diferentes de BoHV-5 (A663, EVI-88, EVI-340, SV-136, Taim, V175) sempre em títulos altos, em camundongos lactentes brancos suíços, grupos de 10 animais cada, resultou na morte de apenas dois animais inoculados com a amostra A663 nos dias 4 e 7 após a inoculação (pi), enquanto todos os outros camundongos, ainda que mantidos em observação por um período de 40 dias, não apresentaram sinais neurológicos. Esses experimentos demonstraram a ausência de suscetibilidade, pelo menos desta linhagem de camundongos, à infecção pelo BoHV-5 (Spilki F.R, dados não publicados). Posteriormente, camundongos de linhagens "knock-out" para o interferon gama (IFN- γ) foram utilizados com sucesso para o estudo de fatores virais e do hospedeiro (IFN- γ) envolvidos na patogenia e neurovirulência do BoHV-5 (Abril et al. 2004).

Além de coelhos (e estudos restritos em camundongos), ovinos (Silva et al. 1999a, Bélak et al. 1999) e caprinos (Diel et al. 2007) têm sido utilizados para o estudo de alguns aspectos da infecção aguda e latente pelo BoHV-5. As espécies ovina e caprina mostraram-se susceptíveis a infecção pelo BoHV-5 (e também pelo BoHV-1), e a sua participação na epidemiologia dessas infecções, embora controversa e contestada, tem sido sugerida por alguns autores.

Conclusões e perspectivas

O estabelecimento do modelo experimental em coelhos tem contribuído sobremaneira para o conhecimento da biologia da infecção aguda e latente pelo BoHV-5. Resguardando-se as diferenças biológicas que certamente existem entre bovinos e coelhos - e que recomendam cautela na extrapolação dos achados - vários aspectos da patogenia e resposta imunológica neste modelo têm demonstrado grande similaridade com a infecção nos hospedeiros naturais. Isto valida ainda mais este modelo e o credencia para uso com diversas finalidades. Em particular, estudos da função de genes virais envolvidos na neurovirulência e neurotropismo, e nas interações do vírus com o sistema imunológico; a caracterização de recombinantes virais destinados a uso em vacinas; e o teste e desenvolvimento de drogas para o tratamento das infecções herpéticas humanas e de animais, entre outros, podem se beneficiar deste modelo experimental. É prudente ressaltar, no entanto, que as observações oriundas de experimentos neste modelo animal devem ser cuidadosamente examinadas e, se possível, validadas por estudos equivalentes nos hospedeiros naturais.

REFERÊNCIAS

- Abril C., Engels M., Liman A., Hilbe M., Albin S., Franchini M., Suter M. & Ackermann M. 2004. Both viral and host factors contribute to neurovirulence of bovine herpesviruses 1 and 5 in interferon receptor-deficient mice. *J. Virol.* 78(7):3644-3653.
- Al-Mubarak A., Simon J., Coats C., Okemba J.D., Burton M.D. & Chowdhury S.I. 2007. Glycoprotein E (gE) specified by bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) enables trans-neuronal virus spread and neurovirulence without being a structural component of enveloped virions. *Virology*. 365(2):398-409.
- Al-Mubarak A. & Chowdhury S.I. 2004. In the absence of glycoprotein I (gI), gE determines bovine herpesvirus type 5 neuroinvasiveness and neurovirulence. *J. Neurovirol.* 10(4):233-243.
- Andersen M.L. 2001. Registro de potenciais, p.35-42. In ____ (Ed.), *Implantação de Eletrodos para o Estudo Eletrofisiológico do Ciclo Vigília-Ssono do Rato*. USP, São Paulo.
- Batista H.B.C.R., Spilki F.R., Silva A.D., Esteves P.A., Franco A.C. & Roehe P.M. 2003. Mutation rates in bovine herpesviruses types 1 and 5 estimated by acyclovir resistance. XIV National Meeting of Virology, Florianópolis. *Virus Rev. Res.* 8:136-137.
- Belák L., Kucsera C., Ros G., Kulcsár L., Makranszki T.S. & Belák S. 1999. Studies on the pathogenicity of bovine herpesvirus type 5 in sheep. *Comp. Immunol. Microb.* 22:207-220.
- Beltrão N., Flores E.F., Weiblen R., Silva A.M., Roehe P.M. & Irigoyen L.F. 2000. Infecção e enfermidade neurológica pelo herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5): Coelhos como modelo experimental. *Pesq. Vet. Bras.* 20:144-150.
- Belknap E.B., Collins J.K., Ayers V.K. & Schultheiss P.C. 1994. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type-5 (BHV-5). *Vet. Pathol.* 31:358-365.
- Brown G.A. & Field H.J. 1990. Experimental reactivation of bovine herpesvirus (BHV-1) by means of corticosteroids in an intranasal rabbit model. *Arch. Virol.* 112: 81-101.
- Caron L., Flores E.F., Weiblen R., Scherer C.F.C., Irigoyen L.F., Roehe P.M., Odeon A. & Sur J-H. 2002. Latent infection by bovine herpesvirus type-5 in experimentally infected rabbits: virus reactivation, shedding and recrudescence of neurological disease. *Vet. Microbiol.* 84(4):285-295.
- Carrilo B.J., Pospischil A. & Dahme E. 1983. Pathology of a bovine viral necrotizing encephalitis in Argentina. *Zbl. Vet. Med. B* 30 (3):161-168.
- Chowdhury S.I., Lee B.J., Mosier D., Sur J.H., Osório F.A., Kennedy G. & Weiss M.L. 1997. Neuropathology of bovine herpesvirus 5 (BHV-5) meningo-encephalitis in a rabbit seizure model. *J. Comp. Pathol.* 117: 295-310.
- Chowdhury S.I., Lee B.J., Onderci M., Weiss M.L. & Mosier D. 2000a. Neurovirulence of glycoprotein C(gC)-deleted bovine herpesvirus type-5 (BHV-5) and BHV-5 expressing BHV-1 gC in a rabbit seizure model. *J. Neurovirol.* 6:284-95
- Chowdhury S.I., Lee B.J., Ozkul A. & Weiss M.L. 2000b. Bovine herpesvirus 5 glycoprotein E is important for neuroinvasiveness and neurovirulence in the olfactory pathway of the rabbit. *J. Virol.* 74:2094-2106.
- Chowdhury S.I., Onderci M., Bhattacharjee P.S., Al-Mubarak A., Weiss M.L. & Zhou Y. 2002. Bovine herpesvirus 5 (BHV-5) Us9 is essential for BHV-5 neuropathogenesis. *J. Virol.* 76(8):3839-51.
- Chowdhury S.I., Mahmood S., Simon J., Al-Mubarak A. & Zhou Y. 2006. The Us9 gene of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) effectively complements a Us9-null strain of BHV-5 for anterograde transport, neurovirulence, and neuroinvasiveness in a rabbit model. *J. Virol.* 80(9):4396-405.
- Del Médico Z.M.P., Puntel M., Zamorano P.I., Sadir A.M. & Romera S.A. 2006. BHV-1 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle. *Res. Vet. Sci.* 81(3):327-34.
- Delhon G., Moraes M.P., Lu Z., Afonso C.L., Flores E.F., Weiblen R., Kutish G.F. & Rock D.L. 2003. Genome of bovine herpesvirus 5. *J. Virol.* 77(19):10339-10347.
- Dezengrini R., Weiss M., Torres F.D., Oliveira M.S., Furian A.F., Mello C.F., Weiblen R. & Flores E.F. 2008a. Bovine herpesvirus 5 induces an overproduction of nitric oxide in the brain of rabbits which correlates with virus dissemination and precedes the development of neurological signs. *J. Neurovirol.* (In press)
- Dezengrini R., Weiss M., Weiblen R., Flores E.F. 2008b. Atividade antiviral in vitro do Acyclovir, Ganciclovir e Foscarnet contra os herpesvírus

- bovino tipos 1 (BoHV-1), 2 (BoHV-2) e 5 (BoHV-5) e in vivo do Foscarnet contra o BoHV-5. *Ciencia Rural* (Submetido)
- Diel D.G., Fonseca E.T., Souza S.F., Mazzanti A., Bauermann F.V., Weiblen R. & Flores E.F. 2005. O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) pode utilizar as rotas olfatória e trigeminal para invadir o sistema nervoso central de coelhos, dependendo da via de inoculação. *Pesq. Vet. Bras.* 25(3):164-170.
- Diel D.G., Almeida S.R., Brum M.C.S., Dezengrini R., Weiblen R. & Flores E.F. 2007. Acute and latent infection by bovine herpesvirus type 5 in experimentally infected goats. *Vet. Microbiol.* 121:257-267.
- Erich K.S. & Mills J. 1986. Passive immunotherapy for encephalitis caused by herpes simplex virus. *Rev. Infect. Dis.* 8(4):139-145.
- Fonseca E.T., Diel D.G., Souza S.F., Mazzanti A., Weiblen R. & Flores E.F. 2006. Ablação cirúrgica dos bulbos olfatórios em coelhos: modelo para estudos de patogenia de infecções por vírus neurotrópicos. *Ciência Rural* 36(2):544-549.
- Fuji S., Akaïke T. & Maeda H. 1999. Role of nitric oxide in pathogenesis of herpes simplex virus encephalitis in rats. *Viol.* 256:203-212.
- Huanyu D., Birusingh K., Faraci J., Gorantla S., Poluektova L.Y., Maggwar S.B., Dewhurst S., Gelbard H.A., Gendelman H.E. 2003. Neuroprotective activities of sodium valproate in a murine model of human immunodeficiency virus-1 encephalitis. *J. Neuroscience* 23(27):9162-9170.
- Jha S., Patel R., Yadav R.K. & Kumar V. 2004. Clinical spectrum, pitfalls in diagnosis and therapeutic implications in herpesvirus simplex encephalitis. *J. Assoc. Physicians India* 52:24-26.
- Kahrs R.F. 2001. Infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis, p.159-170. In: ____ (Ed.), *Viral Diseases of Cattle*. 2nd ed. Iowa State University, Ames.
- Mayer S.V., Quadros V.L., Vogel F.S.F., Winkelmann E.R., Arenhart S., Weiblen R. & Flores E.F. 2006. Dexamethasone-induced reactivation of bovine herpesvirus type 5 latent infection in experimentally infected rabbits results in a broader distribution of latent viral DNA in the brain. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39:335-343.
- Meyer G., Lemaire M. & Lyaku J. 1996. Establishment of a rabbit model for bovine herpesvirus type 5 neurological acute infection. *Vet. Microbiol.* 5:27-40.
- Oldoni I., Weiblen R., Inkelmann M.A. & Flores E.F. 2004. Production and characterization of monoclonal antibodies to a Brazilian bovine herpesvirus type 5 (BHV-5). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37(2):213-221.
- Perez S.E., Bretschneider C., Leunda M.R., Osorio F.A., Flores E.F. & Odeón A.C. 2002. Primary infection, latency and reactivation of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in the bovine nervous system. *Vet. Pathol.* 39:437-444.
- Rissi D.R., Oliveira F.N., Rech R.R., Pierezan F., Lemos R.A.A. & Barros C.S.L. 2006. Epidemiology, clinical signs and distribution of the encephalic lesions in cattle affected by meningoencephalitis caused by bovine herpesvirus-5. *Braz. J. Vet. Res.* 26(2):123-132.
- Rissi D.R., Rech R.R., Flores E.F., Kommers G.D. & Barros C.S.L. 2007. Meningoencephalitis by bovine herpesvirus-5. *Pesq. Vet. Bras.* 27(7):251-260.
- Riet-Correa F., Vidor T., Schild A.L. & Méndez M.C. 1989. Meningoencefalite e necrose do córtex cerebral em bovinos causadas por Herpes Vírus Bovino-1. *Pesq. Vet. Bras.* 9:13-16.
- Rock D.L. & Reed D.E. 1982. Persistent infection with bovine herpesvirus type-1: rabbit model. *Infect. Immun.* 35:371-373.
- Rock D.L., Hagemoser W.A., Osorio F.A. & Reed D.E. 1986. Detection of bovine herpesvirus type 1 RNA in trigeminal ganglion of latently infected rabbits by *in situ* hybridization. *J. Gen. Virol.* 67:2515-2520.
- Rock D.L., Beam S.L. & Mayfield J.E. 1987. Mapping bovine herpesvirus type 1 latency-related RNA in trigeminal ganglia of latently infected rabbits. *J. Virol.* 61(12):3827-3831.
- Rock D., Lokensgard J., Lewi T. & Kutish G. 1992. Characterization of dexamethasone-induced reactivation of latent bovine herpesvirus type 1. *J. Virol.* 66:2484-2490.
- Rock D.L. 1994. Latent infection with bovine herpesvirus type 1. *Sem. Virol.* 5:233-240.
- Ropper A.H. & Brown R.H. 2007. Adams and Victor's principles of neurology: Cardinal manifestations of neurologic disease, epilepsy and disorders of consciousness. 8th ed. Disponível em: <http://www.accessmedicine.com/content.aspx?aID=969414>. Acesso: 31 de maio de 2007.
- Royes L.F.F., Figuera M.R., Furian A.F., Oliveira M.S., Myskw J. de C., Fiorenza N.G. & Mello C.F. 2005. Involvement of NO in the convulsive behavior and oxidative damage induced by the intrastriatal injection of methylmalonate. *Neurosci. Lett.* 376:115-120.
- Serrano F., Enquist L.W. & Card J.P. 2002. Pseudorabies virus-induced expression of nitric oxide synthase isoforms. *Physiol. Behavior* 77:557-563.
- Silva A.M., Weiblen R., Irigoyen L.F., Roehe P.M., Sur H.-J., Osorio F.A. & Flores E.F. 1999a. Experimental infection of sheep with bovine herpesvirus type-5 (BHV-5). *Vet. Microbiol.* 66:89-99.
- Silva A.M., Flores E.F., Weiblen R., Canto M.C., Irigoyen L.F., Roehe P.M. & Souza R.S. 1999b. Pathogenesis of meningoencephalitis in rabbits by bovine herpesvirus type-5 (BHV-5). *Revta Bras. Microbiol.* 30:22-31.
- Silva A.D., Spilki F.R., Franco A.C., Esteves P.A., Hübner S.O., Driemeier D., Oliveira A.P., Rijsewijk F.A.M. & Roehe P.M. 2006. Vaccination with a gE-negative bovine herpesvirus type 1 vaccine confers insufficient protection to a bovine herpesvirus type 5 challenge. *Vaccine* 24(16):3313-3320.
- Silva M.S., Brum M.C.S., Loreto E.L., Weiblen R. & Flores E.F. 2007. Molecular and antigenic characterization of Brazilian bovine herpesvirus type 1 isolates recovered from the brain of cattle with neurological disease. *Virus Res.* 129:191-199.
- Spilki F.R., Esteves P.A., Franco A.C., Lima M., Holz C.L., Batista H.B.R., Driemeier D., Flores E.F., Weiblen R. & Roehe P.M. 2002. Neurovirulência e neuroinvasividade de herpesvírus bovinos tipos 1 e 5 em coelhos. *Pesq. Vet. Bras.* 22(2):58-63.
- Spilki F.R., Silva T.C., Esteves P.A., Driemeier D. & Roehe P.M. 2000. Intrathecal inoculation of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in rabbits. In: XI National Meeting of Virology, São Lourenço, MG. *Virus Rev. Res.* 5:118.
- Studdert M.J. 1990. Bovine encephalitis herpesvirus. *Vet. Rec.* 126:21-22.
- Valera A.R., Pidone C.L., Massone A.R., Quiroga M.A., Riganti J.G., Corva S.G. & Galosi C.M. 2008. A simple method of infecting rabbits with Bovine herpesvirus 1 and 5. *J. Virol. Methods* 150(1/2):77-79.
- Vogel F.S.F., Caron L., Flores E.F., Weiblen R., Winkelmann E.R., Mayer S.V. & Bastos R.G. 2003. Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. *J. Clin. Microbiol.* 41(10):4512-4520.
- Weiblen R., Barros C.S.L., Canabarro T.F. & Flores I.E. 1989. Bovine meningoencephalitis from IBR virus. *Vet. Rec.* 25(124):666-667.
- Zhao M.L., Kim M.O., Morgello S. & Lee S.C. 2001. Expression of inducible nitric oxide synthase, interleukin-1 and caspase-1 in HIV-1 encephalitis. *J. Neuroimmunol.* 115(1/2):182-191.