

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

**ABLAÇÃO CIRÚRGICA DOS BULBOS OLFATÓRIOS
EM COELHOS: MODELO PARA ESTUDOS DE
PATOGENIA DE INFECÇÕES POR VÍRUS
NEUROTROPICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Erika Toledo da Fonseca

**Santa Maria, RS, Brasil
2006**

**ABLAÇÃO CIRÚRGICA DOS BULBOS OLFATÓRIOS EM
COELHOS: MODELO PARA ESTUDOS DE PATOGENIA DE
INFECÇÕES POR VÍRUS NEUROTROPICOS**

por

Erika Toledo da Fonseca

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Cirurgia de Pequenos Animais, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Cirurgia Veterinária.**

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Mazzanti

Santa Maria, RS, Brasil
2006

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**ABLAÇÃO CIRÚRGICA DOS BULBOS OLFATÓRIOS EM COELHOS:
MODELO PARA ESTUDOS DE PATOGENIA DE INFECCÕES POR
VÍRUS NEUROTRÓPICOS**

elaborada por
Erika Toledo da Fonseca

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Cirurgia Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Alexandre Mazzanti, Dr., UFSM
(Presidente/Orientador)

Alceu Gaspar Raiser, Dr., UFSM

Émerson Antonio Contesini, Dr., UFRGS

Santa Maria, 21 de dezembro de 2006.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

ABLAÇÃO CIRÚRGICA DOS BULBOS OLFATÓRIOS EM COELHOS: MODELO PARA ESTUDOS DE PATOGENIA DE INFECÇÕES POR VÍRUS NEUROTRÓPICOS

AUTORA: ERIKA TOLEDO DA FONSECA

ORIENTADOR: ALEXANDRE MAZZANTI

Santa Maria, 21 de dezembro de 2006.

Coelhos têm sido utilizados como modelo para o estudo da neuropatogenia da infecção pelo herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5), um importante agente de doença neurológica em bovinos. O sistema olfatório tem sido apontado como a principal via de acesso do vírus ao cérebro após replicação na cavidade nasal. Para investigar a importância da via olfatória na patogenia da infecção neurológica pelo BHV-5, foi elaborada e avaliada técnica operatória de craniotomia transfrontal para remoção dos bulbos olfatórios (BOs), definindo-se as órbitas como referência anatômica. Foram utilizados 45 coelhos com 30 a 40 dias de idade, sendo 23 submetidos à ablação cirúrgica dos BOs e posteriormente inoculados pela via intranasal (IN) ou no saco conjuntival (IC) com o BHV-5. Após incisões de pele, tecido subcutâneo e periósteo, a craniotomia foi realizada em um ponto equidistante entre os cantos mediais dos olhos, com uma broca sulcada de 3mm acoplada a uma perfuratriz elétrica de baixa rotação. A remoção dos BOs foi realizada com uma sonda uretral nº6 acoplada a um aspirador. O estudo macroscópico de três animais após a cirurgia comprovou que o procedimento foi eficiente na remoção total dos BOs. Isso também foi comprovado pela interrupção do acesso do vírus ao córtex cerebral: apenas um animal (1/11 ou 9,1%) no grupo submetido à ablação dos BOs com inoculação IN desenvolveu enfermidade neurológica, contra 100% (10/10) dos coelhos controle. Conclui-se que a técnica de craniotomia transfrontal utilizando a órbita como referência anatômica permite o acesso adequado para localização e remoção dos BOs e pode ser utilizada em estudos de patogenia de infecções por vírus neurotrópicos que exijam a interrupção completa da via olfatória.

Palavras-chave: herpesvírus bovino tipo 5, BHV-5, bulbo olfatório, cirurgia, modelo experimental, coelhos.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

SURGICAL ABLATION OF THE OLFACTORY BULB IN RABBITS: A MODEL TO STUDY THE PATHOGENESIS OF NEUROTROPIC VIRUS INFECTIONS.

AUTHOR: ERIKA TOLEDO DA FONSECA

ADVISER: ALEXANDRE MAZZANTI

Santa Maria, December, 21th, 2006.

Rabbits have been used as animal models to study the pathogenesis of neurological infection by bovine herpesvirus type 5 (BHV-5), an important agent of meningoencephalitis in cattle. The olfactory system has been implicated as the main pathway for the virus to reach the brain after replication in the nasal mucosa. To investigate the role of the olfactory route in the pathogenesis of neurological infection, a technique of transfrontal craniotomy for ablation of the main olfactory bulbs (MOBs), using the eyes as the anatomic reference was developed and evaluated. Using this technique, twenty three 30 days-old rabbits were submitted to surgical ablation of the MOBs and subsequently inoculated with BHV-5. After skin, subcutaneous tissue and periosteum incisions, the craniotomy was performed in a point equidistant to the medial corner of the eyes, with a 3 mm drill coupled to a low intensity elyptic drilling machine. The removal of the MOB's tissue was performed by using a number 6 uretral probe coupled to a surgical vaccum pump. The anatomic references used were appropriate in allowing an adequate and easy access to the MOBs. Necropsy performed in three animals after the surgery demonstrated that the surgical procedure was efficient in completely removing the MOB tissue. This was also demonstrated by the interruption of the access of the virus to the brain after intranasal inoculation: only one animal (1/11) in the bulbectomized group developed neurological infection and disease, against 100% (10/10) of the control group. The transfrontal craniotomy using the eyes as the anatomical reference allowed for an adequate access for localization and removal of the MOBs in rabbits. This techique may be used in studies of viral pathogenesis requiring the complete interruption of the olfactory connection to the brain.

Key words: vaccines, bovine herpesvirus type 1, BoHV-1, bovine viral diarrhea virus, (BVDV), experimental model, guinea pigs.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Vista frontal da cabeça de um coelho mostrando o local da incisão de pele (linha) e o local da craniotomia (ponto)..... 26
- FIGURA 2a – Corte sagital da cabeça de um coelho submetido à ablação cirúrgica dos bulbos olfatórios. Observa-se o local da craniotomia e da cavidade antes ocupada pelos bulbos olfatórios (seta)..... 27
- FIGURA 2b – Desenho esquemático do corte sagital da cabeça de um coelho submetido à ablação cirúrgica dos bulbos olfatórios. Observa-se o local da craniotomia e da cavidade antes ocupada pelos bulbos olfatórios (seta)..... 27

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1 – Tratamentos e resumo do curso clínico em coelhos submetidos ou não a bulbectomia e inoculados com herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5)..... | 25 |
|---|----|

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 9 |
| 2. CAPÍTULO 1. ABLAÇÃO CIRÚRGICA DOS BULBOS OLFATÓRIOS EM COELHOS: MODELO PARA ESTUDOS DE PATOGENIA DE INFECÇÕES POR VÍRUS NEUROTROPICOS | 12 |
| Resumo..... | 13 |
| Abstract..... | 13 |
| Introdução..... | 15 |
| Material e Métodos..... | 17 |
| Resultados e discussão..... | 19 |
| Fontes de aquisição..... | 22 |
| Referências..... | 22 |
| 3. REFERÊNCIAS | 28 |

1. INTRODUÇÃO

O sistema olfatório localiza-se na parte mais rostral do encéfalo e compreende os Bulbos Olfatórios (BOs) e os nervos olfatórios, sendo responsável por proporcionar a sensação de odor (CHRISMAN, 1985). As terminações sensoriais olfatórias estão distribuídas pelo epitélio da membrana mucosa da concha nasal. As células olfatórias formam um plexo na submucosa e são agrupadas em numerosos nervos que passam através das aberturas na placa crivosa do osso etmóide como nervos olfatórios. Essas fibras nervosas terminam fazendo sinapse com neurônios dos bulbos olfatórios projetando-se dentro do hipotálamo e em outras partes do sistema límbico para produzir uma resposta comportamental apropriada ao olfato (regulação do consumo de alimentos, comportamento materno, sexual e social) (GANDELMAN et al., 1972; LEONARD, 1972; SEEGAL & DENENBERG, 1974; GETTY, 1975; MEGUID et al., 1997; GONZALEZ-MARISCAL et al., 2003).

Vários vírus animais se utilizam de fibras nervosas para se disseminar a partir dos sítios de replicação primária e atingir o Sistema Nervoso Central (SNC). Esse tipo de disseminação viral foi inicialmente demonstrado por Pasteur para o vírus da raiva e, posteriormente para outros vírus. Dentre os vírus animais que utilizam a via nervosa para invadir o encéfalo e causar doença neurológica se incluem o herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5), o vírus da doença de Aujeszky (PRV), o herpesvírus eqüino (EHV), o vírus da raiva e os vírus da encefalite eqüina venezuelana (VEEV). (STROOP et al., 1984; BABIC et al., 1994; CARD et al., 1994; LEE et al., 1999).

O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) é um importante vírus de bovinos e tem sido associado a surtos de meningoencefalite de repercussões econômicas significativas. A patogenia da infecção neurológica pelo BoHV-5 envolve a replicação primária na mucosa respiratória seguida pelo transporte do vírus ao longo de fibras nervosas até o SNC. A partir daí, o vírus se dissemina, replica e produz infecção neurológica (LEE et al., 1999). Duas vias nervosas principais têm sido implicadas no transporte do vírus até o encéfalo: a via trigeminal, através de ramos sensoriais do nervo trigêmeo; e a via olfatória, através das fibras dos nervos olfatórios que inervam a mucosa olfatória (CARD et al., 1994; BABIC et al., 1994). A

importância de cada uma destas vias na patogenia da infecção tem sido objeto de vários estudos, pois pode fornecer importantes informações acerca da habilidade do vírus em utilizar diferentes vias nervosas para se disseminar no organismo. Neste sentido, a interrupção cirúrgica se constitui em uma abordagem objetiva para se determinar a real importância destas vias no transporte do vírus até o encéfalo.

A neurocirurgia tem sido muito utilizada para o estudo da patogenia de vírus neurotrópicos. A neurectomia de fibras supostamente envolvidas no transporte de vírus tem auxiliado no entendimento dos mecanismos e das vias utilizadas por estes vírus para se disseminar pelo organismo. Em especial, a patogenia da infecção aguda e latente pelo vírus do herpes simplex humano (HSV-1) tem sido estudada com o auxílio da neurocirurgia em modelos animais (WALZ et al., 1974; PRICE & SCHMITZ, 1978; HILL et al., 1983; SHIMEID et al., 1987; CLEMENTS & SUBAK-SHARPE, 1988; TENSER et al., 1988).

A ablação cirúrgica dos BOs (bulbectomia) tem tido grandes aplicabilidades no estudo de aspectos fisiológicos e comportamentais de diversas espécies animais. Ratos bulbectomizados têm sido utilizados como modelo de depressão psíquica (SONG & LEONARD, 2005), em estudos comparativos dos efeitos bioquímicos e comportamentais da depressão entre animais jovens e adultos (SLOTKIN et al., 1999) e também na regulação do consumo alimentar (MEGUID et al., 1997). A habilidade e comportamento materno em coelhas e camundongas (GANDELMAN et al., 1972; GONZALEZ-MARISCAL et al., 2003) além de ovelhas e cabras (BALDWIN & SHILLITO, 1974; ROMEYER et al., 1994) também tem sido objeto de estudo com auxílio desta técnica cirúrgica além do estudo da regeneração axonal e sináptica em camundongos (GRAZIADEI et al., 1978), e canibalismo em camundongos e hamsters (LEONARD, 1972; SEEGAL & DENENBERG, 1974).

A via trigeminal de conexão entre a mucosa nasal e o encéfalo é composta pelas fibras dos neurônios pseudounipolares (ou bipolares) cujas terminações se distribuem sob a mucosa respiratória e cujos corpos neuronais se situam no gânglio trigêmeo (GT). Além destas, as fibras sensoriais do ramo oftálmico do nervo trigêmio que se distribuem na mucosa do saco conjuntival podem servir de via de transporte para o vírus atingir o GT e daí se disseminar pelo encéfalo (BABIC et al., 1994; CARD et al., 1994). A abordagem cirúrgica com o objetivo de interromper esta via (nervo trigêmeo) seria complexa e dificilmente resultaria na interrupção

completa das conexões neurais que interligam esta região ao encéfalo. Por isto optou-se, nesta pesquisa, pela interrupção cirúrgica da via olfatória (bulbectomia).

Embora a remoção dos bulbos olfatórios (bulbectomia) venha sendo largamente utilizada, não há, na literatura consultada, descrição minuciosa desta técnica operatória em coelhos. Logo, este estudo teve como objetivo desenvolver e avaliar uma técnica de bulbectomia total bilateral em coelhos mediante a craniotomia transfrontal, tendo como referência as órbitas oculares.

2. CAPÍTULO 1

Ablação cirúrgica dos bulbos olfatórios em coelhos: Modelo para estudos de patogenia de infecções por vírus neurotrópicos.

Surgical ablation of the olfactory bulb in rabbits: a model to study the pathogenesis of neurotropic virus infections.

Erika Toledo da Fonseca¹, Alexandre Mazzanti^{2*}

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

²Departamento de Clínica de Pequenos Animais (DCPA), UFSM, Santa Maria, RS, Brasil. * Autor para correspondência: E-mail: mazzal@smail.ufsm.br

Ablação cirúrgica dos bulbos olfatórios em coelhos: Modelo para estudos de patogenia de infecções por vírus neurotrópicos.

Surgical ablation of the olfactory bulb in rabbits: a model to study the pathogenesis of neurotropic virus infections.

Erika Toledo da Fonseca¹, Alexandre Mazzanti^{2*}.

RESUMO

Coelhos têm sido utilizados como modelo para o estudo da neuropatogenia da infecção pelo herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5), um importante agente de doença neurológica em bovinos. O sistema olfatório tem sido apontado como a principal via de acesso do vírus ao cérebro após replicação na cavidade nasal. Para investigar a importância da via olfatória na patogenia da infecção neurológica pelo BHV-5, foi elaborada e avaliada técnica operatória de craniotomia transfrontal para remoção dos bulbos olfatórios (BOs), definindo-se as órbitas como referência anatômica. Foram utilizados 45 coelhos com 30 a 40 dias de idade, sendo 23 submetidos à ablação cirúrgica dos BOs e posteriormente inoculados pela via intranasal (IN) ou no saco conjuntival (IC) com o BHV-5. Após incisões de pele, tecido subcutâneo e periósteo, a craniotomia foi realizada em um ponto equidistante entre os cantos mediais dos olhos, com uma broca sulcada de 3mm acoplada a uma perfuratriz elétrica de baixa rotação. A remoção dos BOs foi

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

² Departamento de Clínica de Pequenos Animais (DCPA), UFSM.

* Autor para correspondência: DCPA/CCR/UFSM. 97105-900 Santa Maria, RS. E-mail: mazzal@smail.ufsm.br

realizada com uma sonda uretral nº6 acoplada a um aspirador. O estudo macroscópico de três animais após a cirurgia comprovou que o procedimento foi eficiente na remoção total dos BOs. Isso também foi comprovado pela interrupção do acesso do vírus ao córtex cerebral: apenas um animal (1/11 ou 9,1%) no grupo submetido à ablação dos BOs com inoculação IN desenvolveu enfermidade neurológica, contra 100% (10/10) dos coelhos controle. Conclui-se que a técnica de craniotomia transfrontal utilizando a órbita como referência anatômica permite o acesso adequado para localização e remoção dos BOs e pode ser utilizada em estudos de patogenia de infecções por vírus neurotrópicos que exijam a interrupção completa da via olfatória.

Palavras-chave: herpesvírus bovino tipo 5, BHV-5, bulbo olfatório, cirurgia, modelo experimental, coelhos.

ABSTRACT

Rabbits have been used as animal models to study the pathogenesis of neurological infection by bovine herpesvirus type 5 (BHV-5), an important agent of meningoencephalitis in cattle. The olfactory system has been implicated as the main pathway for the virus to reach the brain after replication in the nasal mucosa. To investigate the role of the olfactory route in the pathogenesis of neurological infection, a technique of transfrontal craniotomy for ablation of the main olfactory bulbs (MOBs), using the eyes as the anatomic reference was developed and evaluated. Using this technique, twenty three 30 days-old rabbits were submitted to surgical ablation of the MOBs and subsequently inoculated with BHV-5. After skin, subcutaneous tissue and periosteum incisions, the craniotomy was performed in a point equidistant to the medial corner of the eyes, with a 3 mm drill coupled to a low intensity elliptic drilling machine. The removal of the MOB's tissue was performed by using a number 6 uretral probe coupled to a surgical vacuum pump. The anatomic references used were appropriate in allowing an adequate and easy access

to the MOB. Necropsy performed in three animals after the surgery demonstrated that the surgical procedure was efficient in completely removing the MOB tissue. This was also demonstrated by the interruption of the access of the virus to the brain after intranasal inoculation: only one animal (1/11) in the bulbectomized group developed neurological infection and disease, against 100% (10/10) of the control group. The transfrontal craniotomy using the eyes as the anatomical reference allowed for an adequate access for localization and removal of the MOB in rabbits. This technique may be used in studies of viral pathogenesis requiring the complete interruption of the olfactory connection to the brain.

Key words: bovine herpesvirus 5, BHV-5, olfactory bulbs, surgery, experimental model, rabbits.

INTRODUÇÃO

O sistema olfatório desempenha funções importantes na fisiologia e comportamento dos mamíferos. Além da importância da sensação de odor, a olfação também exerce influência na regulação do consumo de alimentos e interfere no comportamento social, sexual e materno (GANDELMAN et al., 1972; LEONARD, 1972; SEEGAL & DENENBERG, 1974; MEGUID et al., 1997; GONZALEZ-MARISCAL et al., 2003). Os neurônios receptores do sistema olfatório localizam-se no epitélio olfatório da mucosa nasal, onde seus dendritos estão em contato com o meio externo. Esses neurônios emitem numerosos filamentos, que em conjunto formam o nervo olfatório, e passam através de perfurações na lâmina cribiforme do osso etmóide convergindo para os bulbos olfatórios (BOs) onde fazem sinapse (FRISCH, 1967; LOHMAN & LAMMERS, 1967). Os axônios dos neurônios dos BOs conectam-se ao córtex através do trato olfatório, de onde projetam-se para várias regiões do cérebro onde as sensações olfatórias são processadas (JENKINS, 1978; BROADWELL, 1975; FRISCH, 1967). Os BOs de coelhos possuem uma forma elíptica e localizam-se rostralmente ao encéfalo, em recessos do osso etmóide

situados em cada lado da linha mediana (BROADWELL, 1975).

Vírus neurotrópicos como o do herpes simplex (HSV), da raiva (RV) e da pseudorraiva (PRV) utilizam fibras nervosas que se distribuem na mucosa nasal para invadir e replicar no sistema nervoso central (SNC) causando doença neurológica (STROOP et al., 1984; LAFAY et al., 1991; BABIC et al., 1994). O herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5) é um alfa herpesvírus associado com meningoencefalite de curso geralmente fatal em bovinos (ROIZMAN, 1992). A exemplo de outros vírus neurotrópicos, o BHV-5 parece utilizar as vias olfatória e/ou trigeminal para invadir o encéfalo a partir da cavidade nasal. Em coelhos utilizados como modelo, o BHV-5 atinge o SNC mais precoce e massivamente através da via olfatória, porém a via trigeminal também parece contribuir para o transporte do vírus (CHOWDHURY et al., 1997; LEE et al., 1999; BELTRÃO et al., 2000; DIEL et al., 2005). A determinação das vias de invasão viral do SNC é fundamental para o entendimento da patogenia e para a elaboração de estratégias de controle e/ou tratamento de infecções herpéticas humanas e de animais.

A ablação cirúrgica dos BOs (bulbectomia) tem sido utilizada para se estudar vários aspectos fisiológicos e comportamentais de animais, dentre esses a habilidade e comportamento materno em coelhas e camundongas (GANDELMAN et al., 1972; GONZALEZ-MARISCAL et al., 2003), regeneração axonal e sináptica em camundongos (GRAZIADEI et al., 1978), regulação do consumo alimentar em ratos (MEGUID et al., 1997) e canibalismo em hamsters e camundongos (LEONARD, 1972; SEEGAL & DENENBERG, 1974). A cirurgia também já foi utilizada para se estudar o comportamento materno de ovelhas e cabras (BALDWIN & SHILLITO, 1974; ROMEYER et al., 1994).

Apesar das diversas aplicabilidades desta intervenção cirúrgica, não há padronização ou pontos anatômicos de referência para realização da técnica operatória. O presente estudo teve como objetivo desenvolver uma técnica de craniotomia transfrontal para remoção dos BOs de coelhos, utilizando-se as

órbitas como referência anatômica, avaliando o modelo no estudo da patogenia de infecção viral quanto ao desenvolvimento de sinais clínicos neurológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e desenho experimental

O estudo foi desenvolvido no laboratório de Cirurgia Experimental e no Setor de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria. Foram utilizados coelhos da raça Nova Zelândia, machos e fêmeas, recém- desmamados, com idade entre 30 e 40 dias, pesando entre 700g e 1,1kg. De um total de 45 coelhos, 23 foram submetidos à bulbectomia; os demais permaneceram como controles (22). Seis dias após a intervenção cirúrgica, os animais bulbectomizados e os controles foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos cada e inoculados com o BHV-5 pela via intranasal (IN) ou conjuntival (IC).

Pré-operatório e procedimento cirúrgico

O pré-operatório constou de jejum alimentar de seis horas. Como medicação pré-anestésica utilizou-se cloridrato de cetamina^a (25mg/kg) associado ao cloridrato de xilazina^b (5mg/kg), administrados pela via intramuscular. A tricotomia foi realizada na região frontal da cabeça, estendendo-se caudalmente desde o focinho até a base das orelhas.

Canulou-se a veia marginal de uma das orelhas com cateter nº 24 e por esta via administrou-se ampicilina sódica^c (20mg/kg) como terapia antibiótica profilática e butorfanol^d como terapia analgésica (0,2mg/kg). A anestesia foi mantida com cloridrato de cetamina (10mg/kg) associado ao cloridrato de xilazina (3mg/kg) por esta via. Após o posicionamento em decúbito esternal, procedeu-se a antisepsia da região tricotomizada, observando-se a seqüência álcool-iodo-álcool. Em seguida a pele, tecido subcutâneo e periósteo sofreram duas incisões paralelas, iniciadas a aproximadamente 0,5cm dorsal ao canto lateral dos olhos e estendidas ventralmente, terminando a 0,5cm do canto medial. Em seguida, as

incisões foram unidas ventralmente por outra transversal, tornando-a em forma de “U”. A craniotomia foi realizada na linha mediana, em ponto equidistante entre os cantos mediais dos olhos, com a utilização de uma broca sulcada de 3mm, acoplada a uma perfuratriz elétrica de baixa rotação. Posteriormente procedeu-se a remoção dos BOs por aspiração. Para isso, utilizou-se uma sonda uretral nº6 acoplada a um aspirador, inserida na abertura em ângulo de 90° até atingir o assoalho da cavidade craniana e movida rostralmente até atingir o limite caudal da cavidade nasal. Após a aspiração completa dos BOs, o periósteo e a pele foram aproximados individualmente com sutura isolada simples, empregando fio mononáilon 5-0. No período pós-operatório foi administrada dexametasona^o (2mg/kg), via intravenosa e em dose única, e procedeu-se a limpeza diária da ferida cirúrgica até a retirada dos pontos de pele, seis dias após a intervenção cirúrgica. Os animais foram transferidos para o Setor de Virologia no dia seguinte, onde foram mantidos em alojamentos coletivos (quatro a seis animais) recebendo ração comercial balanceada e água *ad libitum*.

Vírus, inoculação e monitoramento clínico.

Seis dias após o ato operatório, os animais bulbectomizados (n=23) e os controles (n=22) foram distribuídos em dois grupos cada e inoculados com o BHV-5, de acordo com a tabela 1. Grupo A (n=11): bulbectomizados, inoculados pela via intranasal (IN); grupo B (n=12): bulbectomizados, inoculados pela via conjuntival (IC); grupo C (n=10): controles (não submetidos ao procedimento), inoculados pela via IN; grupo D (n=12): controles, inoculados pela via IC. Os animais foram inoculados com 1ml do sobrenadante de cultivos celulares infectados com uma cepa brasileira do BHV-5 (SV-507; DELHON et al., 2003), contendo $10^{8.3}$ doses infectantes para 50% dos cultivos (DICC₅₀/ml). Após a inoculação, os coelhos foram monitorados clinicamente com três observações diárias de uma hora cada, durante 20 dias. As taxas de morbidade, mortalidade e o curso clínico da enfermidade neurológica (depressão, bruxismo, opistótono, andar em círculos e convulsões) nos animais dos diferentes grupos foram registrados e

comparados. Em um experimento piloto, três animais foram submetidos à intervenção cirúrgica e dois dias após foram submetidos à eutanásia e necrópsia para verificar se o procedimento fora eficaz na remoção total dos BOs. Todos os procedimentos com os animais foram realizados estritamente de acordo com as normas do COBEA (lei número 6.638 de 8 de maio de 1979).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização das órbitas como referência anatômica para a craniotomia transfrontal demonstrou ser adequada para a localização e acesso aos bulbos olfatórios (BOs) (Figura 1). A técnica operatória mostrou-se efetiva e de fácil execução, com um tempo cirúrgico que variou de 15 a 35 minutos por animal. A realização da intervenção cirúrgica preliminarmente em três coelhos, para a padronização da técnica, com necropsias realizadas posteriormente, demonstrou que o tecido dos BOs foi totalmente removido pelo procedimento. A remoção dos BOs resultou em cavidades bilaterais, alongadas, situadas entre a lâmina crivosa do osso etmóide e o encéfalo.

Os BOs de coelhos possuem forma elíptica (definida pela cavidade onde se encontram alojados) e são constituídos de tecido mole que fragmenta-se facilmente ao ser manipulado ou contido por pinças ou outros instrumentais cirúrgicos. Por isso optou-se pela aspiração do tecido, utilizando-se uma sonda uretral acoplada a um aspirador. Pela utilização da sonda também evitou-se de efetuar uma abertura maior na caixa craniana, como relatada anteriormente (BELTRÃO et al., 2000). Além de resultar em trauma menor, a abertura limitada realizada com a broca sulcada de 3mm de diâmetro, foi suficiente para a introdução da sonda e aspiração dos BOs (Figura 2). Após a remoção/aspiração da massa principal dos BOs, procedeu-se a aspiração cuidadosa do assalho da cavidade, para remover restos teciduais que eventualmente tenham ficado aderidos à lâmina óssea. Procedimento semelhante, porém utilizando pipetas de *pasteur* foi utilizado para estudar o efeito da remoção dos bulbos olfatórios acessórios no

comportamento materno em coelhas primíparas. A técnica utilizada, no entanto, não foi descrita em detalhes (GONZALEZ-MARISCAL et al., 2003).

O período pós-operatório decorreu sem maiores ocorrências. Um coelho removeu a sutura de pele no terceiro dia de pós-operatório, tendo a cicatrização ocorrida por segunda intenção. Nos animais restantes, a sutura de pele foi removida entre o quarto e sexto dia de pós-operatório. Durante o intervalo de seis dias antes da inoculação do vírus, nenhum animal evidenciou sinal de dor ou desconforto como apatia, inapetência ou hipersensibilidade na ferida cirúrgica; o consumo de ração ficou levemente aumentado, o mesmo sendo observado com relação ao consumo de água. Não foram observadas alterações de comportamento (ex:canibalismo) ocasionalmente observadas em outras espécies submetidas à bulbectomia (LEONARD, 1972; SEEGAL & DENENBERG, 1974). No trabalho realizado por BELTRÃO et al. (2000), foi observada alteração de seletividade alimentar, com alguns animais bulbecomizados alimentando-se de pedaços de papel utilizados para forrar as gaiolas. Por essa razão no presente experimento evitou-se deixar qualquer material ao acesso dos animais, com exceção do alimento e água.

Pelo número limitado de animais que se dispunha, não foi possível reservar-se um grupo de coelhos bulbectomizados sem inoculação do vírus. Esse grupo serviria para se avaliar possíveis alterações clínicas causadas por complicações (infecções/processo inflamatório) neurológicas derivadas do procedimento cirúrgico e complicações pós-cirúrgicas. Com o decorrer do experimento esse grupo controle demonstrou ser desnecessário, pois os animais do grupo A (bulbectomizados e inoculados) não apresentaram quaisquer complicações pós-cirúrgicas. O único animal desse grupo que apresentou alterações foi o que desenvolveu enfermidade neurológica característica da infecção pelo BHV-5, confirmada pelo isolamento do vírus do cérebro (DIEL et al., 2005). Portanto, o procedimento cirúrgico e remoção dos BOs em si não resultaram em complicações/alterações clínico-patológicas detectáveis.

A remoção total do tecido dos BOs e a conseqüente interrupção da via olfatória constituem-se em pontos críticos para a utilização desses animais em estudos virológicos dessa natureza. Em trabalho anterior, vários coelhos submetidos à ablação dos BOs e inoculados com o BHV-5 desenvolveram infecção neurológica com período de incubação e curso clínico compatível com a invasão pela via olfatória (BELTRÃO et al., 2000). Como a técnica utilizada naquele estudo não foi posteriormente avaliada para assegurar-se da remoção total dos BOs, é provável que a remoção tenha sido parcial, sem interrupção da conexão olfatória entre o epitélio olfatório e o encéfalo (BROADWELL, 1975). A integridade, pelo menos parcial dessa conexão, provavelmente tenha servido para o BHV-5 invadir o cérebro e causar doença neurológica nos animais (BELTRÃO et al., 2000; DIEL et al., 2005). Da mesma forma, tem sido demonstrado que interrupções da via olfatória através de neurectomia podem ser seguidas de regeneração neuronal e reconstituição da via nervosa em camundongos recém-nascidos (GRAZIADEI et al., 1978). Essas observações também justificam a estratégia para a interrupção da via olfatória utilizada no presente experimento, ou seja, a remoção completa dos BOs. A regeneração da via olfatória a partir das extremidades neurais proximal e distal produzidas pelo procedimento utilizado, e em curto espaço de tempo, seria altamente improvável.

No presente estudo, os resultados da inoculação do BHV-5 indicam que a interrupção da via olfatória foi completa, impedindo o vírus de invadir o cérebro por essa via (DIEL et al., 2005). O único animal bulbectomizado que desenvolveu doença neurológica (1/11) apresentou sinais clínicos tardios (17 dias pós-inoculação), ao contrário dos controles não-bulbectomizados que apresentaram período de incubação médio de 7,5 dias. O longo período de incubação da infecção neurológica nesse animal indica que o vírus invadiu o cérebro por outra via, que não a olfatória. Para assegurar-se disso, realizou-se um experimento adicional, no qual coelhos bulbectomizados (grupo B) ou não (grupo D) foram inoculados com o BHV-5 pela via conjuntival (Tabela 1). A replicação do vírus na mucosa conjuntival é seguida de

transporte do BHV-5 pelo ramo oftálmico do nervo trigêmeo ao cérebro, resultando em doença neurológica de curso tardio (CHOWDHURY et al., 1997; BELTRÃO et al., 2000). Corroborando esse achado, os animais inoculados pela via conjuntival (grupos B e D) apresentaram período de incubação e curso semelhantes ao animal do grupo A (Tabela 1). Em resumo, tanto os achados da necropsia realizada em alguns animais bulbectomizados, como os achados virológicos indicam que a técnica foi efetiva na interrupção completa da via olfatória. Esses resultados permitem a recomendação dessa técnica para estudos que necessitem a interrupção da via olfatória para estudos de patogenia de infecções por vírus neurotrópicos. Estudos em andamento visam à interrupção das duas vias principais de acesso ao cérebro (olfatória e trigeminal), a fim de investigar-se vias alternativas de acesso (e.g. outras vias nervosas ou via hematogena).

Agradecimentos: Ao Diretor do Biotério Central da UFSM, Médico Veterinário Silvandro Noal pela cedência e alojamento dos animais durante parte do experimento. Aos bolsistas de iniciação científica pelo auxílio com a manipulação e monitoramento dos animais. Ao CNPq pelos recursos e bolsas (E.F.F. [301666/2004-0] e R.W. [301339/2004-0]) são bolsistas PQ do CNPq.

FONTES DE AQUISIÇÃO

- ^a Dopalen. Agribrands Purina do Brasil Ltda. Paulínia – SP.
- ^b Anasedan. Agribrands Purina do Brasil Ltda. Paulínia – SP.
- ^c Ampicilina Sódica. Rambaxy Farmacêutica Ltda. São Paulo – SP.
- ^d Torbugesic. Fort Dodge Saúde Animal Ltda. Campinas – SP.
- ^e Azium solução Injetável. Indústria Química e Farmacêutica Schering-Plough S.A. Rio de Janeiro – RJ.

REFERÊNCIAS

BABIC, N. et al. Propagation of pseudorabies virus in the central nervous system of the mouse after intranasal inoculation. **Virology**, v. 204, p.616-625, 1994.

BALDWIN, B.; SHILLITO, E. G. The effects of ablation of the olfactory bulbs on parturition and maternal behavior in Soay sheep. **Animal Behaviour**, v.22, p.220-223, 1974.

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

BROADWELL, R. B. Olfactory relationships of the telencephalon and diencephalons in the rabbit. I. An autoradiographic study of the efferent connections of the main and accessory olfactory bulbs. **Journal of Comparative Neurology**, v.163, p. 329-345,1975.

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

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

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

FRISCH, D. Ultrastructure of mouse olfactory mucosa. **American Journal of Anatomy**, v.121, p.87-120, 1967.

GANDELMAN, R. et al. Reproductive and maternal performance in the mouse following removal of the olfactory bulbs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.28, p. 453-456, 1972.

GONZALEZ-MARISCAL, G. et al. Removal of the accessory olfactory bulbs promotes maternal

behavior in virgin rabbits. **Behavior Brain Research**, v.152, p.89-95, 2003.

GRAZIADEI, P. P. C. et al. Regeneration of olfactory axons and synapse formation in the forebrain after bulbectomy in neonatal mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.75, p.5230-5234, 1978.

JENKINS T. **Functional mammalian neuroanatomy**. Lea & Febiger: Philadelphia, p.225,1978.

LAFAY, F. et al.. Spread of the CVS strain of rabies virus and of the avirulent mutant Avo1 along the olfactory pathways of the mouse after intranasal inoculation. **Virology**, v.83, p.320-330, 1991

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

LEONARD, C. M. Effects of neonatal (day 10) olfactory bulb lesions on social behaviour of female golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Journal of Comparative Physiology**, v.80, p.208-215, 1972.

LOHMAN, A.H.; LAMMERS, H.J. On the structure and fibre connections of the olfactory centers in mammals. **In: ZOTTERMAN, Y . (ed.) Sensory mechanisms**. Elsevier: Amsterdam, London and New York, p.65-82, 1967.

MEGUID, M. M. et al.. Acute adaptive changes in food intake pattern following olfactory ablation in rats. **Neuroreport**, v.8, n.6, p.1439-1444, 1997.

ROIZMAN, B. The family Herpesviridae: an update. **Archives of Virology**, v.123, p.425-449, 1992.

ROMEYER, A. et al. Olfaction mediates the establishment of selective bonding in goats. **Physiological Behaviour**, v.56, p. 693-700, 1994.

SEEGAL, R. F.; DENENBERG, V. H. Maternal experience prevents pup-killing in mice induced by peripheral hyposmia. **Physiological Behaviour**, v.13, p. 339-341, 1974.

STROOP, W.G. et al. Localization of herpes simplex virus in the trigeminal and olfactory system of the mouse central nervous system during acute and latent infection by *in situ* hybridization. **Laboratory Investigation**, v.51, p.27-38, 1984.

Tabela 1. Tratamentos e resumo do curso clínico em coelhos submetidos ou não a bulbectomia e inoculados com o herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5).

| Grupo | Tratamento | Via de inoculação ^a | Número | Doença neurológica N (%) | Início dos sinais dpi ^b (média) |
|-------|-------------|--------------------------------|--------|-----------------------------|---|
| A | Bulbectomia | IN | 11 | 1 (9,1%) | 17 |
| B | Bulbectomia | IC | 12 | 10 (83,3%) | 9-15 (12,7) |
| C | Controle | IN | 10 | 10 (100%) | 5-10 (7,5) |
| D | Controle | IC | 12 | 10 (83,3%) | 11-20 (15,3) |

^aIN:intranasal; IC:conjuntival.

^b Dias pós-inoculação.

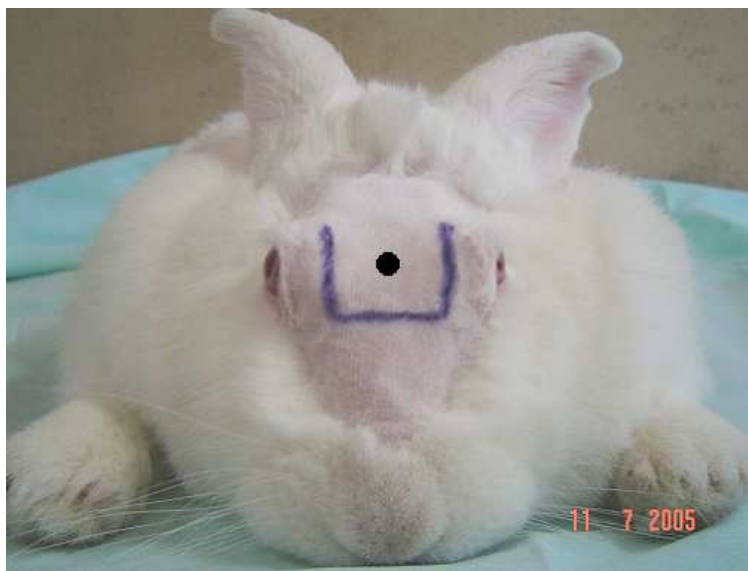


Figura 1: Vista frontal da cabeça de um coelho mostrando o local da incisão de pele (linha) e o local da craniotomia (ponto)

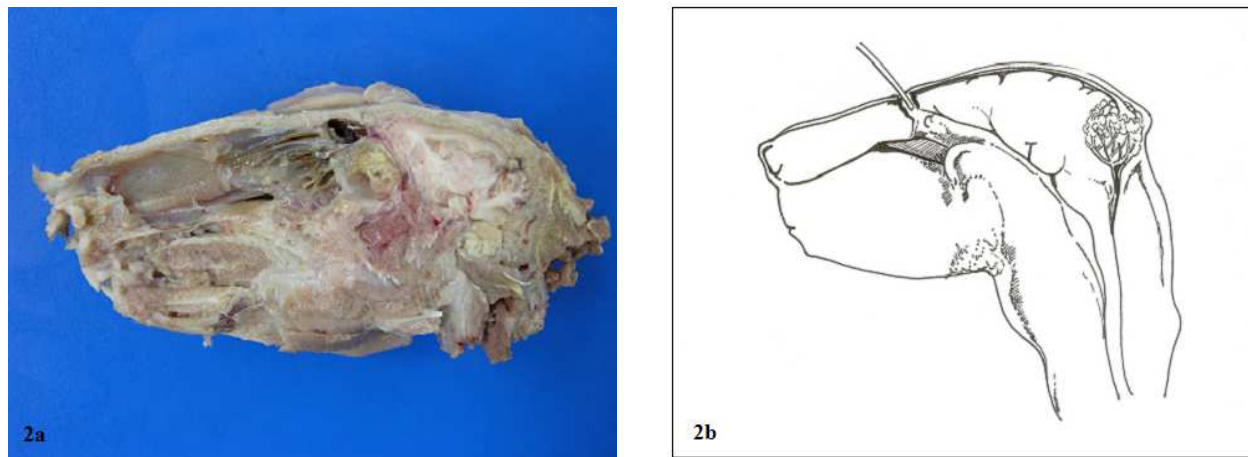


Figura 2a: Corte sagital da cabeça de um coelho submetido à ablação cirúrgica dos bulbos olfatórios. Observa-se o local da craniotomia e da cavidade antes ocupada pelos bulbos olfatórios (seta).

Figura 2b: Desenho esquemático do corte sagital da cabeça de um coelho submetido à ablação cirúrgica dos bulbos olfatórios. Observa-se o local da craniotomia e da cavidade antes ocupada pelos bulbos olfatórios (seta).

3. REFERÊNCIAS

BABIC, N. et al. Propagation of pseudorabies virus in the central nervous system of the mouse after intranasal inoculation. **Virology**, v. 204, p. 616-625, 1994.

BALDWIN, B.; SHILLITO, E. G. The effects of ablation of the olfactory bulbs on parturition and maternal behavior in Soay sheep. **Animal Behavior**, v. 22, p. 220-223, 1974.

CARD J. P., RINAMAN L., SCHWABER J.S., MISELIS R.R., WHEALY M.E., ROBBINS A.K. & ENQUIST L.W. Neurotropic properties of pseudorabies virus: transneuronal passage in the rat central nervous system. **J. Neurosci.** v. 10, p. 1974-1994, 1994

CHRISMAN, C. L. **Neurologia dos pequenos animais**. 1. ed. São Paulo: Roca, 1985. 432 p.

CLEMENS, G.B & SUBAK-SHARPE, J.H. Herpes simplex virus type 2 establishes latency in the mouse footpad. **Journal of General Virology**. v. 69, p. 375-383, 1988.

GANDELMAN, R. et al. Reproductive and maternal performance in the mouse following removal of the olfactory bulbs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 28, p. 453-456, 1972.

GETTY, R. Anatomia dos animais domésticos. In: _____. **Generalidades sobre o sistema nervoso**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1975. cap. 13, p. 168-206.

GONZALEZ-MARISCAL, G. et al. Removal of the accessory olfactory bulbs promotes maternal behavior in virgin rabbits. **Behavior Brain Research**, v. 152, p. 89-95, 2003.

GRAZIADEI, P. P. C. et al. Regeneration of olfactory axons and synapse formation in the forebrain after bulbectomy in neonatal mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 75, p. 5230-5234, 1978.

HILL, T.J. et al. Recurrence of herpes simplex in the mouse requires an intact nerve supply to the skin. **Journal of General Virology**. v. 64, p. 2763-2765, 1983.

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

LEONARD, C. M. Effects of neonatal (day 10) olfactory bulb lesions on social behaviour of female golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Journal of Comparative Physiology**, v. 80, p. 208-215, 1972.

MEGUID, M. M. et al.. Acute adaptive changes in food intake pattern following olfactory ablation in rats. **Neuroreport**, v. 8, n. 6, p. 1439-1444, 1997.

PRICE & SCHMITZ. Reactivation of latent herpes simplex virus infection of the autonomic nervous system by postganglionic neurectomy. **Infection and Immunity**. v. 19, p. 523-532, 1978.

ROMEYER, A. et al. Olfaction mediates the establishment of selective bonding in goats. **Physiological Behaviour**, v. 56, p. 693-700, 1994.

SEEGAL, R. F.; DENENBERG, V. H. Maternal experience prevents pup-killing in mice induced by peripheral hyposmia. **Physiological Behaviour**, v. 13, p. 339-341, 1974.

SHIMEID C. et al. Spread of HSV-1 to the mouse eye after inoculation in the skin of the snout requires an intact nerve supply to the inoculation site. **Current Eyes Research**. v. 6, p. 9-12, 1987.

SLOTKIN, T.A. et al. Modeling geriatric depression in animals: biochemical and behavioral effects of olfactory bulbectomy in young versus aged rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapy**. v. 289, p. 334-345, 1999.

SONG, C., LEONARD, B. E. The olfactory bulbectomised rat as a model of depression. **Neuroscience and Behavioral Reviews**. v. 29, p. 627-647, 2005.

STROOP, W.G. et al. Localization of herpes simplex virus in the trigeminal and olfactory system of the mouse central nervous system during acute and latent infection by *in situ* hybridization. **Laboratory Investigation**, v. 51, p. 27-38, 1984.

TENSER, R.B, ELLIS, W.A, HAY, K.A. Herpes simplex virus latent infection: reactivation and elimination of latency after neurectomy. **Virology**. v. 167, p. 302-305, 1988.

WALZ, M.A, PRICE, R.W, NOTKINS, A.L. Latent ganglionic infection with herpes simplex virus types 1 and 2: viral reactivation in vivo after neurectomy. **Science**. v. 184, p. 1185-1187, 1974.