

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

**INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Herpesvírus bovino*
tipo 5 EM COELHOS: EFEITOS NO SISTEMA
PURINÉRGICO E PERFIL OXIDATIVO**

TESE DE DOUTORADO

Cássia Bagolin da Silva

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

**INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Herpesvírus bovino tipo 5*
EM COELHOS: EFEITOS NO SISTEMA PURINÉRGICO E
PERFIL OXIDATIVO**

Cássia Bagolin da Silva

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

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sonia Terezinha dos Anjos Lopes

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

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

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

**INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Herpesvírus bovino* tipo 5 EM
COELHOS: EFEITOS NO SISTEMA PURINÉRGICO E PERFIL
OXIDATIVO**

elaborada por
Cássia Bagolin da Silva

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

Comissão Examinadora:

Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Marta Lizandra Rego Leal, Dr^a. (UFSM)

Jessié Martins Gutierrez, Dr. (UFSM)

Patricia Wolkmer, Dr^a. (UNICRUZ)

Micheli Mainardi Pillat, Dr^a. (USP)

Santa Maria, 12 de fevereiro de 2015.

AGRADECIMENTOS

À minha família, principalmente meus pais Irbene e Ademar, meu irmão Roger e minhas tias Diva e Ilsa, pelo amor, apoio e carinho em todos os momentos. Amo vocês.

À professora Sonia, minha orientadora, por todos os anos de convivência, todos os ensinamentos, atenção e dedicação; a minha gratidão.

À minha co-orientadora, professora Cinthia, pela disponibilidade e contribuição para a realização deste trabalho.

Aos alunos de iniciação científica Camila Minuzzi, Camila Benaduce, Cássio Bandeira e Débora Rosolen, pela dedicação na realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas dos laboratórios LACVet e BioOx, pelos momentos compartilhados, pela amizade e ajuda em todos os momentos necessitados.

Às minhas colegas e grandes amigas Patrícia Wolkmer e Francine Paim pelo companheirismo, pelos ensinamentos e pela amizade durante todos esses anos.

À Capes, pela bolsa concedida.

Aos amigos e a todas as pessoas que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho; a minha gratidão.

RESUMO

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

INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Herpesvírus bovino tipo 5* EM COELHOS: EFEITOS NO SISTEMA PURINÉRGICO E PERFIL OXIDATIVO

AUTORA: CÁSSIA BAGOLIN DA SILVA
ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. FERNANDA SILVEIRA FLORES VOGEL
COORIENTADORA: PROF^a. DR^a. SONIA TEREZINHA DOS ANJOS LOPES
Santa Maria, 12 de fevereiro de 2015.

A doença neurológica causada pela replicação do BoHV-5 no cérebro de animais infectados, em sua fase inicial, pode não estar associada à alterações histológicas significativas ou à um número significativo de neurônios antígeno-positivos. Assim, outros mecanismos, como os mecanismos oxidantes e antioxidantes e importantes enzimas do sistema purinérgico, poderiam modular a resposta imune e inflamatória em animais infectados pelo *herpesvírus bovino* tipo 5 (BoHV-5) e contribuir para o desenvolvimento dos sinais neurológicos observados durante a infecção. Com este trabalho buscou-se compreender mecanismos da neuropatogenia do BoHV-5 durante infecção aguda. Para isso, no artigo I, foram avaliadas alterações na hidrólise de nucleotídeos de adenina em sinaptossomas de córtex e hipocampo, de coelhos experimentalmente infectados com BoHV-5, através da atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase; no artigo II, foi avaliada a participação de mecanismos oxidantes e antioxidantes na infecção pelo BoHV-5 em nível sistêmico e de sistema nervoso central de coelhos, através da atividade dos antioxidantes catalase (CAT), glutationa reduzida (GSH) e tióis não-proteicos (TSH) e quantificação de espécies reativas de oxigênio totais (ERO-totais) e as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Para realização dos experimentos, os animais foram divididos em grupos, grupos controle, não infectados, e grupos teste, inoculados com BoHV-5. Os animais dos grupos teste foram inoculados com a cepa parental SV-507/99 contendo aproximadamente $10^{7.5}$ TCID₅₀ ou 10^8 TCID₅₀, os demais animais receberam apenas meio essencial mínimo (MEM). Todos os coelhos foram inoculados pela via intranasal e monitorados quanto aos aspectos clínicos e virológicos durante todo o experimento. Aos 7 e 12 dias p.i. os coelhos foram anestesiados e submetidos à eutanásia para coleta sanguínea e de estruturas encefálicas. Em relação à atividade da NTPDase e 5'-nucleotidase (artigo I), os resultados revelaram uma diminuição na hidrólise do ATP e ADP aos 7 dias p.i., e na hidrólise do ADP e AMP aos 12 dias p.i. em sinaptossomas de córtex cerebral dos animais infectados; e um aumento da atividade ectonucleotidásica em sinaptossomas de hipocampo no grupo infectado em relação ao grupo controle, com exceção da hidrólise do AMP aos 12 dias p.i. A reduzida hidrólise do ATP no córtex cerebral poderia causar acúmulo deste nucleotídeo no meio extracelular, sabe-se que o excesso de ATP pode ser citotóxico. Além disso, com a diminuição da atividade enzimática menos adenosina é produzida, sendo esta uma molécula neuroprotetora e anticonvulsivante. O aumento da atividade enzimática no hipocampo poderia ocorrer para produzir adenosina e conferir neuroproteção, no entanto, aos 12 dias p.i. não ocorreu aumento na hidrólise do AMP à adenosina. No artigo II, a avaliação dos parâmetros oxidativos e antioxidantes revelou que ocorre um aumento nos níveis de TBARS e de ERO-totais no grupo infectado em relação ao grupo controle, principalmente no córtex aos 7 e 12 dias p.i., mas também no cerebelo aos 7 dias p.i. e no hipocampo e estriado aos 12 dias p.i. Ainda, os níveis de GSH estavam diminuídos no estriado e cerebelo dos animais infectados aos 7 dias p.i. O processo de estresse oxidativo pode ocorrer em resposta à infecção viral, porém por ter baixa especificidade acaba resultando em danos oxidativos à célula. Desta forma, foi possível observar que existe uma participação do sistema purinérgico e do processo de estresse oxidativo na patogênese da infecção pelo BoHV-5, sugerindo que estes mecanismos possam estar envolvidos na imunomodulação, disfunção e morte neuronal, contribuindo, assim, para a processo da meningoencefalite herpética.

Palavras-chave: meningoencefalite herpética; ectonucleotidasas; sinaptossomas; lipoperoxidação; estresse oxidativo.

ABSTRACT

Thesis

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

EXPERIMENTAL INFECTION BY *Bovine herpesvirus type 5* IN RABBITS: EFFECTS ON PURINERGIC SYSTEM AND OXIDATIVE PROFILE

AUTHOR: CÁSSIA BAGOLIN DA SILVA

ADVISER: Dr^a. SONIA TEREZINHA DOS ANJOS LOPES

Santa Maria, February 12th, 2015.

The neurological disorder caused by BoHV-5 replication in the brain of infected animals, in the acute phase, may not be associated with significant histological changes or a significant number of antigen-positive neurons. Thus, other mechanisms, such as oxidants and antioxidants mechanisms and important enzymes of the purinergic system might modulate the immune and inflammatory response in animals infected with bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) and contribute to the development of neurological signs observed during infection. This study aimed to understand the mechanisms of the neuropathogenesis of BoHV-5 during acute infection. For this, in article I, alterations in the hydrolysis of adenine nucleotides in synaptosomes of the cortex and hippocampus of rabbits experimentally infected with BoHV-5 were assessed through the activity of enzymes NTPDase and 5'-nucleotidase; in article II, we evaluated the involvement of oxidants and antioxidants mechanisms during BoHV-5 infection in systemic level and central nervous system of rabbits experimentally infected through the evaluation of catalase (CAT), reduced glutathione (GSH) and non-protein thiols (TSH), and the quantitation of reactive oxygen species (ROS) and thiobarbituric acid reactive species (TBARS). For the experiments, the animals were divided into groups, control groups, with no infected animals, and test groups, animals inoculated with BoHV-5. The animals of the test groups were inoculated with the parental strain SV-507/99 containing approximately $10^{7.5}$ TCID₅₀ or 10^8 TCID₅₀, control animals received only minimal essential medium (MEM). All rabbits were inoculated intranasally and monitored for clinical and virological aspects during the experiment. At 7 and 12 days p.i. the rabbits were anesthetized and euthanized for blood and brain structures collection. Regarding the activity of 5'-nucleotidase and NTPDase (Article I), the results showed a decrease in hydrolysis of ATP and ADP at 7 days pi, and in hydrolysis of ADP and AMP at 12 days pi in synaptosomes of cerebral cortex in the infected animals; and increased ectonucleotidases activity in synaptosomes of hippocampus in the infected group compared to the control group, except for the hydrolysis of AMP at 12 days pi. The reduced hydrolysis of ATP in cerebral cortex can cause accumulation of the nucleotide into the extracellular milieu; it is known that the excess of ATP can be cytotoxic. Furthermore, with the decrease in enzyme activity less adenosine is produced, this nucleoside is an anticonvulsant and neuroprotective molecule. The increased enzyme activity in the hippocampus can occur to produce adenosine and confer neuroprotection; however at 12 days pi, it is not observed an increase in the hydrolysis of AMP to adenosine. In article II, the evaluation of oxidative parameters and antioxidants revealed that the levels of TBARS and ROS were higher in the infected group compared to controls, mainly in the cortex at 7 and 12 days pi, but also in the cerebellum at 7 days pi and hippocampus and striatum at 12 days pi. Moreover, GSH levels were decreased in the striatum and cerebellum of animals infected at 7 days pi. The oxidative stress process may occur in response to viral infection, but this process has a low specificity and eventually results in oxidative damage to the cell. Thereby, was possible to observe that there is a participation of the purinergic system and the oxidative stress process in the pathogenesis of BoHV-5, suggesting that these mechanisms may be involved in immunomodulation, dysfunction and neuronal death, and may contribute to the process of herpetic meningoencephalitis.

Key words: herpetic meningoencephalitis; ectonucleotidases; synaptosomes; lipid peroxidation; oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Componentes da sinalização purinérgica (A); receptor do tipo P1 (B); Receptor do tipo P2X (C); Receptor do tipo P2Y (D); ATP liberado extracelularmente (E); Adenosina formada a partir do ATP via CD39 e CD73 (F); E-NTPDase (ou CD39) (G); 5´nucleotidase (ou CD73) (H); e E-ADA (I). Adaptada de JUNGER (2011)	16
Figura 2 – Liberação de ATP no espaço extracelular e receptores purinérgicos	17
Figura 3 – Enzimas envolvidas na degradação extracelular de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina	21
Figura 4 – Reações responsáveis pela formação das espécies reativas de oxigênio e seus danos nas células.....	23
Figura 5 – Cascata purinérgica. Formação do radical superóxido através da ação da enzima xantina oxidase	74

Manuscrito I

Figure 1 - NTPDase activity in synaptosomes from cerebral cortex of rabbits infected with BoHV-5 using ATP (A) and ADP (B) as substrate and 5´-nucleotidase activity using AMP (C) as substrate, on day 7 p.i. (n=5) and 12 p.i. (n=5 - control group; n=6 – infected group). Bars represent mean SEM. * indicates a significant $P<0.05$	39
Figure 2 - NTPDase activity in synaptosomes from hippocampus of rabbits infected with BoHV-5 using ATP (A) and ADP (B) as substrate and 5´-nucleotidase activity using AMP (C) as substrate, on day 7 p.i. (n=5) and 12 p.i. (n=5 - control group; n=6 – infected group). Bars represent mean SEM. * indicates a significant $P<0.05$	40

Manuscrito II

Figura 1 – Níveis de TBARS em córtex cerebral (A), hipocampo (B), estriado (C) e cerebelo (D) de coelhos experimentalmente infectados com BoHV-5, aos 7 e 12 dias p.i. (*P<0,05).....	65
Figura 2 – Atividade da catalase sanguínea em coelhos experimentalmente infectados com BoHV-5, aos 7 e 12 dias p.i.	66
Figura 3 – Níveis de glutatona reduzida em córtex cerebral (A), hipocampo (B), estriado (C) e cerebelo (D) de coelhos experimentalmente infectados com BoHV-5, aos 7 e 12 dias p.i. (*P<0,05).....	67
Figura 4 – Níveis de tióis não-proteicos em córtex cerebral (A), hipocampo (B), estriado (C) e cerebelo (D) de coelhos experimentalmente infectados com BoHV-5, aos 7 e 12 dias p.i.	68
Figura 5 – Níveis de espécies reativas de oxigênio em córtex cerebral (A), hipocampo (B), estriado (C) e cerebelo (D) de coelhos experimentalmente infectados com BoHV-5, aos 7 dias p.i. (*P<0,01).	69

LISTA DE ABREVIATURAS

BoHV-1 – Herpesvírus bovino tipo-1	UDP – Uridina difosfato
BoHV-5 – Herpesvírus bovino tipo-5	ADO – Adenosina
HSV-1 – Herpes simplex tipo-1	ADA – Adenosina deaminase
SNP – Sistema nervoso periférico	ACh – Acetilcolina
SNC – Sistema nervoso central	
TG – Gânglio trigêmeo	
TNF – Fator de necrose tumoral	
INF – Interferon	
IL – Interleucina	
MHC – Complexo maior de histocompatibilidade	
NK – Célula <i>natural killer</i>	
p.i. – Pós-inoculação	
TBARS – Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico	
GSH – Glutathiona reduzida	
ON – Óxido nítrico	
SOD – Superóxido dismutase	
CAT – Catalase	
GPx – Glutathiona peroxidase	
OH – Radical hidroxila	
H ₂ O ₂ – Peróxido de hidrogênio	
ERN – Espécies reativas de nitrogênio	
ERO – Espécies reativas de oxigênio	
O ₂ ^{-·} – Radical superóxido	
Bcl-2 – proteína <i>B-cell lymphoma-2</i>	
NF- κB – Fator nuclear kappa B	
IκB – Proteína inibidora kappa B	
ATP – Adenosina trifosfato	
ADP – Adenosina difosfato	
AMP – Adenosina monofosfato	
UTP – Uridina trifosfato	

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 MANUSCRITO I - NTPDase and 5'-nucleotidase activities in synaptosomes of rabbits experimentally infected with BoHV-5	27
ABSTRACT	29
INTRODUCTION	29
MATERIAL AND METHODS	30
<i>Animals and experimental design</i>	30
<i>Sample collection</i>	30
<i>Synaptosomes preparation</i>	30
<i>Assay of NTPDase and 5'-nucleotidase activities</i>	31
<i>Protein determination</i>	31
<i>Statistical analysis</i>	31
RESULTS	32
<i>Course of infection</i>	32
<i>NTPDase and 5'-nucleotidase activity</i>	32
DISCUSSION	32
REFERENCES	35
3 MANUSCRITO II - Herpesvírus bovino tipo-5: Alterações oxidativas no encéfalo de coelhos experimentalmente infectados	41
RESUMO	42
ABSTRACT	43
INTRODUÇÃO	44
METODOLOGIA	46
Experimento 1	46
<i>Desenho experimental</i>	47
<i>Coleta e preparação das amostras</i>	47
<i>Peroxidação lipídica</i>	48
<i>Atividade da Catalase</i>	48
<i>Determinação de tióis totais (TSH) e níveis de glutatona reduzida (GSH)</i>	48
<i>Determinação de proteínas</i>	49
Experimento 2	49
<i>Desenho experimental</i>	49
<i>Coleta e preparação das amostras</i>	50
<i>Quantificação das espécies reativas de oxigênio totais (ROS-totais)</i>	50
<i>Análise estatística</i>	50
RESULTADOS	51
Experimento 1	51
<i>Curso da infecção</i>	51
<i>Peroxidação lipídica</i>	51
<i>Atividade da Catalase</i>	51
<i>Níveis de glutatona reduzida (GSH)</i>	52
<i>Tióis totais (TSH)</i>	52

Experimento 2	52
<i>Curso da infecção</i>	52
<i>Espécies reativas de oxigênio totais (ERO-totais)</i>	52
DISCUSSÃO	53
REFERÊNCIAS	58
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de artigos, os quais se encontram nos itens ARTIGOS. Essa tese de Doutorado está organizada seguindo a estrutura e apresentação de monografias, dissertações e teses (MDT) 2012. O item CONSIDERAÇÕES FINAIS, encontrado no final desta tese, apresenta as interpretações discutidas sob um ponto de vista que buscou estabelecer uma conectividade entre os objetivos e resultados obtidos nos artigos contidos neste trabalho.

As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS se referem somente às citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO e CONSIDERAÇÕES FINAIS desta tese.

Os artigos estão estruturados de acordo com as normas das revistas científicas para as quais foram submetidos:

Artigo 1: *Journal of Neurovirology*

Artigo 2: *Ciência Rural*

Os trabalhos descritos nesta tese foram desenvolvidos no Laboratório de Análises Clínicas Veterinária (LACVet) e Laboratório de Bioquímica e Estresse Oxidativo (BioOx) sob a coordenação das Prof^{as}. Sonia Terezinha dos Anjos Lopes e Cinthia Melazzo de Andrade; em conjunto com o Setor de Virologia e Laboratório de Enzimologia e Toxicologia (EnziTox) da UFSM.

1 INTRODUÇÃO

A subfamília *Alphaherpesvirinae* da família *Herpesviridae* abriga vários patógenos importantes de humanos e animais, incluindo os herpesvírus bovino tipos 1 e 5 (BoHV-1, BoHV-5). Os alfa herpesvírus são reconhecidos por infectar várias espécies animais, replicar de forma rápida e lítica em células de cultivo celular, possuir neurotropismo e estabelecer infecções latentes em gânglios do sistema nervoso periférico (SNP) e em outros tecidos neurais (SCHWYZER e ACKERMANN, 1996). O BoHV-5 é associado à infecções neurológicas acompanhadas de meningoencefalite, de curso geralmente fatal, que acometem principalmente bovinos jovens. 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 desses agentes na natureza (ROCK, 1994).

Infecção e enfermidade associadas ao BoHV-5 possuem uma maior importância na América do Sul, sendo descrita com frequência no Brasil, Argentina e Uruguai (CARRILLO et al., 1983a, b; SALVADOR et al., 1998; GOMES et al., 2002; RISSI et al., 2007; AQUINO NETO et al., 2009), apesar de já terem sido relatados casos de infecção na Austrália (FRENCH, 1962; JOHNSTON et al., 1962), Estados Unidos (D'OFFAY et al., 1993), Itália (MORETTI et al., 1964) e Hungria (BARTHA et al., 1969). Vários casos de BoHV-5 também já foram descritos no Rio Grande do Sul (WEIBLEN et al., 1989; HOLZ et al., 2009; ASSIS-BRASIL et al., 2013).

Os bovinos são os hospedeiros naturais do BoHV-5, embora experimentalmente a infecção já tenha sido reproduzida em outras espécies de mamíferos (SILVA et al., 1999; BELTRÃO et al., 2000; ABRIL et al., 2004; 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., 1999).

A transmissão de BoHV-5 ocorre principalmente por contato direto ou indireto entre bovinos (ENGELS e ACKERMANN, 1996), e os sítios de replicação primária são as mucosas oral, nasal, orofaríngea e ocular. Durante a infecção aguda, o BoHV-5 replica nas

células da mucosa nasal, invadindo as terminações dos nervos autonômicos e sensoriais que inervam a mucosa, sobretudo as terminações do nervo olfatório e ramo maxilar do nervo trigêmeo (LEE et al., 1999). A seguir, os vírions invadem o sistema nervoso central (SNC), principalmente pela via olfatória, no sentido retrógrado a partir da mucosa nasal (CHOWDHURY et al., 1997; LEE et al., 1999; DIEL et al., 2005). A disseminação viral no encéfalo pode ter como consequência o desenvolvimento de doença neurológica ou o estabelecimento de infecção latente (LEE et al., 1999; PEREZ et al., 2002; VOGEL et al., 2003). A presença do vírus e alterações microscópicas no gânglio trigêmeo (TG) podem ser observadas a partir do 5^o-7^o dia pós-infecção. O desenvolvimento simultâneo de lesões no córtex anterior, medula, ponte e gânglio trigêmeo sugere que o BoHV-5 também atinge o cérebro por transporte axonal de neurônios bipolares dos nervos olfativos para os bulbos olfatórios (PEREZ et al., 2002).

A infecção pelo BoHV-5 é geralmente associada à doença neurológica letal, a nível de SNC, no entanto, alguns animais podem desenvolver infecção subclínica ou doença moderada. Essa diferença na virulência depende de fatores virais e também do hospedeiro, especialmente idade e condição imunológica (DEL MÉDICO ZAJAC, 2009). A doença neurológica desenvolvida pelos animais é consequência da replicação e invasão viral progressiva no encéfalo (LEE et al., 1999). Inicialmente, observa-se depressão e secreção nasal e ocular, que progridem para emagrecimento, dificuldade respiratória, tremores, bruxismo, andar em círculos, incoordenação, cegueira, nistagmo e disfagia, chegando à convulsão e morte em estágios mais avançados, em decorrência de meningoencefalite (CHOWDHURY et al., 1997; PEREZ et al., 2002).

Os principais sítios de latência dos alfa herpesvírus são os neurônios de gânglios sensoriais e autonômicos (ROCK, 1994). É consenso que a infecção latente nesses locais apresenta grande significado na recorrência da infecção e subsequente transmissão do vírus (STEINER e KENNEDY, 1995). No entanto, em alguns alfa herpesvírus têm sido observada infecção latente em outros sítios neurais e também em sítios não neurais, embora com menor frequência do que no gânglio trigêmeo (WAGNER e BLOOM, 1997). Foi demonstrado que o DNA do BoHV-5 pode ser encontrado em vários locais do SNC de bovinos e ovinos infectados experimentalmente, durante a infecção latente, incluindo bulbo olfatório, ponte, tálamo e em várias áreas do córtex (VOGEL et al., 2003).

Em relação aos mecanismos de indução da resposta imune após a infecção pelos herpesvírus, poucos estudos foram desenvolvidos. Com relação aos herpesvírus bovino tipos 1 e 5, devido as similaridades existentes entre eles, acredita-se que ambos possam provocar

mecanismos semelhantes no hospedeiro durante a infecção (DEL MÉDICO ZAJAC et al., 2010).

Durante a infecção primária a síntese de proteínas virais induz uma série de eventos que estimulam a imunidade inespecífica do hospedeiro. Nesta fase ocorre a produção e liberação de interferon (INF) que age modulando o transporte de leucócitos e de outras células efetoras, como as células mononucleares periféricas, macrófagos, células *natural killers* (NK), ao local da infecção (BABIUK et al., 1996).

A infecção viral estimula diretamente a produção de INF- α e β pelas células infectadas. O INF possui três principais atividades: induzir as células adjacentes a um estado antiviral pela resistência à infecção viral e inibição da replicação viral, ativar o potencial lítico das células NK e aumentar a expressão do complexo principal de histocompatibilidade classe 1 (MHC-I) nas células infectadas (MULLER et al., 1994; ABBAS et al., 2005). Outras citocinas, como interleucina 2 (IL-2), possuem participação importante na fase inicial. A IL-2 induz a produção de INF. Além disso, a IL-2 também participa da diferenciação de células T auxiliares 0 (Th0) em células T auxiliares 1 (Th1), influenciando no desenvolvimento da resposta imune específica (MUYLKENS et al., 2006).

A resposta imune celular é detectada entre 7 e 10 dias pós-infecção, com ativação de linfócitos T (LT) (BABIUK et al., 1996). Os LT CD8+ reconhecem antígenos virais processados no interior das células em associação com moléculas do MHC-I e vão induzir a lise das células infectadas pelo vírus, estimulando enzimas intracelulares que degradam o genoma viral, bem como a secreção de IFN (ABBAS et al., 2005).

A resposta imune humoral também é ativada na infecção primária, porém parece não ter participação na disseminação viral, já que o vírus apresenta mecanismos de evasão e persiste mesmo na presença de anticorpos neutralizantes. Porém, os anticorpos se ligam às células infectadas, participando do mecanismo de citotoxicidade celular dependente de anticorpos, permitindo a ação de células NK (BABIUK et al., 1996).

Durante a infecção viral também ocorre o processo de neuroinflamação, evidenciado pelo desenvolvimento de meningoencefalite nos animais infectados pelo BoHV-5. Neuroinflamação é uma resposta imunitária fundamental para proteger o organismo contra danos, sejam eles endógenos ou exógenos. A micróglia é o principal tipo celular presente no processo de neuroinflamação, sendo estas as células imunes sentinelas do cérebro, são as primeiras responsivas à infecção ou lesão tecidual, iniciando uma resposta inflamatória (RANSOHOFF, 2009; RANSOHOFF e BROWN, 2012).

A micróglia e os astrócitos são capazes de reconhecer e responder à estímulos nocivos através da produção de citocinas inflamatórias, tais como TNF- α , IL-6, IL-1 β , INF- γ , várias quimiocinas (BOCHE et al., 2013), óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio, podendo assim modular a resposta imunoinflamatória. Esta produção de citocinas é essencial para a polarização da micróglia em seu estado ativado (MILLS et al., 2000), processo em que ocorrem rápidas mudanças morfológicas, proliferação e migração para o local de injúria/ infecção, em que estas células irão fagocitar e destruir patógenos e também remover células danificadas. A capacidade da micróglia em produzir citocinas demonstra, pelo menos em parte, que estas células podem controlar sua própria polarização através de meios autócrinos e parácrinos (PERRY e TEELING, 2013).

Assim como os vírus, que pela sua capacidade de infectar células e iniciar a replicação são capazes de causar doenças, o hospedeiro e as suas células possuem alguns mecanismos para prevenir, minimizar ou conter infecções virais. O resultado da interação entre o hospedeiro e o vírus pode se refletir na característica da doença (WISE et al., 2004). Neste contexto podem-se incluir os mecanismos oxidantes e antioxidantes e importantes enzimas do sistema purinérgico, que poderiam modular a resposta imune e inflamatória em animais infectados pelo BoHV-5.

A sinalização purinérgica é uma importante via moduladora de variados processos fisiológicos, estando envolvida em muitos mecanismos neuronais e não neuronais e em eventos de curta e longa duração, incluindo secreção exócrina e endócrina, respostas imunes, inflamação, dor, agregação plaquetária, vasodilatação mediada pelo endotélio, proliferação e morte celular (BURNSTOCK, 2006). Fazem parte deste sistema os nucleosídeos e nucleotídeos de adenina, receptores purinérgico e as ectoenzimas, como a NTPDase e a 5'-nucleotidase, responsáveis pela degradação dos nucleotídeos (Figura 1) (YEGUTKIN, 2008).

É importante ressaltar que as infecções virais podem alterar ou serem moduladas por diferentes componentes do sistema purinérgico, por exemplo, a NTPDase-6 (CD39L2) é necessária para a replicação do vírus que causa a Febre Aftosa (PICCONE et al., 2009) e UTP, pela interação com receptores purinérgicos P2Y4, estimula o aumento na produção de anticorpos contra o vírus da raiva (IWAKI et al., 2014). Ainda, a infecção pelo vírus Herpes Simplex (HSV) pode influenciar o metabolismo da adenosina através do aumento da atividade das enzimas adenosina deaminase e 5'-nucleotidase (ZOPPELLARO et al., 2013) e, também, inibidores da adenosina deaminase foram implicados na redução, *in vitro*, da replicação do (WILLIAMS e LERNER, 1975).

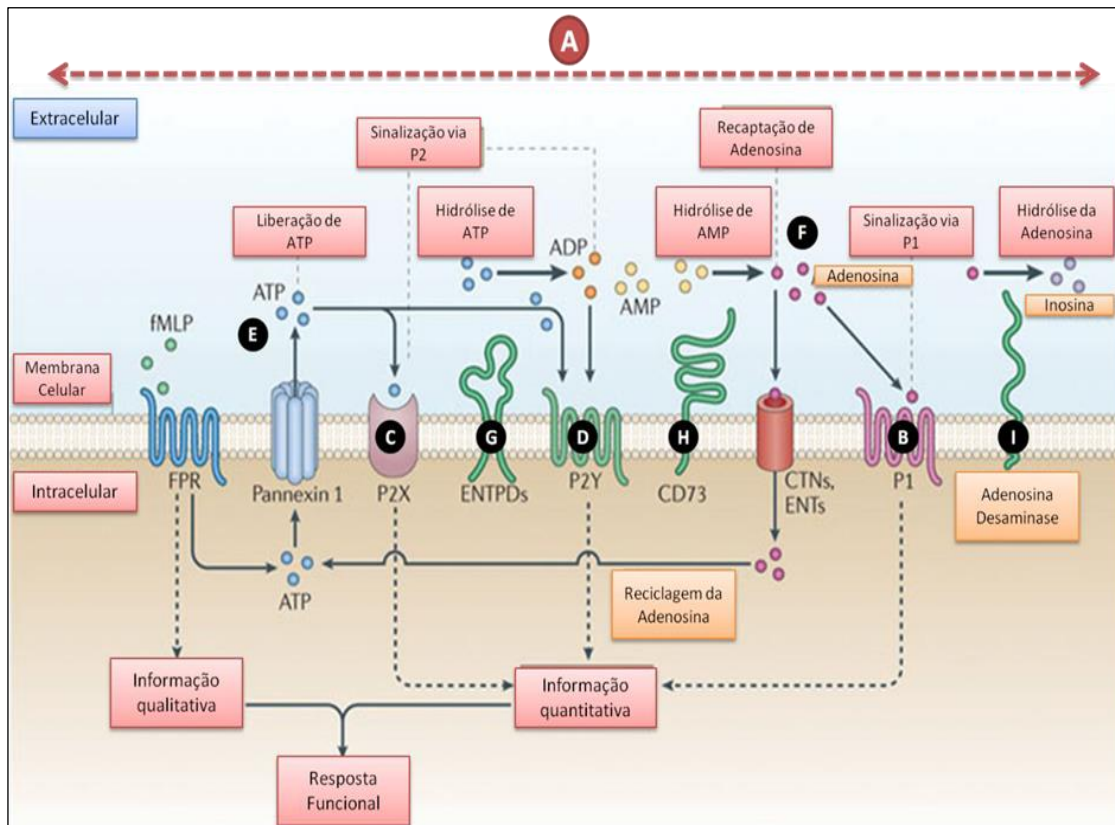


Figura 1 - Componentes da sinalização purinérgica (A); receptor do tipo P1 (B); Receptor do tipo P2X (C); Receptor do tipo P2Y (D); ATP liberado extracelularmente (E); Adenosina formada a partir do ATP via CD39 e CD73 (F); E-NTPDase (ou CD39) (G); 5' nucleotidase (ou CD73) (H); e E-ADA (I). Adaptada de JUNGER (2011).

Apesar de funções extracelulares para purinas terem sido descritas logo após a descoberta do ATP e ADP, o interesse sobre estas moléculas tinha como base o conceito de "ligação fosfato de alta energia" (VASSORT, 2001). Atualmente está bem estabelecido o conceito de que essas moléculas também atuam como mensageiros extracelulares, capazes de sinalizar uma variedade de efeitos biológicos no meio extracelular (BURNSTOCK, 2006).

A liberação de ATP nos terminais pré e pós-sinápticos pode ocorrer como um mecanismo fisiológico ou em resposta a danos celulares, como hipóxia e injúrias (Figura 2) (BURNSTOCK, 2006). Este nucleotídeo também pode ser armazenado em vesículas sinápticas, sendo liberado por exocitose como um co-transmissor juntamente com neurotransmissores como a acetilcolina (ACh) e o glutamato (ZIMMERMANN, 1996). Além disso, o ATP pode ser liberado por exocitose nas células neuronais e nas células não neuronais através de transportadores que se ligam a este nucleotídeo ou via canais acoplados à conexina ou panexina (SABIROV e OKADA, 2005).

O ATP pode atuar como transmissor ou co-transmissor, exercendo sua atividade através de purinoreceptores do tipo P2 (Figura 2). Estes receptores estão divididos em duas famílias distintas de acordo com a base do mecanismo de ação, farmacologia e clonagem molecular, sendo eles P2X e P2Y (BURNSTOCK e KENNEDY, 1985; BURNSTOCK, 2012).

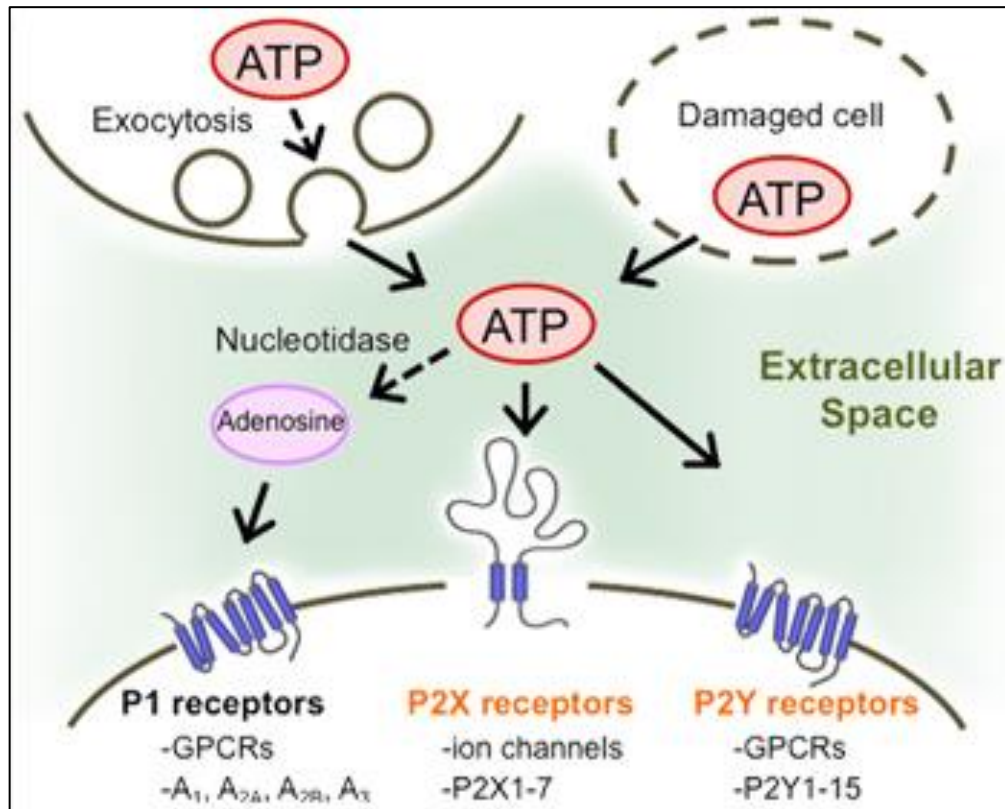


Figura 2 – Liberação de ATP no espaço extracelular e receptores purinérgicos (kawatelab.vet.cornell.edu)

A família P2X consiste de receptores ionotrópicos que quando ativados resultam na abertura de um poro na membrana celular (canais iônicos) que permite a passagem de cátions Na⁺, K⁺ e Ca²⁺. Esta família de receptores está dividida em sete membros (P2X1-7), os quais podem ser encontrados em neurônios, células gliais e músculo liso (MOLLER et al., 2000; NORTH, 2002; NORTH e VERKHRATSKY, 2006; FIELDS e BURNSTOCK, 2006). Sabe-se que os receptores P2X7 estão relacionados ao processo neuroinflamatório, estes receptores são capazes de transformar o fenótipo fagocítico da micróglia (neuroprotetor) em inflamatório (neurodegenerativo). Além disso, os receptores P2X7 atuam na mediação da inflamação através do estímulo à liberação de IL-1 β (FERRARI et al., 2006).

A família P2Y consiste em receptores metabotrópicos acoplados a uma proteína G e foram funcionalmente descritos oito membros (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14), que apresentam uma ampla distribuição nos tecidos e sistemas, como o vascular, o nervoso e o cardíaco. Os receptores P2Y também podem ser ativados por outros nucleotídeos, como ADP, UDP e UTP (DÍAZ-HERNANDEZ et al., 2002; ERB et al., 2006; BURNSTOCK, 2007; ZIMMERMANN, 2011). Além disso, estes receptores também estão envolvidos no processo inflamatório no SNC, pois desempenham um papel importante na comunicação neurônio-glia. Lesões neuronais ativam receptores astrocitários P2Y levando à liberação de prostaglandina E2 (PGE2), causando gliose reativa (XIA e ZHU, 2011); ou à liberação de glutamato, mediando a modulação sináptica (DOMERCQ et al., 2006). Como resultado, os receptores P2Y influenciam a permeabilidade da barreira hematoencefálica através da indução de óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) e as células gliais ativadas induzem a expressão de quimiocinas, como a proteína quimiotática para monócitos-1 (MCP-1), levando ao recrutamento de monócitos ao SNC (KIM et al., 2011). Ainda, a migração de células microgliais para o local da lesão pode ser mediada por receptores P2Y (HAYNES et al., 2006).

Além disso, existe uma terceira família de purinoreceptores, os receptores P1. Estes receptores são divididos em quatro subtipos de acordo com suas características, receptores A1, A2A, A2B e A3, sendo todos acoplados a proteína G e exibindo sete domínios transmembrana formados por aminoácidos hidrofóbicos. A adenosina (ADO) exerce seus efeitos através da ativação de purinoreceptores do tipo P1. (STEHLE et al. 1992; FREDHOLM et al., 2000).

Os nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares podem exibir efeitos diferentes dependendo da concentração, da célula e do receptor em que atuam. Diversos estudos mostram que os nucleotídeos, ATP e ADP, secretados por leucócitos, plaquetas e células danificadas, servem como mediadores capazes de modular o processo de inflamação, a resposta imune e a trombose vascular (SITKOVSKY, 1998; KUNAPULI e DANIEL, 1998; HASKO e CRONSTEIN, 2004; SITKOVSKY e OHTA, 2005).

O ATP é descrito como um sinalizador de dano celular, ou padrão molecular associado ao dano (DI VIRGILIO, 2005). A baixa afinidade dos receptores P2X7 para o ATP extracelular garante que sua ativação ocorre apenas em condições patológicas onde o excesso de ATP é encontrado, que corrobora a função do ATP como uma molécula sinalizadora de dano. Uma vez liberado, este nucleotídeo contribui para o desencadeamento da resposta inflamatória juntamente com os padrões moleculares associados a patógenos. Esses sinais de

dano parecem ser importantes para promover a regulação da inflamação após o trauma ou danos associados a patógenos (MARIATHASAN e MONACK, 2007).

Dependendo da sua concentração e local de ação, o ATP possui ações pró-inflamatórias promovendo a estimulação e proliferação de linfócitos, sendo necessário para a secreção de importantes citocinas das células T, como INF- γ e IL-2, que estão envolvidas na indução de resposta imune a antígenos estranhos, além de apresentar outros efeitos em muitos processos biológicos, como contração do músculo liso, neurotransmissão, inflamação e dor (RALEVIC e BURNSTOCK, 1998; SITKOVSKY, 1998; SNEDDON et al., 1999). Além disso, o ATP está envolvido no recrutamento de monócitos para tecidos alvo (VENTURA e THOMOPOULOS, 1995), na produção de IL-1 β e TNF- α por macrófagos (GUERRA et al., 2003; ELSSNER et al., 2004) e na migração e diferenciação de células dendríticas (LA SALA et al., 2003).

No SNC, nucleotídeos e nucleosídeo podem modular a proliferação, a migração e a diferenciação de astrócitos e células neuronais (RYU et al., 2003; SCEMES et al., 2003) e promover a ativação de células da micróglia (DAVALOS et al., 2005; HAYNES et al., 2006). A ativação da micróglia ocorre inicialmente por injúrias ou infecções, entre outros; seguido de um segundo estímulo que ocorre pela liberação no meio extracelular de grandes reservas de ATP citosólico de neurônios danificados, em resposta à lesão direta ou após a ativação inicial das células da glia. Este excesso de ATP, apesar dos mecanismos que regulam a sua concentração no meio extracelular, ativa uma grande variedade de receptores purinérgicos presentes em células vizinhas, modulando assim a atividade neuronal e glial na resposta inflamatória. Ainda, neurônios e células gliais são capazes de transportar ATP, em concentrações milimolares, no interior de vesículas pré-sinápticas e grânulos, respectivamente (ABBRACCHIO et al., 2009). O ATP neuronal serve como um neurotransmissor, enquanto o ATP astrocitário permite que astrócitos distantes se comuniquem uns com os outros e modulem a resposta neuronal. A presença de receptores purinérgicos funcionalmente ativos nas células da micróglia indica a probabilidade de uma comunicação entre estas células e os astrócitos (VERDERIO e MATTEOLI, 2001). Tal comunicação melhora a vigilância microglial e sua resposta à inflamação no SNC, pois a liberação neuronal e astrocitária de ATP durante injúrias cerebrais provoca uma rápida resposta quimiotática microglial (DAVALOS et al., 2005). No local da lesão, o ATP extracelular medeia a liberação de citocinas pró-inflamatórias e prostaglandina E₂. O efeito final deste sinergismo é a produção de níveis patológicos de citocinas inflamatórias e prostanoídes (XU et al., 2003; FERRARI et al., 2006; XIA e ZHU, 2011).

Entretanto, o ATP em elevadas concentrações pode atuar como uma potente molécula citotóxica, capaz de levar à morte diferentes classes de células, pela formação de grandes poros na membrana plasmática (FILIPPINI et al., 1990). Além disso, efeitos antagônicos, como mitogênese e apoptose, podem ser induzidos pelos nucleotídeos, dependendo da expressão de purinoreceptores e da atividade das ectoenzimas que controlam a disponibilidade dos nucleotídeos e nucleosídeos. Como o ATP não é capaz de atravessar as membranas celulares por difusão ou transporte ativo, o controle de sua concentração extracelular é realizado pela ação das ectonucleotidases que catalisam sua conversão até adenosina (ADO) (ROBSON et al., 2006).

A ADO, um importante componente do sistema purinérgico, não é considerada um neurotransmissor clássico, uma vez que não é armazenada em vesículas ou liberada por exocitose como o ATP, sendo então classificada como neuromodulador do SNC, regulando o metabolismo das células e desencadeando uma série de efeitos fisiológicos que participam na apoptose, necrose e proliferação celular. Este nucleosídeo também é considerado uma molécula sinalizadora de dano celular, porém com ações antagônicas as do ATP (BOURS et al., 2006), pois medeia ações anti-inflamatórias e imunossupressoras, tais como a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e da proliferação de linfócitos (GESSI et al., 2007). Em condições patológicas, a adenosina desempenha um papel protetor, modulando a liberação de neurotransmissores, também atua como um regulador endógeno da imunidade inata e na defesa do hospedeiro de lesão tecidual excessiva associada à inflamação (RATHBONE et al., 1999; BERAUDI et al., 2003; HASKO e CRONSTEIN, 2004; SITKOVSKY e OHTA, 2005; BURNSTOCK, 2006; DESROSIERS et al., 2007). Além disso, a adenosina é um ativador endógeno do sistema antioxidante enzimático durante os processos de injúria celular (RAMKUMAR et al., 1995).

As concentrações dos nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, em muitos tecidos, são reguladas pela ação de enzimas pertencentes à família das ectonucleotidases, assim denominadas por estarem ancoradas à membrana celular e possuírem o seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular. Essas enzimas hidrolisam os nucleotídeos extracelulares em seus respectivos nucleosídeos, dentre elas estão as NTPDases (ecto-difosfohidrolases, CD39 ou apirases) que hidrolisam tanto ATP quanto ADP em AMP, na presença de cátions divalentes como cálcio e magnésio, e a 5'-nucleotidase, que termina a cascata ectonucleotidásica com a hidrólise dos nucleotídeos monofosfatados, resultando em adenosina (Figura 3) (ZIMMERMANN, 1996).

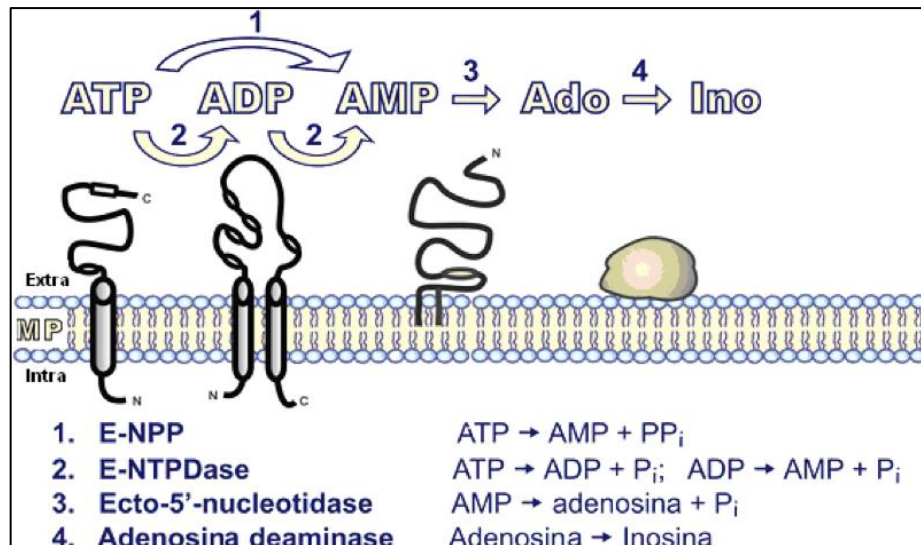


Figura 3 - Enzimas envolvidas na degradação extracelular de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina. Adaptado de Yegutkin (2008).

Os membros da família das NTPDases são codificados por oito genes diferentes. Quatro membros desta família de enzimas estão localizados na superfície das células, com um sítio catalítico extracelular, sendo eles NTPDases 1, 2, 3 e 8. Já as NTPDases 5 e 6 apresentam localização intracelular, podendo ser secretadas após expressão heteróloga (MULERO et al., 1999; TROMBETTA e HELENIUS, 1999; BRAUN et al., 2000). As NTPDases 4 e 7 apresentam localização intracelular com o sítio ativo voltado para o lúmen de organelas citoplasmáticas (BIEDERBICK et al., 2000; SHI et al., 2001). A NTPDase desempenha importante controle da função dos linfócitos, incluindo o reconhecimento do antígeno e ativação de funções efetoras das células T citotóxicas (FILIPPINI et al., 1990), e a capacidade de gerar sinais que amplificam interações célula-célula (KACZMAREK et al., 1996).

A 5'-nucleotidase desfosforila nucleosídeos monofosfatados não cíclicos, através da hidrólise da ligação fosfodiéster de 5'-ribonucleotídeos, levando à formação do correspondente ribonucleosídeo e fosfato, apresentando uma ampla distribuição tecidual. Esta enzima é a principal responsável pela produção de ADO extracelular. A 5'-nucleotidase também desempenha funções não enzimáticas, como a indução da sinalização intracelular e mediação de processos de adesão célula-célula e célula-matriz e de migração (VOGEL et al., 1991).

As ectonucleotidases são enzimas ancoradas à membrana, assim, podem ser susceptíveis a moléculas capazes de causar danos à membrana celular, como as espécies reativas de

oxigênio (ERO). As ERO podem ter uma importante participação na patogênese de muitas viroses, uma vez que a infecção viral poderia levar a produção excessiva de espécies reativas ocasionando danos às proteínas, DNA e principalmente aos lipídios de membrana. Os mecanismos oxidantes e antioxidantes, através da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou da ação de enzimas antioxidantes, como a glutathiona peroxidase, podem atuar tanto na defesa do organismo contra a infecção quanto no estímulo à replicação viral e patogênese da doença (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). A oxidação é parte fundamental da vida aeróbia e do metabolismo celular e, assim, as ERO são produzidas naturalmente ou por alguma disfunção biológica (BARREIROS et al., 2006). A redução do oxigênio gera subprodutos altamente reativos que podem ocasionar danos celulares (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

As ERO são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o oxigênio sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água (H_2O). Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido (O_2^-), hidroxila (OH), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Figura 4). Normalmente, a redução completa do oxigênio ocorre na mitocôndria e a reatividade das ERO é neutralizada com a entrada de quatro elétrons (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Assim, as ERO incluem moléculas cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007), e, quando presentes em excesso, podem levar a peroxidação de lipídios presentes nas membranas celulares, bem como danos às proteínas, enzimas e DNA (BARREIROS et al., 2006).

O exemplo mais comum do ataque das ERO é a ação destas nos lipídios de membrana. A peroxidação lipídica é o processo através do qual as ERO agridem os ácidos graxos poli-insaturados dos fosfolipídios das membranas das células, desintegrando-as e interferindo nos transportes ativo e passivo normais, promovendo, dessa forma, grave alteração da membrana celular, resultando na perda da fluidez, alteração da função secretora e dos gradientes iônicos transmembrana ou ocasionando a ruptura desta, levando à morte celular (BARREIROS et al., 2006).

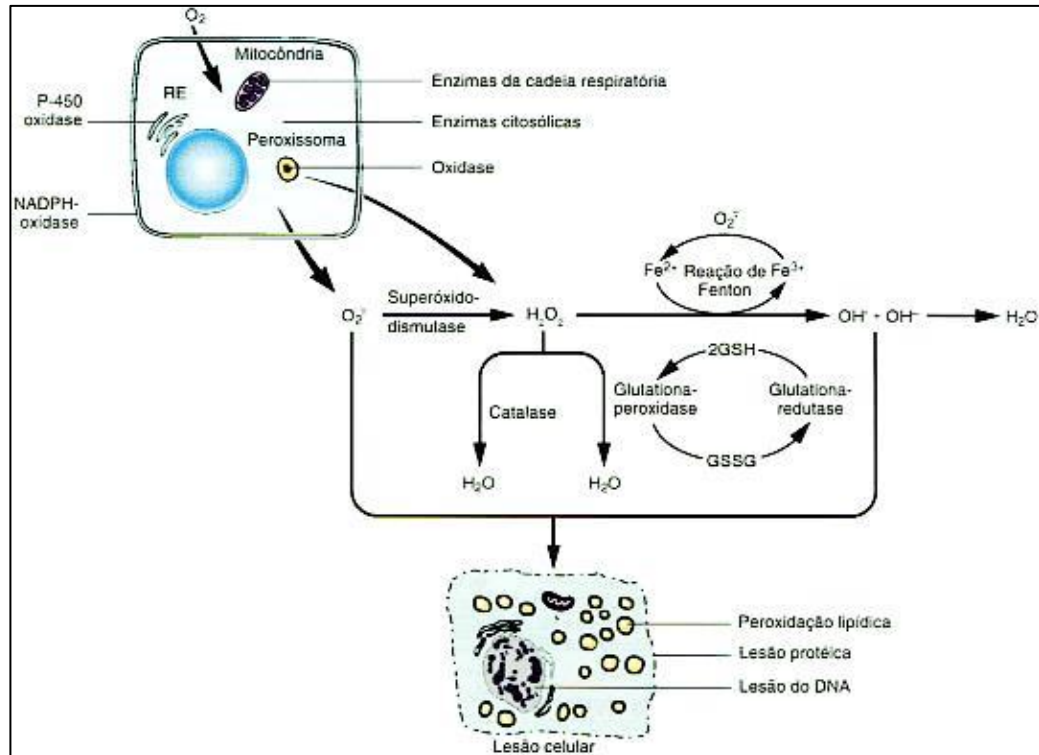


Figura 4 - Reações responsáveis pela formação das espécies reativas de oxigênio e seus danos (COTRAN et al., 2000).

Apesar da maioria das ERO não se difundir amplamente pelo organismo, os peróxidos lipídicos resultantes da peroxidação dos fosfolipídios de membrana induzida pelas ERO, como o malondialdeído, podem se difundir na circulação e transpor as membranas celulares, resultando na disfunção de processos celulares vitais tais como o transporte de membrana e respiração mitocondrial (HALLIWELL e CROSS, 1994). Assim, as ERO são, muitas vezes, vistas como parte do processo etiológico na produção de lesão celular durante as infecções virais.

As ERO e as espécies reativas de nitrogênio (ERN) são elementos importantes que podem atuar na defesa contra microrganismos e ter efeito antitumoral, mas estas também podem estar envolvidas na patogênese de diversas doenças (BREDT e SNYDER 1994; HALLIWELL e CROSS, 1994). O fato de que as ERO e as ERN estão envolvidas no processo metabólico e processos fisiológicos tem grande relevância uma vez que os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios e dependem de processos fisiológicos das células de seus hospedeiros (ALBRECHT et al, 1992; BURDON, 1995). É possível que as ERO possam desempenhar importante papel na patogênese de muitas viroses, porém é difícil distinguir se o vírus possui um papel primário ou secundário na injúria celular mediada por ERO

(PASQUIER et al., 1994). Por exemplo, em algumas viroses observa-se uma diminuição na concentração do antioxidante glutatona, porém não se sabe se o vírus afeta diretamente o metabolismo da glutatona (diminuindo sua síntese ou aumentando a sua degradação), que seria um ‘efeito primário’ do vírus sobre as defesas celulares antioxidantes; ou se a concentração de glutatona pode estar reduzida por um ‘efeito secundário’ do vírus, como disfunção de macrófagos, que regulam a concentração intracelular de glutatona nos linfócitos (MULLER et al., 1990), outro ‘efeito secundário’ poderia se dar por citocinas responsivas ao vírus, que resultariam em aumento das ERO consumindo glutatona (GMIINDER et al., 1990).

Um dos aspectos importantes dos ERO na patogênese viral é o papel modulatório positivo destas substâncias na ativação da resposta imune. A ativação de fagócitos induzida pelos vírus pode estar associada ao estresse oxidativo, não só porque estas células podem produzir ERO, mas também pela secreção de citocinas pró-oxidantes como o fator de necrose tumoral (TNF) e IL-1, que promovem absorção de ferro pelo sistema reticuloendotelial (GLOENBOCK et al., 1991).

Alguns vírus podem provocar aumento da produção de superóxido através da via xantina oxidase, uma enzima que sintetiza superóxido, como observado no vírus influenza, ocorrendo também diminuição de antioxidantes (vitaminas E e C e glutatona) durante o curso da infecção (PETERHANS, 1997). Os vírus também podem afetar o equilíbrio pró-/antioxidante nas células dos hospedeiros, através do aumento de pró-oxidantes, como o fator de necrose tumoral (TNF) (SCHULZE-OSTHOFF et al., 1992) o ferro e o óxido nítrico (ON) (DAWSON e DAWSON, 1996; DEZENGRINI et al., 2009); e também pela inibição da síntese de enzimas antioxidantes (BUHL et al., 1986; HENNET et al., 1992).

A formação de ON é uma característica de várias doenças virais, sendo as de maior interesse as infecções do sistema nervoso central, uma vez que o ON atua como um segundo mensageiro nos neurônios (BREDT e SNYDER, 1994). Assim, a formação de ON poderia explicar algumas alterações neurológicas e alterações relacionadas com a perda de neurônios devido as ERO e ERN (DAWSON e DAWSON, 1996), como pode ser observado durante infecção pelo BoHV-5 (FLORES et al., 2009; DEZENGRINI et al., 2009). Na diarreia viral bovina, os vírus estimulam os macrófagos aumentando a produção de ON, fato que pode estar relacionado à imunossupressão observada durante a infecção (ADLER et al., 1994). A produção aumentada de óxido nítrico pode levar a interação deste com o ânion superóxido para formar peroxinitrito, que é altamente reativo e está implicado na inibição da migração de neutrófilos. O peroxinitrito pode ligar-se rapidamente a um próton e gerar radicais altamente

tóxicos, como o dióxido de nitrogênio e o radical hidroxila (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Apesar de o ON desempenhar um papel negativo em diversas infecções virais, é importante ressaltar que o ON também pode ter efeitos antivirais. Por exemplo, o tratamento de macrófagos com INF- γ levou a um aumento concomitante da produção de ON com a inibição dos vírus vaccínia e herpes simplex. Na presença de inibidores da óxido nítrico sintetase o efeito protetor do INF- γ não foi observado. A inibição da replicação viral pelo ON também foi observada para o vírus da estomatite vesicular (MANNICK, 1995).

Embora as ERO possam ser mediadoras de doenças, sua formação nem sempre é deletéria. Em um processo inflamatório, grande número de células de defesa são translocadas para o local de inflamação. Estas células, com o intuito de destruir microrganismos invasores, produzem espécies reativas, tais como superóxido e óxido nítrico, que acabarão por destruir os elementos patogênicos. Este processo possui baixa especificidade, assim, ao mesmo tempo em que supera adaptações genéticas dos elementos invasores, também danifica as células do próprio organismo hospedeiro. Assim, se houver estímulo exagerado na produção de espécies reativas, associado a uma falha da defesa antioxidante ocorrerá o estresse oxidativo (ROOS et al., 2003).

O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes que resulta no aumento da formação de ERO e induz um aumento de injúrias oxidativas (WU et al., 2004). Como as substâncias pró-oxidantes são constantemente formadas em pequenas quantidades no metabolismo normal, as células possuem mecanismos para evitar o desequilíbrio oxidativo, o sistema de defesa antioxidante (URSO e CLARKSON, 2003). Os antioxidantes são substâncias que, em concentrações menores que a do substrato oxidável, inibem significativamente a oxidação, adiando seu início ou reduzindo sua taxa (SIES, 1997). Essas substâncias fazem parte do sistema de defesa dos organismos vivos, com ação intracelular e extracelular, em meio hidrofílico e hidrofóbico, sendo produzidos pelo organismo ou obtidos da dieta. O efeito do antioxidante consiste na inativação de radicais livres, na complexação de íons metálicos ou na redução de hidroperóxidos para produtos incapazes de formar radicais livres (KOLAKOWSKA, 2003). O sistema antioxidante sanguíneo é classificado em enzimático e não enzimático. O enzimático é representado, principalmente, pelas enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do ânion radical superóxido a peróxido de hidrogênio e oxigênio, a catalase (CAT), que atua na decomposição de peróxido de hidrogênio a oxigênio e água e a glutathione peroxidase (GPx), que atua sobre peróxidos em geral, com utilização de glutathione como co-fator (VASCONCELOS et al., 2007).

Os antioxidantes parecem ter um caráter variável nas doenças virais, podendo ter efeitos benéficos ao hospedeiro ou favorecer o vírus. Dentre os efeitos benéficos ao hospedeiro podem-se citar os antioxidantes que removem os peróxidos, como a N-acetilcisteína que pode inibir a replicação viral e também ser convertida em metabólitos capazes de estimular a síntese de glutathione. Além disso, a transcrição de genes virais induzida pelo fator nuclear κ B (NF- κ B) pode ser inibida pela cisteamina. No entanto, se por um lado alguns antioxidantes parecem conferir proteção contra as infecções virais, outros podem atuar favorecendo a doença viral, como o butil hidroxil anisol, que atua inibindo a proliferação de linfócitos T, um evento importante na resposta imune celular à infecção viral (SCHWARZ, 1996). Ainda, a descoberta de um homólogo de selenoproteína à enzima antioxidante glutathione peroxidase em um poxvírus indica que certos vírus podem ter adquirido mecanismos celulares destinadas a neutralizar oxidantes gerados intracelularmente (SHISLER et al., 1998). Estas selenoproteínas também são codificadas por alguns retrovírus. Assim, pode ocorrer um aumento da expressão destas proteínas nas células infectadas e a inibição do efeito das ERO pelas selenoproteínas virais poderia explicar a inibição do processo apoptótico das células infectadas (LAURENT-CRAWFORD et al., 1991; WHITE et al., 1992).

Devido a repercussão sanitária e econômica da infecção pelo BoHV-5 e a capacidade deste vírus em invadir o sistema nervoso central e estimular as respostas imune e inflamatória, levando ao desenvolvimento da meningoencefalite herpética, estudos que procurem aprofundar os conhecimentos relacionados a neuropatogenia da infecção são de extrema importância, pois poucos trabalhos foram desenvolvidos no que se refere aos mecanismos de indução da resposta imune e inflamatória após a infecção pelo herpesvírus bovino. Neste sentido, buscou-se estabelecer a participação dos sistemas purinérgico e mecanismos oxidantes e antioxidantes na infecção pelo BoHV-5, utilizando-se coelhos como modelo experimental, principalmente em relação à modulação dos processos imunoinflamatórios e nas possíveis consequências destas participações, em nível de sistema nervoso central.

2 MANUSCRITO I

NTPDase and 5'-nucleotidase activities in synaptosomes of rabbits experimentally infected with BoHV-5

Cássia B. da Silva; Francine C. Paim; Patricia Wolkmer; Fátima H. Abdalla; Fabiano B. Carvalho; Heloísa H. Palma; Camila B.E. Mello; Eduardo F. Flores; Cinthia M. Andrade; Sonia T.A. Lopes

Artigo submetido para: *Journal of Neurovirology*

NTPDase and 5'-nucleotidase activities in synaptosomes of rabbits experimentally infected with BoHV-5

Cássia B. da Silva ^{a*}; Francine C. Paim ^a; Patricia Wolkmer ^b; Fátima H. Abdalla ^c; Fabiano B. Carvalho ^c;
Heloísa H. Palma ^b; Camila B.E. Mello ^a; Eduardo F. Flores ^d; Cinthia M. Andrade ^a; Sonia T.A. Lopes^a

^aLaboratório de Análises Clínicas Veterinárias e Laboratório de Bioquímica e Estresse Oxidativo, Departamento de Clínica de Pequenos Animais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima 1000, Campus Universitário, Hospital Veterinário, Sala 103, 97105-900, Santa Maria – RS, Brazil

^bLaboratório de Bioquímica e Patologia Clínica Veterinária, Universidade de Cruz Alta, Rodovia Municipal Jacob Della Múa Km 5.6, 98020-290, Cruz Alta - RS, Brazil

^cLaboratório de Bioquímica Toxicológica e Laboratório de Bioquímica e Estresse Oxidativo, UFSM, Avenida Roraima 1000, Campus Universitário, 97105-900, Santa Maria – RS, Brazil

^d Setor de Virologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, UFSM, Avenida Roraima 1000, Campus Universitário, Prédio 20, 97105-900, Santa Maria – RS, Brazil

***Corresponding author:** Cássia B. da Silva, e-mail: cassiabagolin@hotmail.com; Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias, Departamento de Clínica de Pequenos Animais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima 1000, Campus Universitário, Hospital Veterinário, Sala 103, 97105-900, Santa Maria – RS, Brazil. Phone number: +55 55 3220-8814.

E-mail addresses: cassiabagolin@hotmail.com (Cássia B. da Silva); franchimelo@gmail.com (Francine C. Paim); patiwol@hotmail.com (Patricia Wolkmer); faha.biomed@hotmail.com (Fátima H. Abdalla); fabiseco@yahoo.com.br (Fabiano B. Carvalho); heinloft@hotmail.com (Heloísa H. Palma); camilabenaduce@gmail.com (Camila B.E. Mello); eduardofurtadoflores@gmail.com (Eduardo F. Flores); cmelazzo@yahoo.com.br (Cinthia M. Andrade); soniatldosanojos@gmail.com (Sonia T.L.A. Lopes).

Abstract

Bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) is a neurovirulent alpha-herpesvirus associated with meningoencephalitis in cattle. The purinergic signaling system plays an important role in modulating the immune response and neuroinflammation by extracellular biomolecules such as ATP, ADP, AMP and adenosine. NTPDase and 5'-nucleotidase are enzymes responsible to controlling the levels of these extracellular nucleotides in the synaptic cleft. This study aimed to investigate the ectonucleotidase activity in synaptosomes from the cerebral cortex and hippocampus of rabbits experimentally infected with BoHV-5. Rabbits were divided into four groups, two control groups (non-inoculated animals) and two infected groups (inoculated with BoHV-5). The infected groups received 1 ml of a viral suspension containing approximately $10^{7.5}$ TCID₅₀ of BoHV-5 (SV-507/99), and the control groups received 1 ml of minimum essential media by the same route. Animals were submitted to euthanasia on day 7 and 12 post inoculation; cerebral cortex and hippocampus were collected for synaptosomes preparation and biochemical assays. The results showed a decrease ($P < 0.05$) in ectonucleotidase activity in synaptosomes from the cerebral cortex of infected rabbits whereas an increased ($P < 0.05$) ectonucleotidases activity was observed in synaptosomes from the hippocampus. These differences may be related with the heterogeneous distribution of ectonucleotidases in the different brain regions and, also, with the viral infectivity. Therefore, it is possible to speculate that BoHV-5 replication results in changes in ectonucleotidase activity in the brain, which may contribute to the neurological signs commonly observed in this disease.

Key words: ectonucleotidases, synaptosomes, herpetic meningoencephalitis, pathogenesis.

Introduction

Bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) is an important agent of meningoencephalitis in cattle (Lee et al. 1999). Following replication in the nasal mucosa, BoHV- 5 invades the central nervous system (CNS) mainly through the olfactory route, reaching first the olfactory bulb and anterior cortex, where it replicates and disseminates into other brain regions (Chowdhury et al. 1997; Diel et al. 2005). Neurological signs developed by BoHV-5 infected animals are a consequence of viral replication and progressive invasion of the brain (Lee et al. 1999). However, the histological changes found in the brain are frequently mild in acute cases of the disease (Chowdhury et al. 1997). The main macroscopic lesions reported in the brain after BoHV-5 infection consist of softening of the parenchymal tissue and focal meningeal hemorrhages in the frontal and ventral areas (Carrillo et al. 1983; Perez et al. 2002). In the microscopic examination, histological changes in several areas of the brain, but mostly in the cerebral cortex, such as the presence of perivascular cuffs, neuronophagia, reactive astrocytes, astrogliosis, hemorrhages, neuronal degeneration and necrosis are observed (Bagust and Clark 1972; Belknap et al. 1994; Meyer et al. 1996; Perez et al. 2002; Machado et al. 2013).

The invasion and dissemination of BoHV-5 in the CNS activates the immune system and inflammatory mediators in order to control infection. During the neuroinflammatory response, a variability of neurotransmitters and others molecules are released from injured cells and can act to modulate various signaling pathways (Constantin et al. 2000; Glass et al. 2010). The purinergic signaling system plays an important role in

modulating the immune response, inflammation, proliferation and cell death by extracellular biomolecules such as adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), adenosine monophosphate (AMP) and adenosine (Burnstock 2006). The enzymes currently thought to be responsible for controlling the extracellular nucleotides and adenosine levels in the synaptic cleft are NTPDase and 5'-nucleotidase (Zimmermann 1996; Yegutkin 2008).

Based on the knowledge that the histological changes during BoHV-5 infection frequently does not reflect the severity of neurological signs during the acute phase of the disease, it is believed that others mechanisms leading to neuronal toxicity and/or dysfunction may be involved in the neuropathogenesis of BoHV-5 infection (Dezengrini et al. 2009). Considering that the purinergic system enzymes are closely involved in the modulation of neuroinflammation, this study aimed to investigate the NTPDase and 5'-nucleotidase activities in synaptosomes from cerebral cortex and hippocampus of rabbits experimentally infected with BoHV-5.

Material and Methods

Animals and experimental design

Twenty three New Zealand rabbits with approximately 25 days old were used in this experiment. The animals were kept in an experimental room with controlled temperature ($20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). They were fed a commercial ration, with water *ad libitum*, and submitted to a period of 6 days of adaptation. The animals were divided in four groups (C7 and C12 – control groups with 5 animals/each; T7 and T12 – infected groups, T7 with 5 animals and T12 with 8 animals).

The rabbits were inoculated by the intranasal route, after anesthetized with ketamine (50mg/kg) and xylazine (5mg/kg), with 1 ml of a viral suspension containing approximately $10^{7.5}$ TCID₅₀ (50% tissue culture infectious dose) of SV-507/99 (infected groups) or received 1 ml of minimum essential media (MEM) (control groups) by the same route. After virus inoculation, the rabbits were monitored clinically on a daily basis.

Sample collection

Sample collection were performed on days 7 (groups C7 and T7) and 12 (groups C12 and T12) post-inoculation (p.i.). The animals were anesthetized with ketamine, xylazine and halothane, submitted to cervical dislocation, and then decapitated for brain collection. A fraction of hippocampus and cerebral cortex were collected for the enzyme assays. All procedures during the animal experiments were conducted under veterinary supervision and according to COBEA's recommendations (Brazilian Committee on Animal Experimentation). These procedures were approved by Institutional Committee on Ethics in Research (n° 055/2013).

Synaptosomes preparation

The synaptosomes were isolated as described by Nagy and Delgado-Escueta (1984) using a discontinuous Percoll gradient. Briefly, the cerebral cortex and hippocampus were, separately, homogenized in

10 volumes of an ice-cold medium (medium I) containing 320 mM of sucrose, 0.1 mM EDTA and 5 mM HEPES, with a pH 7.5, in a motor driven Teflon-glass homogenizer and then centrifuged at 1000 x g for 10 min. An aliquot of 0.5 ml of the crude mitochondrial pellet was mixed with 4.0ml of 8.5% Percoll solution and layered into an isosmotic discontinuous Percoll/sucrose gradient (10%/16%). The synaptosomes that banded at the 10 and 16% Percoll interface were collected with a wide-tip disposable plastic transfer pipette. The synaptosomal fraction was washed twice with an isosmotic solution consisting of 320 mM of sucrose, 5.0 mM HEPES, pH 7.5, and 0.1 mM EDTA by centrifugation at 15,000 x g to remove any contaminating Percoll. The pellet of the second centrifugation was suspended in an isosmotic solution and the final protein concentration was adjusted to 0.4–0.6 mg/ml. Synaptosomes were prepared fresh daily and maintained at 0–4 °C throughout the procedure and used for NTPDase and 5'-nucleotidase assays.

Assay of NTPDase and 5'-nucleotidase activities

The NTPDase enzymatic assay of the synaptosomes was carried out in a reaction medium containing 5 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 0.1 mM EDTA, 10 mM glucose, 225 mM sucrose and 45 mM Tris–HCl buffer, pH 8.0, in a final volume of 200 µL as described by Schetinger et al. (2000). The 5'-nucleotidase activity was determined essentially by the method of Heymann et al. (1984) in a reaction medium containing 10 mM MgSO₄ and 100 mM Tris–HCl buffer, pH 7.5, in a final volume of 200 µL. In synaptosomes, 20 µL of enzyme preparation (8–12 µg of protein) was added to the reaction mixture and pre-incubated at 37°C for 10 min. The reaction was initiated by the addition of ATP or ADP to obtain a final concentration of 1.0 mM and incubation proceeded for 20 min. For AMP hydrolysis, the 5'-nucleotidase activity was carried out as previously described, and the final concentration of the nucleotide AMP added was 2 mM. The reactions were stopped by the addition of 200 µL of 10% trichloroacetic acid (TCA) to provide a final concentration of 5%. Then, the tubes were chilled on ice for 10 min. Released inorganic phosphate (Pi) was assayed using the method of Chan et al. (1986), using malachite green as the colorimetric reagent and KH₂PO₄ as standard. All samples were run in triplicate. Enzyme-specific activities are reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

Protein determination

Protein was measured using the Coomassie Blue method according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard.

Statistical analysis

Data were analyzed using ANOVA (two-way ANOVA) followed by the Duncan multiple range test, and P<0.05 was considered to represent a significant difference in the analysis. All data were expressed as mean ± SEM. All analyses were performed using the Statistic version 6.0 software.

Results

Course of infection

None of the animals of the infected group exhibited signs of neurological disease on day 7 p.i. In order to obtain a tissue sample of these animals, five inoculated rabbits and five control animals were euthanatized at this day. Two rabbits died after manifestations of neurological signs (opisthotonus and seizures) on day 10 p.i. At day 12 p.i., all infected rabbits (n=6) showed clinical signs of the infection such as apathy and nasal secretion. However, only four infected rabbits presented classical signs of neurological BoHV-5 disease such as bruxism, circling, opisthotonus and seizures.

NTPDase and 5'-nucleotidase activity

NTPDase and 5'-nucleotidase activity in synaptosomes from cerebral cortex are shown in Figure 1 (A, B and C). ATP and ADP hydrolysis were decreased ($P < 0.05$) in synaptosomes of rabbits infected with BoHV-5 in relation to the control group on day 7 p.i. (Figure 1- A, B). The results showed no statistical differences in the AMP hydrolysis in relation to the control group at the same day (Figure 1. C). On day 12 p.i., ADP and AMP hydrolysis were decreased ($P < 0.05$) in synaptosomes of the infected group when compared with the control group (Figure 1- B, C); however, no differences were observed in the ATP hydrolysis (Figure 1- A).

In relation to the NTPDase and 5'-nucleotidase activity in synaptosomes from hippocampus, the results are shown in Figure 2 (A, B and C). On day 7 p.i., it was observed an increase ($P < 0.05$) in the ATP, ADP and AMP hydrolysis in synaptosomes of infected rabbits in relation to the control group (Figure 2- A, B, C), while on day 12 p.i an increase ($P < 0.05$) in ATP and ADP hydrolysis was observed (Figure 2- A, B) when compared with the control group; however, no statistical difference was found between groups regarding the AMP hydrolysis (Figure 2- C).

Discussion

BoHV-5 infection, in early stages, frequently is not associated with pronounced histological changes and/or the presence of a significant number of neurons presenting viral antigens (Dezengrini et al. 2009). Thus, there is the possibility that the signaling pathways involved in the modulation of neuroinflammation may be implicated in the neuropathogenesis of BoHV-5 infection. Furthermore, viral infections alter or can be modulated by different components of the purinergic system, for example NTPDase-6 (CD39L2) is required for Foot-and-Mouth disease virus replication (Piccone et al. 2009) and UTP through interaction with purinergic receptors P2Y4 increases the production of antibodies against the rabies virus (Iwaki et al, 2014). Furthermore, infection by herpes simplex virus may influence the adenosine metabolism by increasing adenosine deaminase and 5'-nucleotidase levels (Zoppellaro et al. 2013) and adenosine deaminase inhibitors have been implicated in the *in vitro* reduction of HSV-1 replication (Williams and Lerner 1975). In addition, several studies have shown altered ectonucleotidase activity and expression associated with various pathologies (Trams and Lauter 1978; Glass et al. 1996; Nagy et al. 1997; Braun et al. 1998; Lunkes et al. 2004; Nedeljkovic et al. 2006; Lavrnja et al.

2009; Gandelman et al. 2010). In this line, the present study explored the effects of BoHV-5 infection on NTPDase and 5'-nucleotidase activities in the synaptosomes from the cerebral cortex and hippocampus of experimentally infected rabbits.

The results of the present work demonstrated that NTPDase and 5'-nucleotidase activities were decreased in synaptosomes from the cerebral cortex of rabbits infected with BoHV-5. In contrast to these findings, an increased ectonucleotidase activity was observed in synaptosomes from the hippocampus of infected animals. However, the distribution of purinergic receptors and the ectonucleotidases activity are heterogeneous and can vary from the specific cell types which produce the enzymes in the different brain regions (Thompson et al. 1990; Kegel et al. 1997; Zimmermann 2001).

The signaling actions induced by purinergic pathway are correlated to the activity of a group of ectonucleotidases, which includes NTPDase (ATP diphosphohydrolase, apyrase, CD39, EC 3.6.1.5) and a 5'-nucleotidase (ecto-5'-nucleotidase, CD73, EC 3.1.3.5). These ecto-enzymes trigger enzymatic conversion of ATP to adenosine, an important neuromodulator (Zimmermann 1996; Yegutkin 2008). Also, these enzymes can modulate the activation of P2 and P1 receptors by controlling extracellular ATP and adenosine levels in the synaptic cleft (Bonan et al. 2001).

ATP may be related to the inflammatory response and neurotoxicity, since it is an important neurotransmitter (Edwards et al. 1992; Agresti et al. 2005) and it is known as an activator of other inflammatory mediators against infectious diseases (Bours et al. 2006). Brain injuries induce massive release of ATP into the extracellular milieu (Fields and Burnstock 2006). In this circumstances, ATP activates the NOD-like receptor protein 2 inflammasome in astrocytes (Minkiewicz et al. 2013), resulting in the secretion of IL-1 β , which promotes the induction of a reactive astrocytic phenotype (Dunn et al. 2002). Thus, ATP may be important to initiate an inflammatory reaction, necessary to control early stages of infection and limit the virus spread to different areas of the CNS.

However, the actions induced by extracellular ATP are under the control of ectonucleotidases (Burnstock 2006). Furthermore, was demonstrated in this study that rabbits infected with BoHV-5 showed decreased NTPDase activity in synaptosomes from cerebral cortex on day 7 p.i., preceding the development of neurological signs, and a diminished ADP and AMP hydrolysis on day 12 p.i., in the same brain area. A decreased ectonucleotidase activity leading to an abnormal amount of the neurotransmitter ATP, which is less hydrolyzed in synapses and consequently promotes an increase in the levels of intracellular calcium mediated by P2X receptors, and this event, could represent a significant damage to the cells (Edwards et al. 1992). Also, ATP could lead to excitotoxicity by excitatory neurotransmitters release, such as glutamate (Lima et al. 2007). Thus, it is reasonable suggest that the decrease in NTPDase activity can contributing for the development of neurological disease observed during BoHV-5 infection, because decreased ATP hydrolysis contribute to neurotoxicity and neuronal dysfunction, leading to the production of neurological signs, including seizures.

Seizures are a classical and severe sign observed during neurological disease associated with BoHV-5 infection in rabbits (Meyer et al. 1996; Chowdhury et al. 1997; Silva et al. 1999; Dezengrini et al. 2009; Machado et al. 2013) and has been related to deficiency of some ectonucleotidase activities (Trams and Lauter 1978; Nagy et al. 1990; Young and Dragunow 1994; Nagy et al. 1997). Furthermore, several studies have shown that adenosine has potent anticonvulsant effects, with these effects probably being mediated by A1 receptors (Chin 1989; Young and Dragunow 1994; Glass et al. 1996) Adenosine could also modulate seizure activity by

depress the release of a variety of neurotransmitters, including glutamate, acetylcholine, noradrenaline and dopamine (Schubert and Mitzdorf 1979; Di Iorio et al. 1998). In our study, 5'-nucleotidase activity was decreased in the cortex of infected rabbits only at day 12 p.i., when these animals shown neurological signs, including seizures, such deficiency in AMP hydrolysis can result in diminished levels of adenosine, an endogenous anticonvulsivant, and might delay termination of the seizures (Dragunow 1985; Dragunow et al. 1990; During and Spencer 1992).

On the other hand, an increased NTPDase and 5'-nucleotidase activity was observed in synaptosomes from the hippocampus of BoHV-5 infected rabbits at 7 days p.i. On this early stage of infection, occurs a local increase of adenosine production, providing an anti-inflammatory microenvironment, which may facilitate entry of the virus into the target cell. The difference in the activity of ectonucleotidases between the cerebral cortex and hippocampus can be related to the difference in the BoHV-5 infectivity, once the viral antigen and histological changes can be detected primarily in cortical neurons (Machado et al. 2013; Dezengrini et al. 2009) and the hippocampus and thalamus are the last areas to be infected during viral dissemination within the brain (Dezengrini et al. 2009). Also, it is suggested that the increased activity in hippocampus may be related to the hippocampus granule cells and to the presence of mossy fibers that synapse on CA3 pyramidal hippocampal neurons and contain one of the highest concentrations of Zn^{2+} in the brain (Crawford and Connor 1972), that can enhances the activity of the NTPDase (unpublished results of Handa and Guidotti cited by Wang and Guidotti 1998). Elevated ectonucleotidase activity also has been implicated in certain neurological diseases involving tissue destruction (Kreutzberg and Barron 1978; Burgisser et al. 1987) and in experimental models of seizure diseases (Fujikawa et al. 1988; Nagy et al. 1990). Enhanced synaptosomal NTPDase activities in the hippocampal region could be a compensatory reaction of neurons to the seizure, once large amounts of ATP are probably co-released with other neurotransmitters in the brain of infected animal. In order to increase adenosine production, a molecule with neuroprotection proprieties, all members of the purinergic cascade for ATP hydrolysis should function at an elevated rate. However, at day 12 p.i., when rabbits presented the neurological signs of BoHV-5 infection none enhancement in the 5'-nucleotidase activity was found in the synaptosomes from hippocampus. Thus this fact may have contributed to the development and maintenance of the neurological signs, once this brain area is frequently implicated in seizure generation (Benardo and Pedley 1985).

In summary, during BoHV-5 acute infection altered ectonucleotidase activity was observed in synaptosomes of experimentally infected rabbits. In cerebral cortex, one of the mostly affected areas of the natural or experimentally infected animals, a decreased ectonucleotidases activity may lead with an extracellular accumulation of ATP. This neurotransmitter accumulation is implied in excitotoxicity and may be associated to the development of neurological signs observed in infected rabbits. Also, an increased ectonucleotidase activity in hippocampus synaptosomes can occurs in order to produce adenosine, a neuroprotective nucleoside. However, when the animals presented neurological signs, no alteration in 5'-nucleotidase activity was found, which may be implicated in maintenance of neurological signs. Taken together, these results might contribute to a better understanding of the neuropathogenesis of BoHV-5 infection, since this is the first study to investigate the effects of this viral disease in ectonucleotidase activity, enzymes that contribute to the maintenance of physiological levels of extracellular ATP and adenosine, constituting a considerable point of regulation in several physiological and pathological conditions.

Acknowledgments

The authors thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico) for funding and fellowships; and CAPES (Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior) for fellowships.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Agresti C, Meomartini ME, Amadio S, Ambrosini E, Serafini B, Franchini L (2005) ATP regulates oligodendrocyte progenitor migration, proliferation, and differentiation: involvement of metabotropic P2 receptors. *Brain Res* 48:157–165.
- Bagust TJ, Clark L (1972) Pathogenesis of meningoencephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. *J Comp Pathol* 82:375-383.
- Belknap EB, Collins JK, Ayers VK, Schultheiss PC (1994) Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 5 (BHV-5). *Vet Pathol* 31:358-365.
- Benardo LS, Pedley TA (1985) Cellular mechanisms of focal epileptogenesis. In: Pedley TA, Meldrum BS (eds) *Recent Advances in Epilepsy*, Churchill Livingstone, Edinburgh, pp. 1-17.
- Bonan CD, Schetinger MRC, Battastini AMO, Sarkis JJF (2001) Ectonucleotidases and Synaptic Plasticity: implications in physiological and pathological conditions. *Drug Dev Res* 52:57–65.
- Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC (2006) Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Therapeut* 112(2):358-404.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of Microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:218–254.
- Braun N, Zhu Y, Krieglstein J, Culmsee C, Zimmermann H (1998) Up-regulation of the enzyme chain hydrolyzing extracellular ATP after transient forebrain ischemia in the rat. *J Neurosci* 18:4891–4900.
- Burgisser P, Geering K, Rossier BC, Matthieu JM (1987) Three ATPase activities have an abnormal developmental time course in trembler sciatic nerves. *Develop Neurosci* 9:45-52.
- Burnstock G (2006) Purinergic signaling – an overview. *Novartis Found Symposium* 276:26–48.
- Carrilo BJ, Pospischil A, Dahme E (1983) Pathology of a bovine viral necrozing encephalitis in Argentina. *Zbl Vet Med B* 30: 161-168.
- Chan K, Delfert D, Junger KD (1986) A direct colorimetric assay for Ca²⁺ ATPase activity. *Anal Biochem* 157:375–378.
- Chin JH (1989) Adenosine receptors in brain: neuromodulation and role in epilepsy. *Ann Neurol* 26:695–698.

- Chowdhury SI, Lee BJ, Mosier D, Sur JH, Osorio FA, Kennedy G, Weiss ML (1997) Neuropathology of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) meningoencephalitis in a rabbit seizure model. *J Comp Pathol* 117(4):295-310.
- Constantin GM, Majeed M, Giagulli C, Piccio L, Kim JY, Butcher EC, Laudanna C (2000) Chemokines trigger immediate $\beta 2$ integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity* 13:759-769.
- Crawford IL, Connor JD (1972) Zinc in maturing rat brain: hippocampal concentration and localization. *J Neurochem* 19:1451-1458.
- Dezengrini R, Weiss M, Torres FD, Oliveira MS, Furian F, Mello CF, Weiblen R, Flores EF (2009) Bovine herpesvirus 5 induces an overproduction of nitric oxide in the brain of rabbits that correlates with virus dissemination and precedes the development of neurological signs. *J Neurovirol* 15:153-1639.
- Di Iorio P, Ballerini P, Caciagli F, Ciccarelli R (1998) Purinoceptor-mediated modulation of purine and neurotransmitter release from nervous tissue. *Pharmacol Res* 37(3):169-78.
- Diel DG, Fonseca ET, Souza SF, Mazzanti A, Bauermann FV, Weiblen R, Flores EF (2005) Bovine herpesvirus 5 may use the olfactory and trigeminal pathways to invade the central nervous system of rabbits, depending upon the route of inoculation. *Braz J Vet Res* 25:164-170.
- Dragunow M (1990) Adenosine receptor antagonism accounts for the seizure-prolonging effects of aminophylline. *Pharmacol Biochem Behav* 36:751-755.
- Dragunow M, Goddard GV, Lavery R (1985) Is adenosine an endogenous anticonvulsant? *Epilepsia* 26:480-487.
- Dunn SL, Young EA, Hall MD, McNulty S (2002) Activation of astrocyte intracellular signaling pathways by interleukin-1 in rat primary striatal cultures. *Glia* 37:31-42.
- During MJ, Spencer DD (1992) Adenosine: a potential mediator of seizure arrest and postictal refractoriness. *Ann Neuro* 32:618-624.
- Edwards FA, Gibb AJ, Colquhoun D (1992) ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature* 359:144-147.
- Fields RD, Bursnstock G (2006) Purinergic signaling in neuron – glia interactions. *Nat Rev Neurosci* 7:423-436.
- Fujikawa DG, Vannucci RC, Dwyer BE, Wasterlain CG (1988) Generalized seizures deplete brain energy reserves in normoxemic newborn monkeys. *Brain Research* 454:51-59.
- Gandelman M, Peluffo H, Beckman JS, Cassina P, Barbeito L (2010) Extracellular ATP and the P2X7 receptor in astrocyte-mediated motor neuron death: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroinflamm* 7:33.
- Glass CK, Saijo K, Winner B (2010) Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* 140:918-934.
- Glass M, Faull RL, Bullock JY, Jansen K, Mee EW, Walker EB, Synek BJ, Dragunow M (1996) Loss of A1 adenosine receptors in human temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 710:56-68.
- Heymann D, Reddington M, Kreutzberg GM (1984) Subcellular localization of 5'-nucleotidase in rat brain. *J Neurochem* 43:263-273.

- Iwaki Y, Sakai Y, Ochiai K, Umemura T, Sunden Y (2014) Enhancement of antibody production against rabies virus by uridine 5'-triphosphate in mice. *Microbes Environ* 16:196-202.
- Kegel B, Braun N, Heine P, Maliszewski CR, Zimmermann H (1997) An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. *Neuropharmacology* 36:1189–1200.
- Kreutzberg GW, Barron KD (1978) 5'-Nucleotidase of microglial cells in the facial nucleus during axonal reaction. *J Neurocytol* 7:601-610.
- Lavrnja I, Bjelobaba I, Stojiljkovic M, Pekovic S, Mostarica-Stojkovic M, Stosic-Grujicic S, Nedeljkovic N (2009) Time-course changes in ectonucleotidase activities during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurochem Int* 55:193–198.
- Lee BJ, Weiss ML, Mosier D, Chowdhury SI (1999) Spread of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in the rabbit brain after intranasal inoculation. *J Neurovirol* 5:474-484.
- Lima RR, Costa AMR, De Souza RD, Gosmes-Leal W (2007) Secondary neurodegeneration and excitotoxicity. *Rev Para Med* 21:27–31.
- Lunkes GI, Lunkes DS, Morsch VM, Mazzanti CM, Morsch AL, Miron VR, Schetinger MR (2004) NPTDase and 5'-nucleotidase activities in rats with alloxan-induced diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 65(1):1-6.
- Machado GF, Bernardi F, Hosomi FYM, Peiró JR, Weiblen R, Roehle PM, Alessi AC, Melo GD, Ramos AT, Maiorka PC (2013) Bovine herpesvirus-5 infection in a rabbit experimental model: Immunohistochemical study of the cellular response in the CNS. *Microb Pathogenesis* 57:10-16.
- 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.
- Minkiewicz J, de Rivero Vaccari JP, Keane RW (2013) Human astrocytes express a novel NLRP2 inflammasome. *Glia* 61:1113–1121.
- Nagy A, Delgado-Escueta AV (1984) Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using nontoxic isosmotic gradient material (Percoll). *J Neurochem* 43:1114–1123.
- Nagy AK, Houser CR, Delgado-Escueta AV (1990) Synaptosomal ATPase activities in temporal cortex and hippocampal formation of humans with focal epilepsy. *Brain Res* 529(1-2):192-201.
- Nagy AK, Walton NY, Treiman DM (1997) Reduced cortical ecto-ATPase activity in rat brains during prolonged status epilepticus induced by sequential administration by lithium and pilocarpine. *Mol Chem Neuropathol* 31:135–147.
- Nedeljkovic N, Bjelobaba I, Subasic S, Lavrnja I, Pekovic S, Stojkov D, Vjestica A, Rakic L, Stojiljkovic M (2006) Up-regulation of ectonucleotidase activity after cortical stab injury in rat. *Cell Biol Int* 30:541–546.
- Perez SE, Bretschneider G, Leunda MR, Osorio FA, Flores EF, Odeon AC (2002). Primary infection, latency, and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. *Vet Pathol* 39:437-444.
- Piccone ME, Feng Y, Chang ACY, Mosseri R, Lu Q, Kutish GF, Lu Z, Burrage TG, Gooch C, Rock DL, Cohen SN (2009) Identification of Cellular Genes Affecting the Infectivity of Foot-and-Mouth Disease Virus. *J Virol* 83(13):6681–6688.

- Schetinger MRC, Porto NM, Moretto MB, Morsch VM, Rocha JBT, Vieira V (2000) New benzodiazepines alter acetylcholinesterase and ATPDase activities. *Neuroch Res* 25:949–955.
- Schubert P, Mitzdorf U (1979) Analysis and quantitative evaluation of the depressive effect of adenosine on evoked potentials in hippocampal slices, *Brain Res* 172:117-130.
- Silva AM, Flores EF, Weiblen R, Canto MC, Irigoyen LF, Roehe PM, Sousa RS (1999) Pathogenesis of meningoencephalitis in rabbits by bovine herpesvirus type-5 (BHV-5). *Rev Microbiol* 30:22-31.
- Thompson LF, Ruedi JM, Glass A, Moldenhauer G, Moller P, Low MG, Klemens MR, Massaia M, Lucas AH (1990) Production and characterization of monoclonal antibodies to the glycosyl phosphatidylinositol-anchored lymphocyte differentiation antigen ecto-5' nucleotidase (CD73). *Tissue Antigens* 35:9–19.
- Trams EG, Lauter CJ (1978) Ecto-ATPase deficiency in glia of seizureprone mice. *Nature* 271:270–271.
- Wang T, Guidotti G (1998) Widespread expression of ecto-apyrase CD39 in the central nervous system *Brain Res* 790: 318–322.
- Williams BB, Lerner AM (1975) Antiviral activity of an adenosine deaminase inhibitor: decreased replication of herpes simplex virus. *J Infect Dis* 131(6):673-677.
- Yegutkin G (2008) Nucleotide and nucleoside converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 1783:673-694.
- Young D, Dragunow M (1994) Status epilepticus may be caused by loss of adenosine anticonvulsant mechanisms. *Neuroscience* 58:245–261.
- Zimmermann H (1996) Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog Neurobiol* 49(6):589-618.
- Zimmermann H (2001) Ectonucleotidases: some developments and a note on nomenclature. *Drug Dev Res* 52:44–56.
- Zoppellaro C, Bin A, Brun P, Banzato S, Macchi V, Castagliuolo I, Giron MC (2013) Adenosine-Mediated Enteric Neuromuscular Function Is Affected during Herpes Simplex Virus Type 1 Infection of Rat Enteric Nervous System. *PLoS ONE* 8(8):e72648.

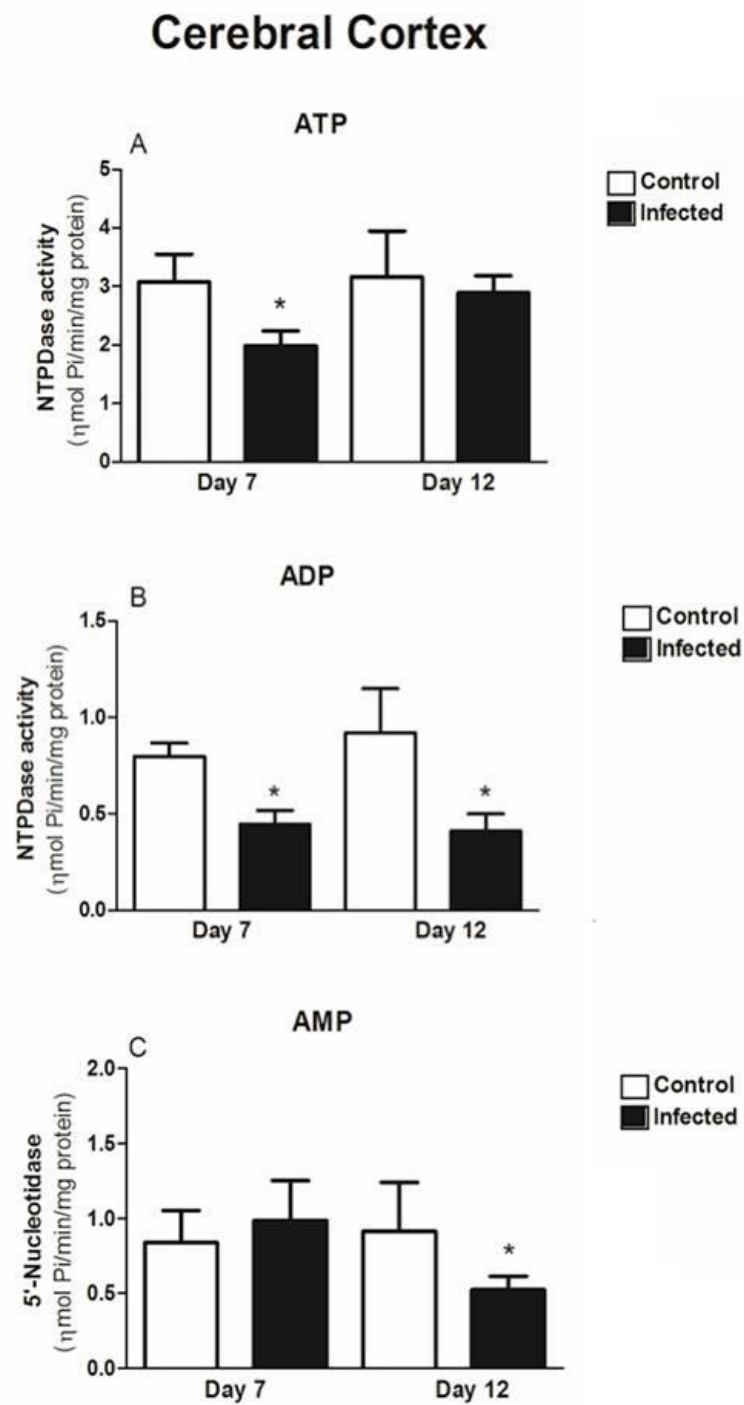


Fig 1 NTPDase activity in synaptosomes from cerebral cortex of rabbits infected with BoHV-5 using ATP (A) and ADP (B) as substrate and 5'-nucleotidase activity using AMP (C) as substrate, on day 7 p.i. (n=5) and 12 p.i. (n=5 - control group; n=6 – infected group). Bars represent mean SEM. * indicates a significant $P < 0.05$

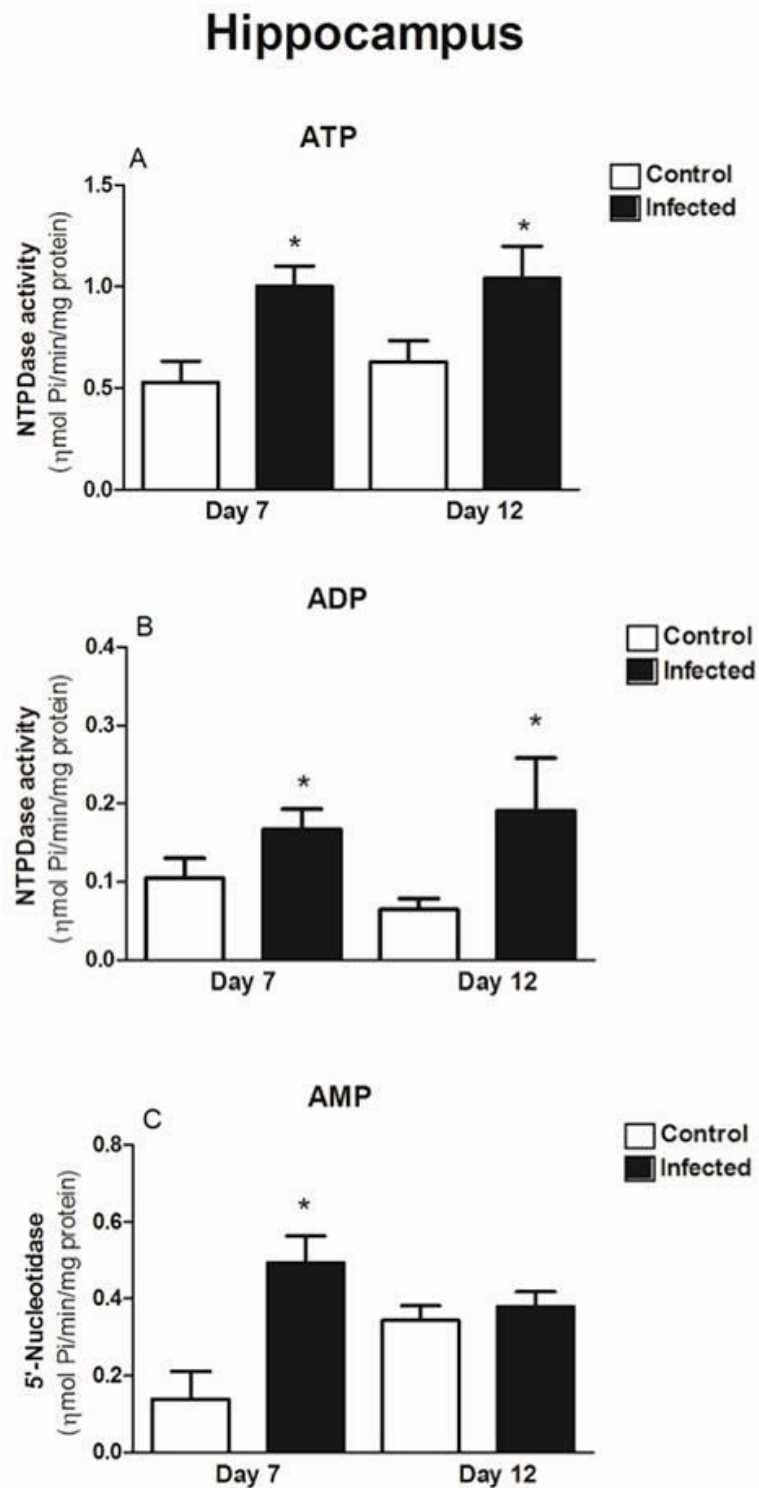


Fig 2 NTPDase activity in synaptosomes from hippocampus of rabbits infected with BoHV-5 using ATP (A) and ADP (B) as substrate and 5'-nucleotidase activity using AMP (C) as substrate, on day 7 p.i. (n=5) and 12 p.i. (n=5 - control group; n=6 - infected group). Bars represent mean SEM. * indicates a significant $P < 0.05$

3 MANUSCRITO II

Herpesvírus bovino tipo-5: Alterações oxidativas no encéfalo de coelhos experimentalmente infectados

Cássia B. da Silva; Patricia Wolkmer; Francine C. Paim; Guilherme L. Dornelles; Fátima H. Abdalla; Cássio A. B. Ruppel; Débora Rosolen; Eduardo F. Flores; Cinthia M. Andrade; Sonia T.A. Lopes.

Artigo submetido para: *Ciência Rural*

**Herpesvírus bovino tipo-5: Alterações oxidativas no encéfalo de coelhos
experimentalmente infectados**

**Bovine herpesvirus type-5: Oxidative changes in the brain of rabbits experimentally
infected**

Cássia B. da Silva ^{1*}; Patricia Wolkmer ²; Francine C. Paim ¹; Guilherme L. Dornelles ¹;
Fátima H. Abdalla ¹; Cássio A. B. Ruppel ¹; Débora Rosolen ¹; Eduardo F. Flores ¹; Cinthia
M. Andrade ¹; Sonia T.A. Lopes ¹

RESUMO

O herpesvírus bovino tipo 5 é um agente importante de meningoencefalite em bovinos. Após replicação na mucosa nasal, o vírus invade o sistema nervoso central, levando a uma resposta linfoproliferativa. A presença do vírus ativa o sistema imunológico e mediadores inflamatórios a fim de controlar a infecção. Fagócitos ativados induzem a liberação de citocinas e espécies reativas de oxigênio, favorecendo, assim, a resposta à infecção. As espécies reativas são importantes na patogênese viral, pois há um papel modulatório positivo destas substâncias na ativação da resposta imune. Assim, o objetivo deste trabalho é analisar o papel das espécies reativas de oxigênio e a influência dos mecanismos antioxidantes na patogênese da meningoencefalite herpética. Para isso, foram utilizados coelhos experimentalmente infectados com BoHV-5 e avaliados os níveis de TBARS, espécies reativas de oxigênio e a atividade de antioxidantes como os tióis não-proteicos e a glutatona reduzida em estruturas encefálicas e a catalase sanguínea. Durante a infecção pelo BoHV-5 foi possível observar aumento dos níveis de TBARS e espécies reativas de oxigênio e

¹Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria – RS, Brasil

² Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ), Cruz Alta - RS, Brasil

*Cássia B. da Silva, e-mail: cassiabagolin@hotmail.com

diminuição dos níveis de glutathione reduzida. Com estes estudos, pode-se concluir que os mecanismos pró-oxidantes podem estar envolvidos na patogenia da meningoencefalite herpética e contribuir para o desenvolvimento de sinais clínicos observados durante a infecção viral.

Palavras-chave: Meningoencefalite herpética; lipoperoxidação; estresse oxidativo; antioxidantes.

ABSTRACT

Bovine herpesvirus type-5 is an important agent of meningoencephalitis in cattle. After replication in the nasal mucosa, the virus invades the central nervous system leading to a lymphoproliferative response. The presence of the virus activates the immune system and inflammatory mediators in order to control the infection. Activated phagocytes induce the release of cytokines and reactive oxygen species enhancing the response to infection. The reactive species are important in viral pathogenesis, as there is a positive modulatory role of these substances in the activation of the immune response. The aim of this study is to analyze the role of reactive oxygen species and the influence of antioxidant mechanisms in the pathogenesis of herpetic meningoencephalitis. For this purpose, rabbits were experimentally infected with BoHV-5 and the levels of TBARS, reactive oxygen species and antioxidant activity as non-protein thiols and reduced glutathione were evaluated in brain structures and, also, blood catalase. During the BoHV-5 infection was observed an increase in TBARS levels and reactive oxygen species and decreased levels of reduced glutathione. In conclusion, pro-oxidant mechanisms may be involved in the pathogenesis of herpetic meningoencephalitis and can contribute to the development of clinical signs observed during viral infection.

Key-words: Herpetic meningoencephalitis; lipid peroxidation; oxidative stress; antioxidants.

INTRODUÇÃO

O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) é associado à infecções neurológicas acompanhadas de meningoencefalite, acometendo principalmente bovinos jovens. A doença neurológica desenvolvida pelos animais é consequência da replicação e invasão viral progressiva no encéfalo. Este vírus apresenta um ciclo de replicação rápido e lítico *in vitro* e possui capacidade de infectar células epiteliais e nervosas e estabelecer latência em neurônios ganglionares *in vivo*. Durante a infecção aguda, o BoHV-5 replica nas células da mucosa nasal, invadindo as terminações dos nervos autonômicos e sensoriais que inervam a mucosa, sobretudo as terminações do nervo olfatório e ramo maxilar do nervo trigêmeo (LEE et al., 1999). A seguir, os vírions invadem o sistema nervoso central (SNC), principalmente pela via olfatória, no sentido retrógrado a partir da mucosa nasal (CHOWDHURY et al., 1997; LEE et al., 1999; DIEL et al., 2005).

Em resposta à infecção viral ocorrem reações inflamatórias e celulares inespecíficas, como a indução de moléculas de interferon (INF), estas podem interferir diretamente na replicação viral ou ainda modular a resposta imune pelo recrutamento de células efetoras, como neutrófilos e macrófagos (LANDOLFO, 1995; BIRON, 1999). Estas células, com o intuito de destruir microrganismos invasores, produzem espécies reativas, tais como superóxido e óxido nítrico (ON), que acabarão por destruir os elementos patogênicos. Este processo possui baixa especificidade, ou seja, ao mesmo tempo em que supera adaptações genéticas dos elementos invasores, também danifica as células do próprio organismo hospedeiro. Assim, se houver estímulo exagerado na produção de espécies reativas, associado a uma falha da defesa antioxidante ocorrerá o estresse oxidativo (ROOS et al., 2003).

A redução do oxigênio (O_2) para fornecimento de energia através da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, é necessária para a manutenção das inúmeras formas de vida. Entretanto o O_2 é considerado um gás tóxico e mutagênico e gera subprodutos

altamente reativos denominados radicais livres. (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). No organismo, as espécies reativas de oxigênio (ERO) estão envolvidas na produção de energia, na fagocitose, na regulação do crescimento celular, na sinalização intercelular e na síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, o excesso de ERO é responsável por várias ações deletérias, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA. (RADÁK et al., 1999; DONNE et al., 2003; BARREIROS e DAVID, 2006).

Os danos induzidas pelas ERO alteram e prejudicam o metabolismo intracelular, podendo inclusive ocasionar a morte celular (MANOHARAN et al., 2004). Porém, as células são normalmente protegidas do dano oxidativo por um sistema de defesa antioxidante, que abrange proteínas, enzimas e compostos químicos. A defesa antioxidante enzimática é representada principalmente, pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), enquanto nas defesas antioxidantes não enzimáticas destacam-se os compostos orgânicos contendo grupos sulfidril (SH), denominados tióis (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

As ERO são importantes na patogênese viral, pois há um papel modulatório positivo destas substâncias na ativação da resposta imune. A ativação de fagócitos induzida por vírus está associada ao estresse oxidativo, não só porque estas células podem liberar ERO, mas também pela secreção de citocinas pró-oxidantes como o fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-1 (PETERHANS, 1997b). Dessa forma, substâncias oxidantes podem estar envolvidas em diversas patologias, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (BARREIROS e DAVID, 2006).

Aumento da geração de ERO e ERN é uma característica de muitas infecções virais e pode ser causada por efeitos diretos dos vírus nas células e pela resposta inflamatória do

hospedeiro (SCHWARZ, 1996; PETERHANS, 1997a, b; AKAIKE et al, 1998; AKAIKE, 2001). Em cultura de tecidos, diversos vírus foram capazes de induzir o aumento da produção de ERO e ERN. Tais efeitos das infecções virais foram descritas em estudos com cultivos de monócitos e macrófagos diferenciados, células de neuroblastoma murino e da artéria coronária e células do músculo liso, após a infecção com vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) (LOPEZ-GUERRERO e ALONSO, 1997; FUJIOKA et al., 2000), vírus da encefalite japonesa (LIAO et al., 2002, LIN et al., 2004) e citomegalovírus humano (SPEIR, 2000), respectivamente.

Os mecanismos oxidantes e antioxidantes, através da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou da ação de enzimas antioxidantes, como a glutatona peroxidase, podem atuar tanto na defesa do organismo contra a infecção quanto no estímulo à replicação viral e patogênese da doença (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Neste contexto, o objetivo deste trabalho é avaliar a participação de mecanismos oxidantes e antioxidantes na infecção viral pelo BoHV-5, utilizando coelhos como modelo experimental. Para isso, serão mensuradas a atividade dos antioxidantes catalase (CAT), glutatona reduzida (GSH) e tióis não-proteicos (TSH) e quantificadas as espécies reativas de oxigênio totais (ERO-totais) e as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), buscando esclarecer o papel destas substâncias na modulação da resposta imune e na etiologia das desordens neurológicas nos animais infectados por BoHV-5.

METODOLOGIA

Experimento 1

Foram utilizados 23 coelhos Nova Zelândia, com idade média de 25 dias. Os coelhos foram mantidos em gaiolas em uma sala de experimentação com temperatura controlada ($20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e com livre acesso à água e ração comercial para coelhos. Os animais foram

submetidos a um período de adaptação de seis dias. Os procedimentos aqui descritos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Santa Maria (nº parecer: 055/2013).

Desenho experimental

Os animais foram divididos em quatro grupos, sendo dois grupos controle (C7 e C12) – não infectados – compostos por 5 animais em cada grupo; e dois grupos teste (T7 e T12) inoculados com BoHV-5, compostos por 5 animais no grupo T7 e 8 animais no grupo T12. Após anestesia com cetamina (50mg/Kg) e xilazina (5mg/Kg) os coelhos foram inoculados pela via intranasal. Para se conseguir a infecção desejada, no grupo teste, foi utilizado 1 ml de suspensão viral contendo aproximadamente $10^{7.5}$ TCID₅₀ da cepa parental SV-507/99. Os animais do grupo controle receberam 1 ml apenas do meio essencial mínimo (MEM). Após a inoculação os coelhos foram monitorados quanto aos aspectos clínicos diariamente durante todo o experimento.

Coleta e preparação das amostras

Para a coleta de material, os coelhos foram anestesiados com cetamina, xilazina e isoflurano nos dias 7 e 12 pós-inoculação (p.i.). Sangue foi coletado por punção intracardíaca e uma alíquota foi estocada em tubos com citrato de sódio, o restante foi armazenado em tubos sem anticoagulante para obtenção de soro. Após a coleta sanguínea, os animais foram submetidos à eutanásia pelo aprofundamento da anestesia e decapitação. Posteriormente, foi realizada a abertura da caixa craniana para remoção do encéfalo e separação das seguintes estruturas encefálicas: córtex cerebral, hipocampo, estriado e cerebelo. Uma fração de cada estrutura foi homogeneizada, separadamente, em solução

tampão Tris-HCl 10 mmol, pH 7.4, gelado (1:10, p/v). As amostras foram congeladas a -80°C até o momento das análises.

Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica nas estruturas encefálicas foi determinada por meio do teste de formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), em espectrofotômetro a 535nm, conforme descrito por YOSHIOKA et al. (1979) e OHKAWA et al. (1979). A quantidade de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi expressa em nanomoles de malondialdeído por grama de tecido (nmol MDA/g de tecido).

Atividade da Catalase

A atividade da catalase (CAT) em sangue total foi determinada por decomposição do H₂O₂ e a leitura realizada em espectrofotometria a 240nm pelo método de NELSON e KIESOW (1972). A atividade foi expressa como $\times 10^{-9}$ moles/mg proteína.

Determinação de tióis totais (TSH) e níveis de glutathiona reduzida (GSH)

Os níveis de tióis totais foram determinados por espectrofotometria de acordo com ELLMAN (1959). Uma alíquota de 200 µL de amostra foi adicionada a um volume final de 900 µL de solução tampão. Após foram adicionados 50 µL de DTNB (10mM) e o produto da reação foi mensurado em 412 nm. Uma curva padrão, utilizando cisteína como padrão, foi construída para calcular os níveis de tióis nas amostras de tecidos. Os resultados foram expresos como mmol SH /g de tecido.

Para a determinação de GSH, 200 µL de amostra foi precipitado com 200 µL de ácido tricloroacético 4% (v/v) seguido por centrifugação (1050g, 10 min), o sobrenadante desta centrifugação foi utilizado para análise. O ensaio colorimétrico foi realizado em tampão de

fosfato 1 M, pH 7,4. Uma curva padrão, utilizando glutationa como padrão foi construída para calcular os níveis de -SH nas amostras de tecido.

Determinação de proteínas

O conteúdo proteico das amostras foi determinado de acordo com BRADFORD (1976) utilizando albumina bovina sérica como padrão.

Experimento 2

Foram utilizados 19 coelhos Nova Zelândia, com idade média de 25 dias. Os coelhos foram mantidos em gaiolas em uma sala de experimentação com temperatura controlada ($20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e com livre acesso à água e ração comercial para coelhos. Os animais foram submetidos a um período de adaptação de seis dias. Os procedimentos aqui descritos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Santa Maria (nº parecer: 055/2013).

Desenho experimental

Os animais foram divididos em dois grupos, sendo um grupo controle (sadios) composto por 7 animais e um grupo teste (infectados com BoHV-5) composto por 12 animais. Após anestesia com cetamina (50mg/Kg) e xilazina (5mg/Kg) os coelhos foram inoculados pela via intranasal. Para se conseguir a infecção desejada, no grupo teste, foi utilizado 1,4 ml de suspensão viral contendo aproximadamente 10^8TCID_{50} da cepa parental SV-507/99. Os animais do grupo controle receberam 1,4 ml apenas do meio essencial mínimo (MEM). Após a inoculação os coelhos foram monitorados quanto aos aspectos clínicos diariamente durante todo o experimento.

Coleta e preparação das amostras

As coletas de material foram realizadas nos dias em que os animais infectados apresentaram sinais clínicos como opistótono e convulsões (dias 6 e 7 pós-inoculação - p.i.). Os coelhos foram anestesiados com cetamina, xilazina e isofluorano e submetidos à eutanásia pelo aprofundamento da anestesia e decapitação. Posteriormente, foi realizada a abertura da caixa craniana para remoção do encéfalo e separação das seguintes estruturas encefálicas: córtex cerebral, hipocampo, estriado e cerebelo. Uma fração de cada estrutura foi homogeneizada, separadamente, em solução tampão Tris-HCl 10 mmol, pH 7.4, gelado (1:10, p/v). As amostras foram congeladas a -80°C até o momento das análises.

Quantificação das espécies reativas de oxigênio totais (ERO-totais)

A formação de espécies reativas nas estruturas encefálicas foi estimada de acordo com um relatório anterior por ALI et al. (1992). Uma alíquota de amostra foi incubada com 10 μl de 2', 7'-diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA, 10 μM). Os níveis de espécies reativas foram determinados por um método de fluorescência. A oxidação de DCFH-DA para a fluorescente diclorofluoresceína (DCF) foi mensurado para a detecção de espécies reativas. A intensidade de emissão de fluorescência de DCF foi registrada a 525 e 488 nm de excitação 60 min após a adição de DCFH-DA ao meio.

Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelo teste *t-student*, valores com probabilidade menor que 5% ($P < 0,05$) foram considerados estatisticamente diferentes.

RESULTADOS

Experimento 1

Curso da infecção

Aos 7 dias p.i. nenhum animal dos grupos infectados (T7 e T12) apresentaram sinais clínicos. Para obter uma amostra de sangue e encéfalo destes animais, cinco coelhos infectados (grupo T7) e cinco animais controles (grupo C7) foram submetidos à eutanásia neste dia. Dois coelhos apresentaram sinais neurológicos da infecção (opistótono e convulsões) e morreram em decorrência da infecção pelo BoHV-5 no dia 10 p.i. No dia 12 p.i., todos os animais infectados (n=6) apresentaram sinais clínicos da infecção pelo BoHV-5, como apatia e secreção nasal. No entanto, somente 4 animais apresentaram sinais neurológicos clássicos da meningite herpética, como bruxismo, andar em círculos, opistótono e convulsões.

Peroxidação lipídica

No dia 7 p.i. os animais infectados apresentaram aumento nos níveis de TBARS ($P < 0,05$), precedendo o aparecimento dos sinais clínicos, somente no córtex cerebral e cerebelo, quando comparados ao grupo controle. Já aos 12 dias p.i., um aumento nos níveis de TBARS ($P < 0,05$) pode ser observado no córtex cerebral, hipocampo e estriado dos animais infectados em relação ao grupo controle, porém o cerebelo não apresentou alteração quanto à peroxidação lipídica neste dia (Figura 1).

Atividade da Catalase

Não houve diferença estatística quanto à atividade da catalase em sangue total quando comparados os grupos controles e os grupos testes (Figura 2), para ambos os dias (7 e 12 p.i.).

Níveis de glutathiona reduzida (GSH)

Foi observado uma redução nos níveis de glutathiona reduzida ($P < 0,05$), aos 7 dias p.i., no estriado e cerebelo dos animais infectados quando comparados ao grupo controle. Aos 12 dias p.i. não houve diferença estatística entre grupo teste e grupo controle para nenhuma estrutura encefálica analisada (Figura 3).

Tióis totais (TSH)

Não houve diferença estatística quanto à quantidade de tióis totais nas diferentes estruturas encefálicas avaliadas quando comparados os grupos controles e os grupos testes (Figura 4), para ambos os dias (7 e 12 p.i.).

Experimento 2

Curso da infecção

Aos 6 dias p.i., cinco animais infectados apresentaram sinais clínicos como opistótono e convulsões. Os demais coelhos ($n=7$) apresentaram sinais neurológicos da infecção pelo BoHV-5 (opistótono e convulsões) aos 7 dias p.i., destes, dois animais morreram em decorrência da infecção.

Espécies reativas de oxigênio totais (ERO-totais)

Foram observados níveis aumentados de ROS-totais ($P < 0,01$) no córtex cerebral, hipocampo e estriado dos animais infectados em relação ao grupo controle (Figura 5). Não houve diferença estatística quanto aos níveis de ERO-totais no cerebelo quando comparados os grupos, porém observa-se uma tendência ao aumento dos níveis.

DISCUSSÃO

As espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) desempenham um papel complexo em muitas doenças e na regulação metabólica. O fato de que as ERO e as ERN estão envolvidas no processo metabólico celular e processos fisiológicos tem grande relevância uma vez que os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios e dependem de processos fisiológicos das células de seus hospedeiros (ALBRECHT et al, 1992; BURDON, 1995). Assim, é possível que as ERO possam desempenhar importante papel na patogênese de muitas viroses, podendo influenciar a replicação viral, mas também servir como um mecanismo de defesa do hospedeiro. Porém é difícil distinguir se o vírus possui um papel primário ou secundário na injúria celular mediada por ERO (PASQUIER et al., 1994). Neste sentido, torna-se relevante a avaliação de parâmetros relacionados ao estresse oxidativo durante a infecção pelo vírus BoHV-5 em coelhos experimentalmente infectados.

Durante a infecção aguda pelo BoHV-5, após replicação inicial na mucosa nasal, ocorre invasão e replicação viral progressiva no encéfalo (LEE et al., 1999). O cérebro pode ser particularmente vulnerável aos danos oxidativos por possuir alta taxa de consumo de oxigênio, abundância de ácidos graxos poli-insaturados e lipídios, altas concentrações de ferro e capacidade antioxidante limitada (TORRES et al., 2007). Diversos vírus, como o herpesvírus simplex tipo-1 (HSV-1), são capazes de induzir o aumento da produção de ERO e ERN em diferentes tipos de cultivos (LOPEZ-GUERRERO e ALONSO, 1997; FUJIOKA et al., 2000). No presente trabalho, observa-se um aumento da produção de ERO (Figura 5) no córtex cerebral, hipocampo e estriado de coelhos experimentalmente infectados pelo BoHV-5 e apresentando sinais clínicos de meningoencefalite herpética.

Acredita-se que a elevação das ERO, ocorra devido ao estímulo inflamatório e ação de células fagocíticas. A formação das ERO durante a infecção viral tem grande importância, nas células as ERO são geradas *in vivo* por fagócitos ou linfócitos durante o processo

inflamatório, para combater ou controlar a proliferação viral (VALYI-NAGY e DERMODY, 2005). Muitas evidências sugerem que a formação de oxidantes resulta do processo ativo de defesa imune do SNC. Embora essenciais para a sobrevivência, estes processos podem ser ativados impropriamente e, por se tratar de um processo de baixa especificidade, acabam causando lesões aos neurônios promovendo a neurodegeneração. Algumas das células da glia encontradas no cérebro são fagócitos residentes chamados micróglia. Quando ativada, a micróglia produz superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (ON^{\bullet}). A produção excessiva destes compostos resulta em danos oxidativos às proteínas, DNA e principalmente lipídeos (SOHAL, 1993). O dano oxidativo resultante da produção de ERO, observado durante a infecção pelo BoHV-5, foi confirmado pela avaliação da peroxidação de lipídios de membrana o que resultou em aumento nos níveis de TBARS nas estruturas encefálicas avaliadas.

A avaliação dos níveis de TBARS é um método comum para a mensuração da peroxidação lipídica. Durante a infecção pelo BoHV-5 em coelhos foi possível observar um aumento nos níveis de TBARS, aos 7 dias p.i. no cerebelo e córtex cerebral, e, aos 12 dias p.i. no hipocampo, estriado e córtex cerebral (Figura 1).

Este aumento da peroxidação lipídica, nos animais infectados, provavelmente é resultado do aumento na produção de ERO que atacam ligações duplas ou triplas de ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares alterando sua conformação química inicial, estas reações após iniciarem se autoperpetuam. Como consequência, ocorrem alterações na coesão, fluidez, permeabilidade e funções metabólicas das células (CHIHUAILAF et al., 2002). Os produtos finais de decomposição da lipoperoxidação são inúmeros e incluem aldeídos altamente citotóxicos, como malondialdeído (MDA), acroleína, 4-hidroxi-2-trans-nonenal (HNE) e trans-2,4-decadienal (DDE) (MARTINEZ et al., 2003). O HNE parece ser especialmente citotóxico para células neuronais, já que, em alguns modelos animais, a

formação de HNE precede a morte destas células (HALLIWELL, 2001). Estes peróxidos, resultantes da lipoperoxidação, podem se difundir na circulação e transpor membranas celulares, causando danos ao DNA, RNA e proteínas por se ligarem covalentemente com estas moléculas e reagir com os centros nucleofílicos das células, resultando na disfunção de processos celulares vitais, tais como o transporte de membrana e respiração mitocondrial, podendo ocasionar morte celular (MENDEZ-ARMENTA et al., 2003; EL-DEMERDASH et al., 2004; KRISHNAKUMAR et al., 2012). Sabe-se que a neurodegeneração mediada por inflamação e desencadeada por infecções virais envolve a ativação de macrófagos residentes no encéfalo (microglia), que liberam fatores neurotóxicos e pró-inflamatórios, incluindo citocinas, radicais livres, óxido nítrico e eicosanóides que podem lesar neurônios e células gliais (WYSS-CORA et al., 2002). Desta forma o aumento nos níveis de TBARS nos animais infectados pelo BoHV-5 pode resultar em lesões celulares e conseqüentemente contribuir para o desenvolvimento dos sinais clínicos neurológicos apresentados pelos animais.

Dados semelhante foram observados por DEZENGRINI et al. (2009), os quais avaliaram a formação de ERN em coelhos infectados por BoHV-5. Os autores demonstraram aumento dos níveis de óxido nítrico durante a infecção pelo BoHV-5, estando correlacionados com a invasão e propagação viral no encéfalo. Essa elevação dos níveis de ON além dos limites usuais, também resulta em um processo citotóxico que pode ocasionar a morte neuronal, uma vez que a interação deste radical livre com o oxigênio molecular e o ânion superóxido leva a formação de nitratos e peroxinitritos (MONCADA et al, 1991). O peroxinitrito é um potente oxidante de diversas biomoléculas e possui ação citotóxica, pois pode induzir a peroxidação de lipídeos sem a exigência de metais de transição. Além disso, inibe o transporte de elétrons mitocondrial resultando na inibição da respiração celular e causa a oxidação dos grupos sulfidril de proteínas (MYATT e CUI, 2004).

Outro ponto importante a ser considerado é que muitos neurotransmissores são oxidáveis, principalmente durante o processo inflamatório no SNC. Dopamina, seu precursor levedopa e noradrenalina reagem com O_2 , gerando o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e quinonas e semiquinonas reativas. A oxidação dos neurotransmissores (dopamina, serotonina e noradrenalina) é um dos principais mecanismos de produção de H_2O_2 no cérebro, sendo prejudicial para o processo de neurotransmissão e promovendo a depleção de antioxidantes (ISCHIROPOULOS e BECKMAN, 2003).

Paralelo ao aumento da produção de ERO e dos níveis de TBARS nas diferentes estruturas cerebrais avaliadas neste trabalho, também foram observadas alterações no sistema antioxidante celular. Estas substâncias atuam como um sistema de proteção celular, com função de inibir os efeitos deletérios das ERO através do equilíbrio entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes (CHIHUAILAF et al., 2002; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Neste sentido, a GSH possui papel central no sistema de defesa antioxidante. No encéfalo a glutatona pode remover radicais livres ou agir como substrato para a glutatona peroxidase e glutatona s-transferase na decomposição do peróxido de hidrogênio (LU, 2013). Nossos resultados demonstram uma redução nos níveis de GSH nos coelhos infectados pelo BoHV-5, aos 7 dias p.i., no estriado e cerebelo, quando comparados ao grupo controle (Figura 3). Estas estruturas são as que apresentaram maiores níveis de peroxidação lipídica. Acredita-se que a diminuição da glutatona reduzida, observada neste estudo, pode ocorrer por um efeito direto do vírus ou ainda como efeito secundário à infecção viral em que o aumento das ERO levaria ao consumo da glutatona. Em adição, durante situações de estresse oxidativo muito intenso, a GSH pode ser perdida de maneira irreversível, permanecendo na forma oxidada e não sendo novamente reduzida (GUL et al., 2000).

A infecção pelo BoHV-5 foi capaz de induzir um processo de estresse oxidativo, porém, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos inoculados com BoHV-5

e os grupos controles em relação aos tios não-proteicos avaliados nas estruturas encefálicas (Figura 4) e à catalase sanguínea (Figura 2). A ausência de uma resposta antioxidante poderia contribuir para o dano celular oxidativo, uma vez que o processo de estresse oxidativo ocorre devido ao desequilíbrio entre a produção de ERO e a habilidade das defesas antioxidantes em remover estas substâncias e, ainda, o aumento constante das ERO, como observado neste estudo, poderia diminuir a efetividade da resposta antioxidante (HALLIWELL e CROSS, 1994; CHIHUAILAF, 2002).

Em conclusão, foi demonstrado neste estudo que a infecção pelo herpesvírus bovino tipo-5 promove um aumento da peroxidação lipídica e na produção de espécies reativas de oxigênio em diferentes estruturas encefálicas de coelhos experimentalmente infectados, o que, juntamente com a ausência de uma resposta antioxidante efetiva, leva a um processo de estresse oxidativo. O estresse oxidativo afeta inúmeros componentes celulares através de reações de oxidação. Estes danos oxidativos podem causar morte celular em diversos tecidos, incluindo o cérebro. Assim, mecanismos pró-oxidantes podem estar envolvidos na patogenia da meningoencefalite herpética e conseqüentemente no desenvolvimento dos sinais clínicos observados durante a infecção viral.

COMITÊ DE ÉTICA

Todos os procedimentos com animais aqui descritos foram realizados sob supervisão de médicos veterinários e de acordo com as recomendações do COBEA (Comitê Brasileiro de Experimentação Animal). Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Santa Maria (nº parecer: 055/2013).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAIKE, T. et al. Free radicals in viral pathogenesis: molecular mechanisms involving superoxide and NO. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.217, p.64-73, 1998.

AKAIKE, T. Role of free radicals in viral pathogenesis and mutation. **Rev. Med. Virol.**, v.11, p.87-101, 2001.

ALBRECHT, T. et al. Receptor-initiated activation of cells and their oncogenes by herpes-family viruses. **J. Invest. Dermatol.**, v.98 (Suppl), p.29–35, 1992.

ALI, S.F. et al. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v.13, p.637-648, 1992.

BARREIROS, A.; DAVID, J. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, p.113-123, 2006.

BIRON, C.A. Initial and innate responses to viral infections—pattern setting in immunity or disease. **Current Opinion in Microbiology**, v.2, pp.374-381, 1999.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of Microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, pp.218-54, 1976.

BURDON, R.H. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. **Free Radical Biol. & Med.**, v.18, p.775–794, 1995.

CHIHUAILAF, R.H. et al. Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal. **Veterinaria México**, v.33 (3), p.265-283, 2002.

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 (4), p.295-310, 1997.

DEZENGRINI, R. et al. Bovine herpesvirus 5 induces an overproduction of nitric oxide in the brain of rabbits that correlates with virus dissemination and precedes the development of neurological signs. **J. Neurovirol.**, v.15, p.153-1639, 2009.

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

DONNE, I.D. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v.329, p.23-38, 2003.

EL-DEMERDASH, F.M. et al. Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and beta-carotene. **Food and Chemical Toxicology**, v.42, p.1563-1571, 2004.

ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.82, p.70-77, 1959.

FERREIRA, A.L.A; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v.43, p.61-68, 1997.

FUJIOKA, N. et al. Autocrine interferon-beta stimulation augments nitric oxide production by mouse macrophage J774A.1 cells infected with herpes simplex virus type 1. **Microbiol. Immunol.**, v.44, p.283-287, 2000.

GUL, M. et al. Cellular and clinical implications of glutathione. **Indian Journal of experimental Biology**, v.38, p.625-634, 2000.

HALLIWELL, B.; CROSS, C.E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. **Environ. Health Perspect.**, v.102 (10), p.5-12, 1994.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs Aging**, v.18 (9), p.685-716, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. New York: Oxford, 2007.

ISCHIROPOULOS, H.; BECKMAN, J.S. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: Cause, effect, or association? **J. Clin. Invest.**, v.111(2), p.163-169, 2003.

JENTZSCH, A.M. et al. Improved analysis of malondialdehyed in human body fluids. **Free Radical Biology Medicine**, v.20, p.251-256, 1996.

KRISHNAKUMAR, N. et al. Quercetin protects against cadmium-induced biochemical and structural changes in rat liver revealed by FT-IR spectroscopy. **Biomedicine & Preventive Nutrition.**, v.2, p.179-185, 2012.

LANDOLFO, S. et al. Mechanisms of viral inhibition by interferons. **Pharmacology & Therapeutics**, v.65, p.415–442, 1995.

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

LIAO, S.L. et al. Japanese encephalitis virus stimulates superoxide dismutase activity in rat glial cultures. **Neurosci. Lett.**, v.324, p.133-136, 2002.

LIN, R.N. et al. Replication-incompetent virions of Japanese encephalitis virus trigger neuronal death by oxidative stress in a culture system. **J. Gen. Virol.**, v.85, p.521-533, 2004.

LOPEZ-GUERRERO, J.A.; ALONSO, M.A. Nitric oxide production induced by herpes simplex virus type 1 does not alter the course of the infection in human monocytic cells. **J. Gen. Virol.**, v.78, p.1977-1980, 1997.

LU, S.C. Glutathione synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1830, p.3143-3153, 2013.

MANOHARAN, S. Enhanced lipid peroxidation and impaired enzymic antioxidant activities in the erythrocytes of patients with cervical carcinoma. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v.9, p.699 – 707, 2004.

MARTINEZ, G.R. et al. Oxidative and alkylating damage in DNA. **Mutat. Res.**, v.544 (2-3), p.115-127, 2003.

MENDEZ-ARMENTA, M. et al. Brain regional lipid peroxidation and metallothionein levels of developing rats exposed to cadmium and dexamethasone. **Toxicology Letters**, v.144, p.151-157, 2003.

MONCADA, S. et al. Nitric oxide: Physiologic, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v.43, p.109-142, 1991.

MULLER, F. et al. Reduced oxidative burst responses in monocytes and monocyte-derived macrophages from HIV-infected subjects. **Clin. Exp. Immunol.**, v.82, p.10-15, 1990.

MYATT, L.; CUI, X. Oxidative stress in the placenta. **Histochem. Cell Biol.**, v.122, p.369-382, 2004.

NELSON, D.P.; KIESOW, L.A. Enthalpy of the composition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C. **Analytical Biochemistry**, v.49, p.474-479, 1972.

OHKAWA, H. et al. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Annals of Biochemistry**, v.1979 (95), p.351–358, 1979.

PASQUIER, C. et al. **Oxidative stress, cell activation and viral infection.** (Conference), 1994.

PETERHANS, E. Reactive oxygen species and nitric oxide in viral diseases. **Biol. Trace Elem. Res.**, v.56, p.107-116, 1997a.

PETERHANS, E. Oxidants and Antioxidants in Viral Diseases: Disease Mechanisms and Metabolic Regulation. **American Society for Nutritional Sciences**, (Suppl), p.962-965, 1997b.

RADÁK, Z. et al. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. **Free Radic. Biol. Med.**, v.27(1-2), p.69-74, 1999.

ROOS, D. Oxidative killing of microbes by neutrophils. **Microbes Infect.**, v.5, p.1307-1315, 2003.

SCHWARZ, K.B. Oxidative stress during viral infection: a review. **Free Rad. Biol. Med.**, v.21, p.641-649, 1996.

SOHAL R.S. The free radical hypothesis of aging: an appraisal of the current status. **Ageing Clin. Exp. Res.**, v.5, p.3-17, 1993.

SPEIR, E. et al. Cytomegalovirus gene regulation by reactive oxygen species: Agents of atherosclerosis. **Ann. NY Acad. Sci.**, v.899, p.363-374, 2000.

TORRES, J.L. et al. Reducing power of simple polyphenols by electron-transfer reactions using a new stable radical of the PTM series, tris (2,3,5,6-tetrachloro-4-nitrophenyl) methyl radical. **J. Org. Chem.**, v.72, p.3750-3756, 2007.

VALYI-NAGY, T.; DERMODY, T.S. Role of oxidative damage in the pathogenesis of viral infections of the nervous system. **Histol. Histopathol.**, v.20, p.957-967, 2005.

WYSS-CORAY, T.; MUCKE, L. Inflammation in Neurodegenerative Disease - a Double-Edged Sword. **Neuron.**, v.35, p.419-432, 2002.

YOSHIOKA, T. et al. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.135 (3), p.372-376, 1979.

Figura 1 – Níveis de TBARS em córtex cerebral (A), hipocampo (B), estriado (C) e cerebello (D) de coelhos experimentalmente infectados com BoHV-5, aos 7 e 12 dias p.i. (* $P < 0,05$).

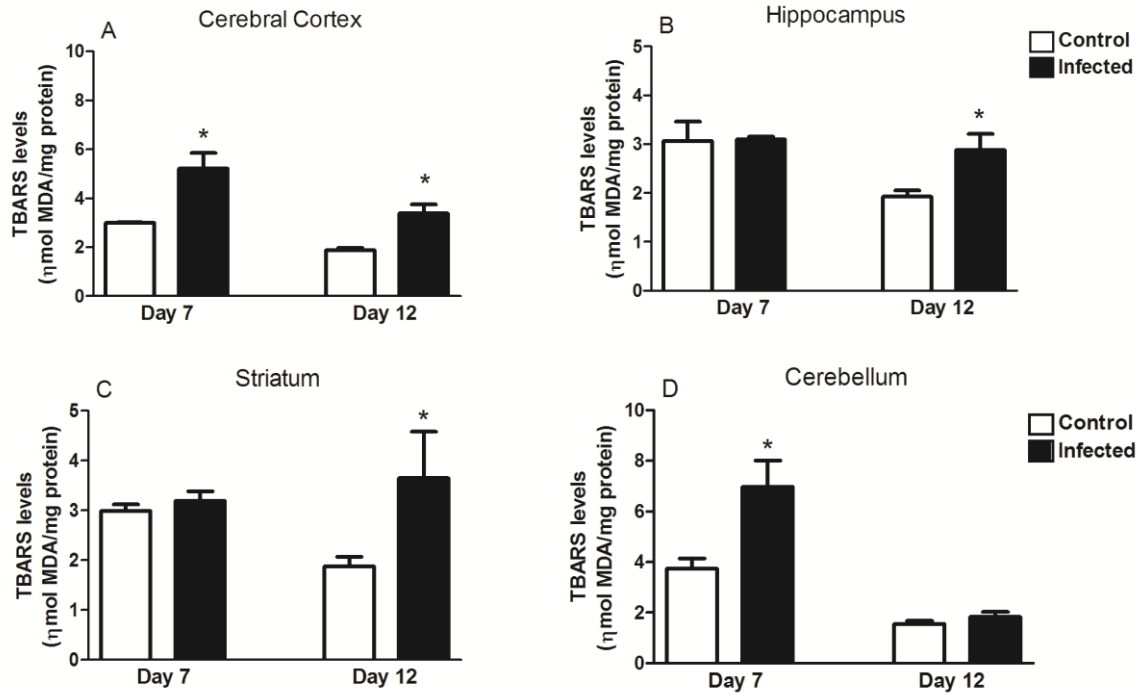


Figura 2 – Atividade da catalase sanguínea em coelhos experimentalmente infectados com BoHV-5, aos 7 e 12 dias p.i.

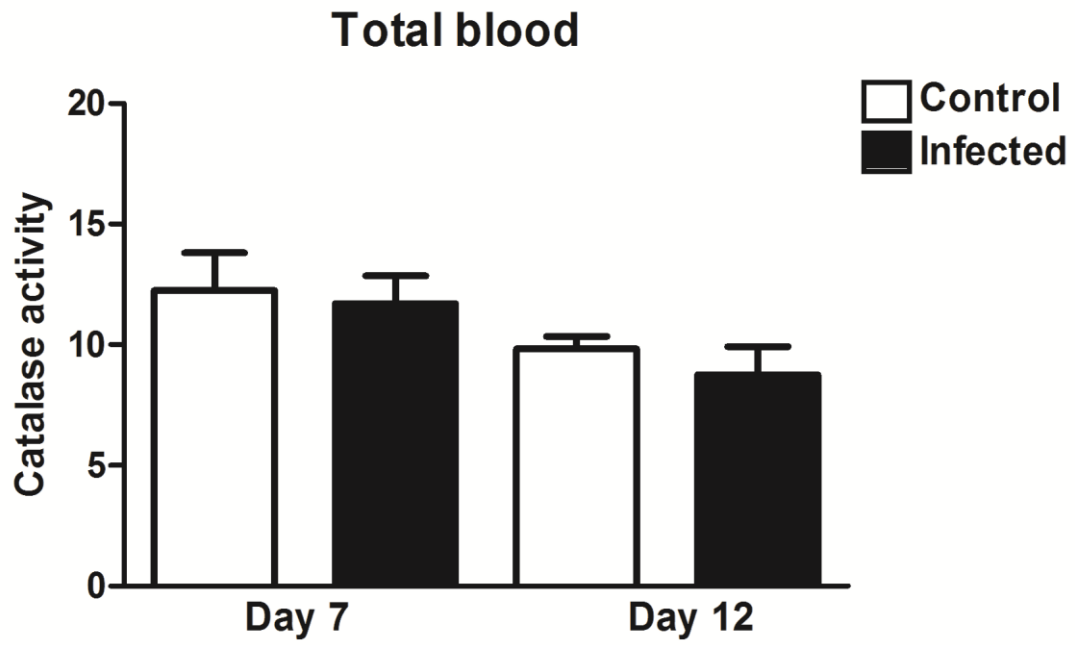


Figura 3 – Níveis de glutatona reduzida em córtex cerebral (A), hipocampo (B), estriado (C) e cerebelo (D) de coelhos experimentalmente infectados com BoHV-5, aos 7 e 12 dias p.i. (* $P < 0,05$).

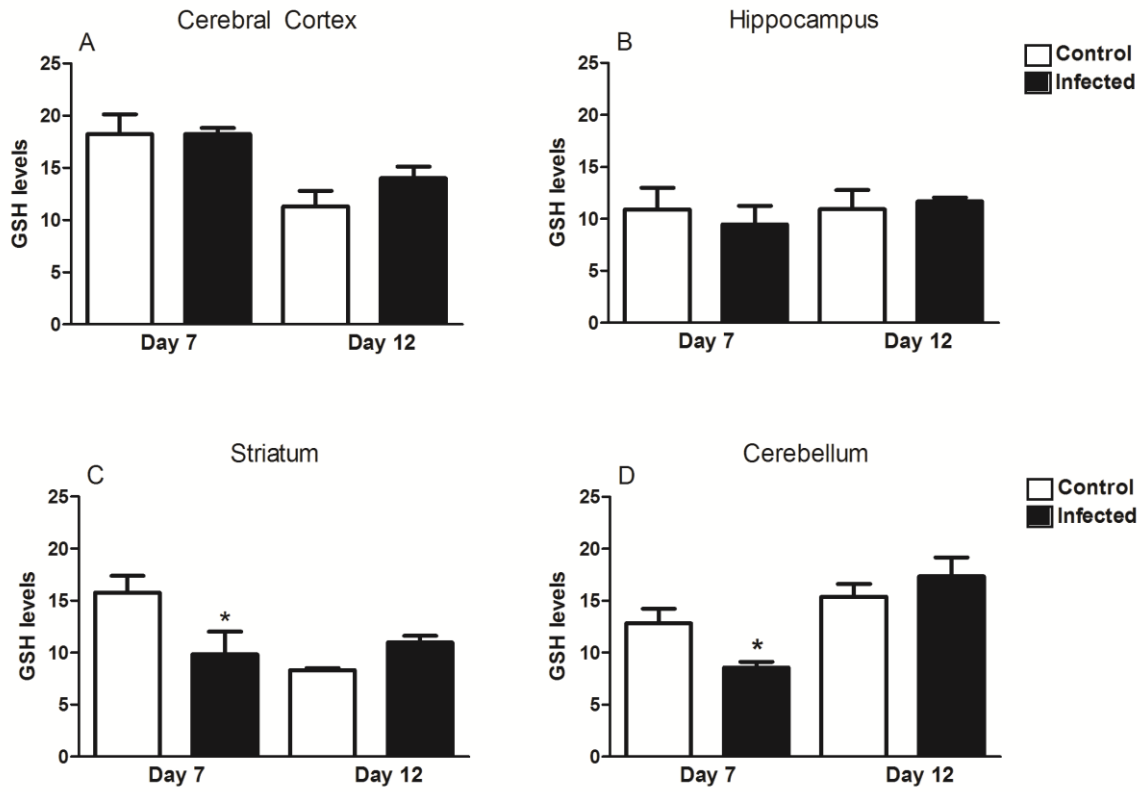


Figura 4 – Níveis de tióis não-proteicos em córtex cerebral (A), hipocampo (B), estriado (C) e cerebelo (D) de coelhos experimentalmente infectados com BoHV-5, aos 7 e 12 dias p.i.

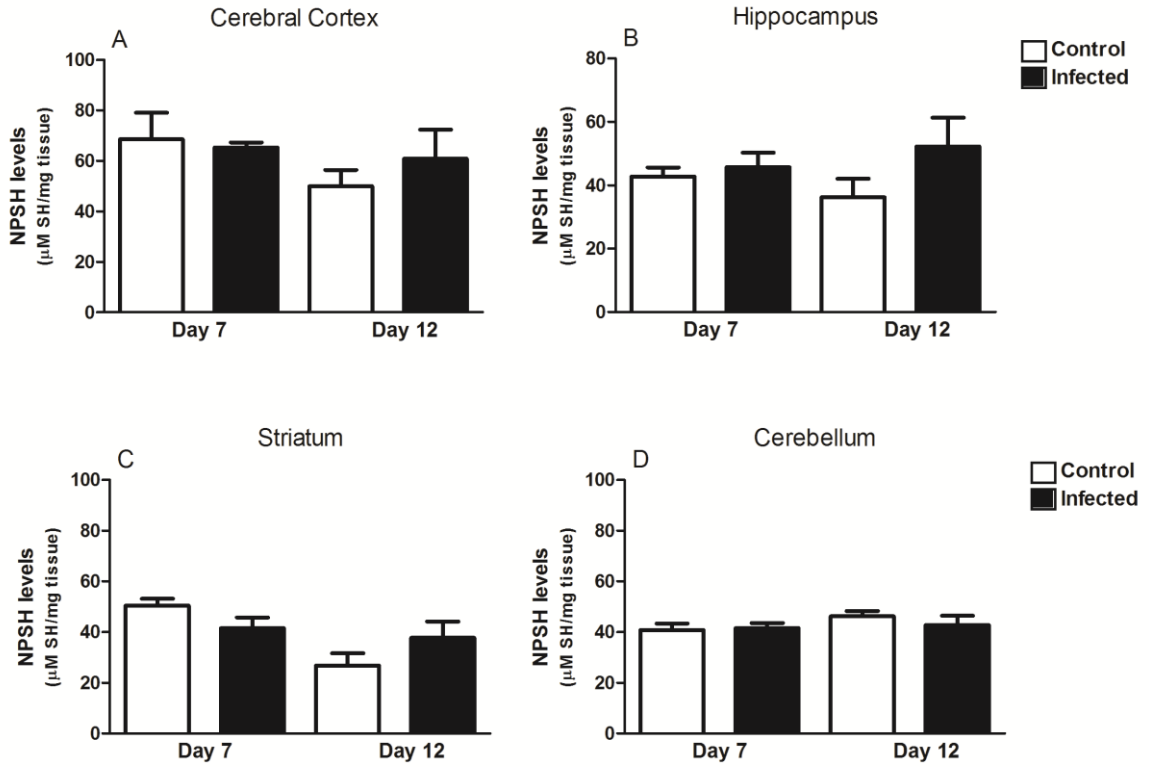
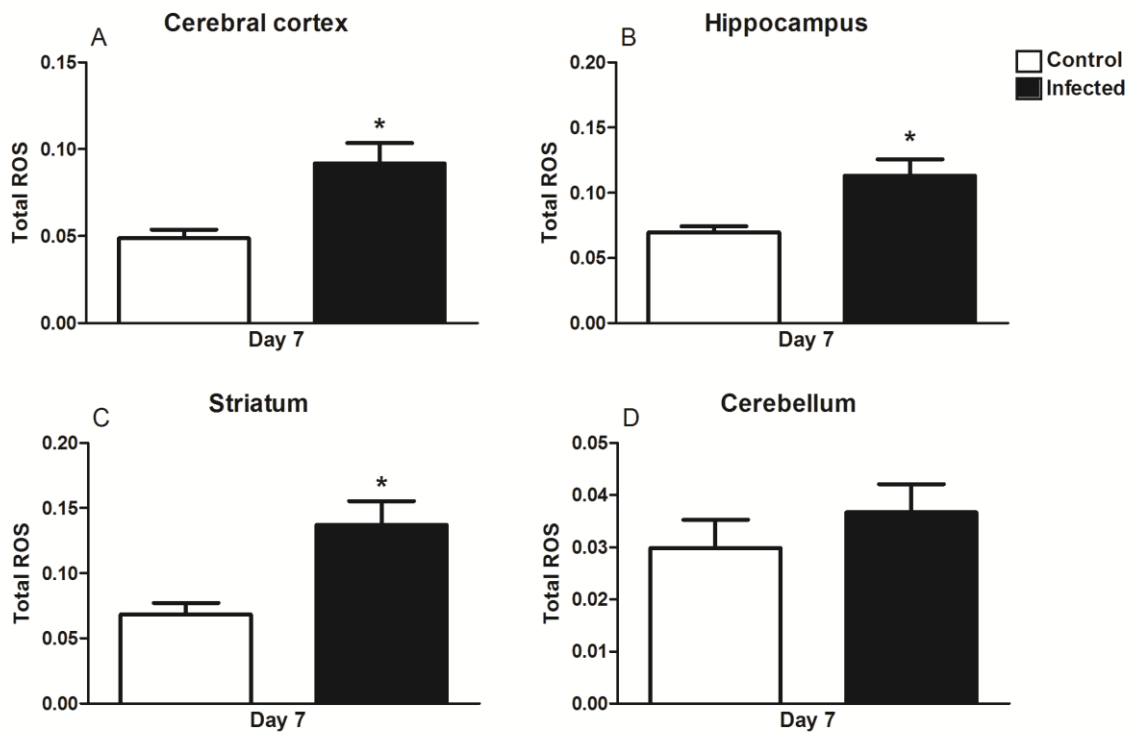


Figura 5 - Níveis de espécies reativas de oxigênio em córtex cerebral (A), hipocampo (B), estriado (C) e cerebelo (D) de coelhos experimentalmente infectados com BoHV-5, aos 7 dias p.i. (* $P < 0,01$).



4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A doença neurológica ocasionada pela infecção por 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. Os bovinos são os hospedeiros naturais do BoHV-5, embora experimentalmente a infecção já tenha sido reproduzida em outras espécies de mamíferos (SILVA et al., 1999; BELTRÃO et al., 2000; ABRIL et al., 2004; DIEL et al., 2005). 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., 1999). Nesta espécie, o BoHV-5 pode ser isolado a partir do bulbo olfatório, córtex anterior e posterior, amígdalas e hipocampus, e com menor frequência a partir do diencéfalo, ponte e medula, do cerebelo e do gânglio trigêmeo (CHOWDHURY et al., 1997).

Para a realização do presente trabalho, foram utilizados coelhos com idade aproximada de 30 dias, pois animais jovens são mais susceptíveis à infecção pelo BoHV-5. Além disso, experimento piloto foi realizado para determinar a quantidade necessária de inóculo para se conseguir a infecção desejada, em que os animais viessem a apresentar sinais clínicos clássicos da infecção pelo BoHV-5 como apatia, bruxismo, andar em círculos, opistótono e convulsões. Para a inoculação dos animais foram utilizados 1 ml (0,5 ml/ narina) de suspensão viral contendo $10^{7,5}$ TCID₅₀. Após a inoculação os coelhos foram avaliados diariamente quanto aos aspectos clínicos; observou-se que aos 7 dias pós-inoculação (p.i.) os animais não apresentavam sinais clínicos evidentes de meningoencefalite, porém sabe-se que a presença do vírus e alterações microscópicas no encéfalo podem ser observadas a partir do 5º-7º dia pós-infecção (PEREZ et al., 2002). Assim, no intuito de se obter amostras previamente ao desenvolvimento dos sinais clínicos neurológicos foi realizada a coleta de amostras sanguíneas e de estruturas encefálicas neste momento. Aos 10 dias p.i., a maioria dos animais infectados apresentava apatia e leve secreção nasal e ocular. Aos 12 dias p.i., os coelhos apresentaram sinais clínicos como bruxismo, opistótono e convulsões. No intuito de obter uma amostragem dos animais com sinais neurológicos, nova coleta foi realizada neste momento. Assim, estabeleceu-se que a titulação viral de $10^{7,5}$ TCID₅₀ era ideal para se

conseguir a infecção desejada. Além disso, foi estabelecido que as coletas seriam realizadas aos 7 e 12 dias p.i.

A transmissão do BoHV-5, naturalmente, ocorre por contato direto ou indireto entre bovinos (ENGELS e ACKERMANN, 1996), e os sítios de replicação primária são as mucosas nasal, oral, orofaríngea e ocular. Durante a infecção aguda, o BoHV-5 replica nas células da mucosa nasal e invade as terminações dos nervos autonômicos e sensoriais que inervam a mucosa, sobretudo as terminações do nervo olfatório e ramo maxilar do nervo trigêmeo (LEE et al., 1999). A seguir, os vírions invadem o sistema nervoso central (SNC), principalmente pela via olfatória, no sentido retrógrado a partir da mucosa nasal (CHOWDHURY et al., 1997; LEE et al., 1999; DIEHL et al., 2005). O desenvolvimento simultâneo de lesões no córtex anterior, medula, ponte e gânglio trigêmeo sugere que o BoHV-5 também atinge o cérebro por transporte axonal de neurônios bipolares dos nervos olfativos para os bulbos olfatórios (PEREZ et al., 2002). As estruturas encefálicas avaliadas neste trabalho foram o bulbo olfatório e córtex (anterior e parietal), devido à sua relevância na infecção viral, pois estas estruturas são descritas na maioria da literatura como as mais acometidas pela infecção pelo BoHV-5 (PEREZ et al., 2002; DEZENGRINI et al., 2009; MACHADO et al., 2013). O hipocampo, o estriado e o cerebelo também foram coletados para uma avaliação mais ampla dos efeitos da infecção no encéfalo.

Histologicamente, a infecção pelo BoHV-5 é caracterizada por meningoencefalite não-supurativa necrosante, composta por infiltrado linfoplasmocitário perivascular, necrose neuronal, neuronofagia e presença de corpúsculos de inclusão intranucleares em neurônios e astrócitos. Pelo uso de imunistoquímica, pode-se observar a presença de proteínas virais em neurônios, células da glia e macrófagos. Nas fases iniciais da replicação viral no encéfalo frequentemente não são observadas alterações histológicas significativas ou um número significativo de neurônios antígeno-positivos, não refletindo assim a severidade dos sinais clínicos observados durante a fase aguda da infecção (RISSI et al., 2007). Assim, acredita-se que outros mecanismos que resultem em toxicidade neuronal e /ou disfunção possam estar envolvidos na neuropatogenia da infecção pelo BoHV-5. Neste contexto, este trabalho avaliou os efeitos da infecção pelo BoHV-5 sobre os parâmetros oxidativos e a degradação dos nucleotídeos de adenina (ATP, ADP e AMP), pois estas substâncias são capazes de modular diferentes processos celulares como resposta imune e inflamatória, mas também podem exercer efeito citotóxico, dependendo de suas concentrações e local de ação.

O ATP, um importante componente do sistema purinérgico, é conhecido como um ativador de mediadores inflamatórios em doenças infecciosas (BOURS et al., 2006). As ações

pró-inflamatórias do ATP promovem a estimulação e proliferação de linfócitos, sendo necessário para a secreção de importantes citocinas das células T, como INF- γ e IL-2, que estão envolvidas na indução de resposta imune a antígenos estranhos, além de apresentar outros efeitos em muitos processos biológicos, como contração do músculo liso, neurotransmissão, inflamação e dor (RALEVIC e BURNSTOCK, 1998; SITKOVSKY, 1998; SNEDDON et al., 1999). Entretanto, o ATP em elevadas concentrações pode atuar como uma potente molécula citotóxica, capaz de levar à morte diferentes classes de células, pela formação de grandes poros na membrana plasmática (FILIPPINI et al., 1990). Assim, os nucleotídeos podem exercer diferentes efeitos sobre as células, dependendo da expressão de purinoreceptores e da atividade das ectoenzimas que controlam a disponibilidade dos nucleotídeos e nucleosídeos nessas células (ROBSON et al., 2006). As ectonucleotidases hidrolisam os nucleotídeos extracelulares em seus respectivos nucleosídeos, dentre elas estão as NTPDases que hidrolisam tanto ATP quanto ADP em AMP, e a 5'-nucleotidase, que hidrolisa o AMP resultando em adenosina, um nucleosídeo com importante função neuroprotetora (ZIMMERMANN, 1996).

A infecção viral pode alterar ou modular o sistema purinérgico, por exemplo, NTPDase-6 (CD39L2) é necessária para a replicação do vírus da febre aftosa (PICCONE et al., 2009). Além disso, a infecção pelo herpes simplex tipo-1 (HSV-1) pode influenciar o metabolismo da adenosina pelo aumento da atividade das enzimas adenosina deaminase e 5'-nucleotidase (ZOPPELLARO et al., 2013).

Os resultados obtidos na avaliação da atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase (artigo I) revelaram que coelhos infectados com BoHV-5 apresentam uma diminuição na hidrólise do ATP e ADP no córtex cerebral aos 7 dias p.i., precedendo o desenvolvimento dos sinais neurológicos; e, também, a hidrólise diminuída do ADP e AMP aos 12 dias p.i., na mesma região cerebral. Assim, um excesso de ATP no meio extracelular pode resultar em excitotoxicidade e disfunção neuronal, podendo contribuir para o desenvolvimento de sinais clínicos neurológicos clássicos da meningoencefalite herpética, como as convulsões que, em adição, estão relacionadas à deficiência na atividade de algumas ectonucleotidases (TRAMS e LAUTER, 1978; NAGY et al., 1990; YOUNG e DRAGUNOW, 1994; NAGY et al., 1997).

Em relação à atividade das ectonucleotidases em sinaptossomas de hipocampo dos coelhos infectados pelo BoHV-5, foi possível observar um aumento na atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase aos 7 dias p.i. Nesta fase da infecção viral, ocorreu o aumento na hidrólise de ATP, ADP e AMP, possivelmente resultando em aumento da produção de

adenosina, o que poderia conferir neuroproteção. No entanto, aos 12 dias p.i., não foi observado o aumento na atividade da enzima 5'-nucleotidase. Assim, sugere-se que neste momento a produção de adenosina possa estar diminuída, já que para que ocorra a produção deste nucleosídeo todos os membros da cascata purinérgica devem funcionar em taxas elevadas (BENARDO e PEDLEY, 1985; ROBSON et al., 2006). Uma menor concentração de adenosina no meio extracelular poderia favorecer a replicação viral, como foi observado em estudo *in vitro* com HSV-1 por Williams e Lerner (1975).

Quanto à diferença em relação à atividade das ectonucleotidases entre os sinaptossomas de córtex cerebral e os de hipocampo, acredita-se que este fato esteja relacionado à distribuição heterogênea destas enzimas nas estruturas cerebrais e a diferenças na infectividade e disseminação viral, uma vez que antígenos virais e alterações histológicas podem ser detectados principalmente em neurônios corticais (DEZENGRINI et al., 2009; MACHADO et al., 2013), enquanto o hipocampo e o tálamo são afetados mais tardiamente (DEZENGRINI et al., 2009). Além disso, devido ao fato de a NTPDase e a 5'-nucleotidase serem enzimas de membrana e que a infecção pelo BoHV-5 pode aumentar a formação de radicais livres (artigo II), é possível que as alterações na atividade destas ectonucleotidases possam ser mediada por estresse oxidativo, uma vez que as ERO induzem a peroxidação dos lipídeos de membrana. Reforçando o ponto acima mencionado, foi demonstrado neste estudo que os marcadores de estresse oxidativo, tais como TBARS, ERO-totais e GSH encontram-se alterados durante a infecção pelo BoHV-5. Ainda, o córtex cerebral apresentou maiores níveis de peroxidação lipídica, comparado ao hipocampo, o que pode ter contribuído para a diminuição da atividade das ectonucleotidases nesta estrutura.

Durante a infecção primária a síntese de proteínas virais induz uma série de eventos que estimulam a imunidade inespecífica do hospedeiro. As respostas inespecíficas ocorrem em qualquer infecção viral através do processo inflamatório. Em algumas situações, a resposta inflamatória pode se tornar excessiva, levando à imunopatologia induzida pelo vírus (WISE et al., 2004). A sinalização purinérgica é capaz de modular a resposta inflamatória. O ATP age como uma molécula pró-inflamatória, estando envolvido no recrutamento de monócitos para tecidos alvo (VENTURA e THOMOPOULOS, 1995), na produção de IL-1 β e TNF- α por macrófagos (ELSSNER et al., 2004; GUERRA et al., 2003) e na migração e diferenciação de células dendríticas (LA SALA et al., 2003). Ainda, no SNC, nucleotídeos e nucleosídeos podem modular a proliferação, a migração e a diferenciação de astrócitos e células neuronais (RYU et al., 2003; SCEMES et al., 2003) e promover a ativação de células da micróglia (DAVALOS et al., 2005; HAYNES et al., 2006).

Quando ativada, a micróglia produz espécies reativas como o superóxido, o peróxido de hidrogênio e o óxido nítrico. As ERO têm sido implicadas na patogênese de muitas doenças virais (GRIOT et al., 1989; KOPROWSKI et al., 1993; LOPEZ-GUERRERO e ALONSO, 1997; FUJIOKA et al., 2000; KARADENIZ et al., 2008). A cadeia respiratória nas mitocôndrias é o principal responsável para a produção de ERO em organismos (TURRENS, 1997). Porém, outros mecanismos celulares podem resultar na produção de ERO, como a finalização da cascata purinérgica para a hidrólise do ATP, em que o radical superóxido é gerado pela degradação da hipoxantina em xantina e desta em ácido úrico pela enzima xantina oxidase (Figura 5).

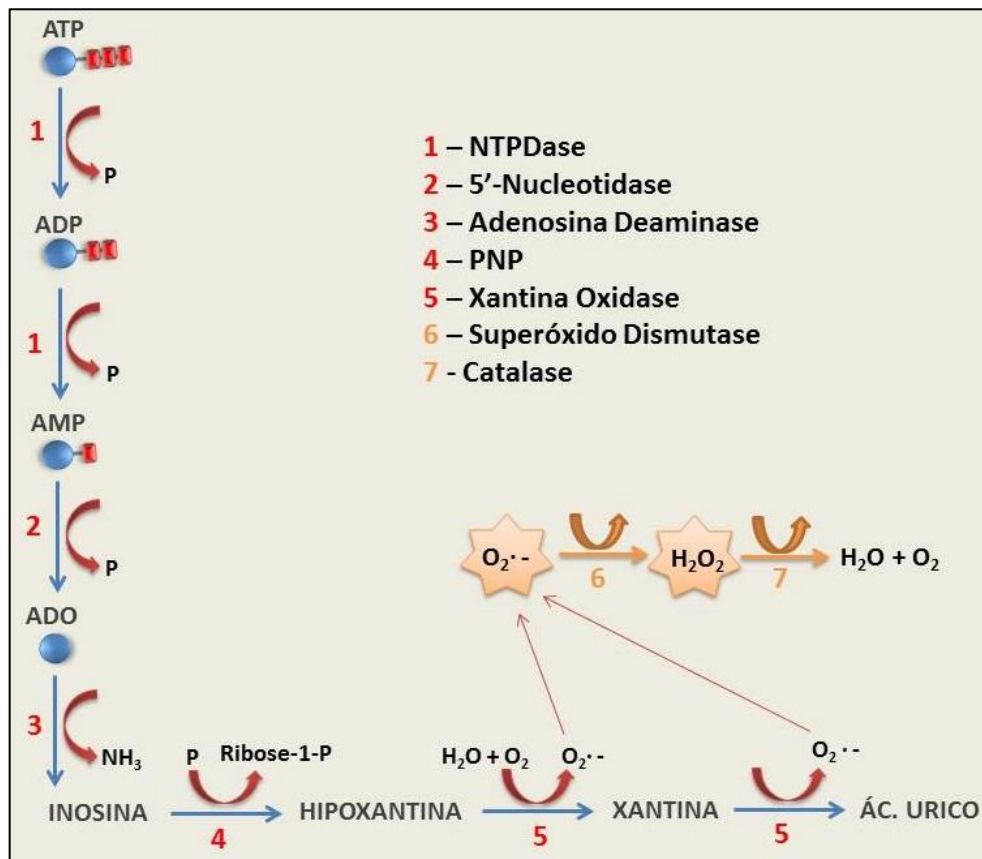


Figura 5 – Cascata purinérgica. Formação do radical superóxido através da ação da enzima xantina oxidase.

Embora as ERO estejam envolvidas na produção de energia, na fagocitose, na regulação do crescimento celular, na sinalização intercelular e na síntese de substâncias biológicas importantes, uma produção excessiva pode ter efeitos nocivos que levam ao dano oxidativo de lipídios, proteínas, RNA e DNA (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Os resultados obtidos na avaliação de parâmetros oxidativos, durante a infecção pelo BoHV-5, revelaram alterações nos níveis de TBARS, ERO-totais e GSH (artigo II). O dano oxidativo resultante do aumento da produção de ERO, observado durante a infecção pelo BoHV-5, foi confirmado pela avaliação da peroxidação de lipídios de membrana o que resultou em aumento nos níveis de TBARS nas estruturas encefálicas avaliadas. Estes resultados são semelhantes à maioria dos trabalhos encontrados na literatura que abordam o tema estresse oxidativo e infecções virais, os quais relatam o aumento de substâncias pró-oxidantes, possivelmente em resposta a infecção viral, porém como promotoras de danos celulares observados durante o curso da infecção (GRIOT et al., 1989; KOPROWSKI et al., 1993; LOPEZ-GUERRERO e ALONSO, 1997; FUJIOKA et al., 2000; KARADENIZ et al., 2008).

Além disso, os vírus podem afetar o equilíbrio pró-/antioxidante nas células dos hospedeiros, através do aumento de pró-oxidantes, como o fator de necrose tumoral (TNF) (SCHULZE-OSTHOFF et al., 1992) o ferro e o óxido nítrico (ON) (DAWSON e DAWSON, 1996); e também pela inibição da síntese de enzimas antioxidantes (BUHL et al., 1986; HENNET et al., 1992). O TNF pode atuar na mitocôndria da célula hospedeira, produzindo um efeito pró-oxidante, inibindo a respiração mitocondrial no local de produção do superóxido (SCHULZE-OSTHOFF et al., 1992). O TNF também pode agir liberando o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) a partir da proteína inibidora citoplasmática I κ B. Após a liberação, o NF- κ B é translocado para o núcleo da célula aonde irá se ligar ao DNA induzindo a transcrição de genes celulares e/ou virais. Foi demonstrado o envolvimento do NF- κ B na mediação do ionóforo de cálcio que aumenta a expressão viral em algumas viroses, sendo reportado que o aumento do cálcio intracelular ocasiona a formação de ERO (SCHRECK et al., 1992).

Em recente estudo, Garcia et al. (2013) demonstraram o aumento da expressão da proteína Bcl-2 em cultivos celulares infectados com BoHV-5. Ao nível nuclear, a Bcl-2 parece estar envolvida no transporte de fatores de transcrição, como o NF- κ B e o p53, através do poro nuclear, bem como o sequestro de cálcio e GSH através de um mecanismo ainda desconhecido (MARIN et al., 1996; HERRMANN et al., 1996; VOEHRINGER et al., 1998). Assim, é possível que a infecção por BoHV-5 seja capaz de ativar o NF- κ B, que associado a um aumento nos níveis de cálcio intracelular mediado pela ligação do ATP aos receptores P2X (EDWARDS et al., 1992), poderiam contribuir para o processo de estresse oxidativo observado durante a infecção experimental por BoHV-5 e também para o aumento da replicação viral.

Quanto às defesas antioxidantes foi demonstrado a diminuição dos níveis de GSH em amostras de estriado e cerebelo, enquanto os níveis de catalase e tióis não-proteicos encontram-se inalterados durante a infecção pelo BoHV-5. Os níveis diminuídos de GSH podem contribuir para a patogênese da infecção viral, uma vez que este antioxidante possui ações antivirais e variações nos seus níveis afetam diretamente a síntese de proteínas e DNA, além de ser necessária para o funcionamento de outros compostos antioxidantes (KIDD, 1997; GUL et al., 2000). Ainda, a disseminação e replicação viral dependem da capacidade do vírus em prevenir a morte celular (SCOTT, 2010). Considerando-se que induzir a apoptose requer uma alta proporção de GSH/glutationa total (GHIBELI et al., 1998; HENTZE et al., 2002) e que a glutathione pode ter um papel duplo na morte celular, pois se, por um lado, a depleção de GSH desencadeia a morte neuronal (KANE et al., 1993); por outro lado, condições pró-oxidantes, que podem levar a mudanças na relação glutathione reduzida/oxidada e, eventualmente, a depleção de GSH, podem ser citoprotetoras, pois oxidantes como o superóxido podem atenuar a apoptose mediada por CD-95 (CLÉMENT e STAMENKOVIC, 1996; NOBEL et al., 1997; HAMPTON e ORRENIUS, 1997) é possível que a redução nos níveis de GSH observada durante a infecção pelo BoHV-5 ocorra como um mecanismo do vírus para prevenir a apoptose.

Assim, neste trabalho foi investigada a relação da infecção experimental pelo BoHV-5 em coelhos com a atividade ectonucleotidásica, em sinaptossomas de córtex cerebral e hipocampo, e com o status oxidativo. A infecção pelo BoHV-5 pode causar um processo de estresse oxidativo, com aumento das ERO totais e da peroxidação de lipídeos de membrana. Além disso, as ERO parecem ter uma participação nas alterações da atividade das ectonucleotidases, pois estas são enzimas de membrana e estão sujeitas à oxidação, e ainda, pró-oxidantes podem contribuir para o aumento de ATP no meio extracelular, uma vez que o excesso de ERO causa severos danos às células e a liberação deste nucleotídeo pode ocorrer em decorrência da injúria celular. Em adição, o ATP pode induzir o aumento de cálcio intracelular, ocasionando a formação de ERO, e estimular a secreção de citocinas pró-oxidantes. Com os resultados compilados pode-se sugerir que alterações no sistema purinérgico e o processo de estresse oxidativo possam estar envolvidos na disfunção e morte neuronal durante a infecção pelo BoHV-5, contribuindo, assim, para a patogênese da meningoencefalite herpética.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia Celular e Molecular**. Livraria e Editora Revinter Ltda, 2005.

ABBACCHIO, M.P. et al. Purinergic signaling in the nervous system: an overview. *Trends in Neurosciences*, v.32, p.19–29, 2009.

ABRIL, C. et al. Both viral and host factors contribute to neurovirulence of bovine herpesviruses 1 and 5 in interferon receptor-deficient mice. **Journal of Virology**, v.78, p.3644-3653, 2004.

ADLER, H. et al. Noncytopathic strains of bovine viral diarrhea virus prime bovine bone marrow-derived macrophages for enhanced generation of nitric oxide. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.202, p.1562–1568, 1994.

ALBRECHT, T. et al. Receptor-initiated activation of cells and their oncogenes by herpes-family viruses. **Journal of Investigative Dermatology**, v.98 (Suppl), p.29–35, 1992.

AQUINO NETO, H.M. et al. Meningoencefalite por Herpesvirus bovino 5 em Minas Gerais: relato de caso clínico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61 (1), p.1-5, 2009.

ASSIS-BRASIL, N.D. et al. Enfermidades diagnosticadas em bezerros na região sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33 (4), p.423-430, 2013.

BABIUK, L.; VAN DRUNEN LITTLE-VAN DEN HUCRK, S.; TIKOO, S.K. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. **Veterinary Microbiology**, v.53, p.31-42, 1996.

BARTHA, A. et al. Occurrence of encephalomyelitis caused by infectious bovine rhinotracheitis virus in calves in Hungary. **Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae**, v.19, p.145-151, 1969.

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

BERAUDI, A. et al. Distribution and expression of A1 adenosine receptors, adenosine deaminase and adenosine deaminase-binding protein (CD26) in goldfish brain. **Neurochemistry International**, v.42, p.455–463, 2003.

BENARDO, L.S.; PEDLEY, T.A. Cellular mechanisms of focal epileptogenesis. In: PEDLEY, T.A.; MELDRUM, B.S. (eds) **Recent Advances in Epilepsy**, Churchill Livingstone, Edinburgh, p. 1-17, 1985.

BIEDERBICK, A. et al. First apyrase splice variants have different enzymatic properties. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, p.19018-19024, 2000.

BOCHE, D.; PERRY, V.H.; NICOLL, J.A. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v.39, p.3–18, 2013.

BOURS, M.J.; SWENNEN, E.L.; DI VIRGILIO, F.; CRONSTEIN, B.N.; DAGNELIE, P.C. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, v.112 (2), p.358-404, 2006.

BRAUN, N. et al. Sequencing, functional expression and characterization of rat NTPDase6, a nucleoside diphosphatase and novel member of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family. **Biochemical Journal**, v.351, p.639-647, 2000.

BREDT, D. S. & SNYDER, S. H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. **Annual Review of Biochemistry**, v.63, p.175–195, 1994.

BUHL, K. et al. Systematic glutathione deficiency in symptom-free HIV-seropositive individuals. **The Lancet**, v.2, p.1294-1298, 1989.

BURDON, R. H. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. **Free Radical Biology & Medicine**, v.18, p.775–794, 1995.

BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cellular and Molecular Life Sciences** v.12, p.1471-1483, 2007.

BURNSTOCK, G. Purinergic signaling – an overview. **Novartis Found Symposium**, v.276, p.26–48, 2006.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future. **Bioessays**, v.34, p.218-225, 2012.

BURNSTOCK, G.; KENNEDY, C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? **General Pharmacology**, v.16 (5), p.433-440, 1985.

CARRILLO, B.J. et al. Pathology of bovine viral necrotizing encephalitis in Argentina. **Zentralblatt fur Veterinarmedizin**, v.30, p.161-168, 1983a.

CARRILLO, B.J. et al. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. **Zentralblatt fur Veterinarmedizin**, v.30, p.327-332, 1983b.

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 (4), p.295-310, 1997.

CLÉMENT, M.V.; STAMENKOVIC, I. Superoxide anion is a natural inhibitor of FAS-mediated cell death. **EMBO Journal**, v.15 (2), p.216-225, 1996.

CODERO, O. et al. Cytokines regulate membrane adenosine deaminase on human activated lymphocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, v.70, p.920-930, 2001.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6ª. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

D'OFFAY, J.M. et al. Isolation and characterization of encephalitic bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle in North America. **American Journal Veterinary Research**, v.54, p.439-534, 1993.

DAVALOS, D. et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. **Nature Neuroscience**, v.8(6), p.752-758, 2005.

DAWSON, V. L. & DAWSON, T. M. Free radicals and neuronal cell death. **Cell Death Differentiation**, v.3, p.71-78, 1996.

DEL MÉDICO ZAJAC, M. P.; LADELFA, M. F.; KOTSIAS, F.; MUYLKENS, B.; THIRY, J.; ROMERA, S. A. Biology of bovine herpesvirus 5. **The Veterinary Journal**, v.184, p.138-145, 2010.

DEL MÉDICO ZAJAC, M.P. et al. Biology of herpesvirus 5. **The Veterinary Journal**, v.184, p.138-145, 2009.

DELHON, G. et al. Genome of bovine herpesvirus type 5. **Journal of Virology**, v.77 (19), p.10339-10347, 2003.

DESROSIERS, M.D. et al. Adenosine deamination sustains dendritic cell activation in inflammation. **Journal of Immunology**, v.179, p.1884–1892, 2007.

DEZENGRINI, R. et al. Bovine herpesvirus 5 induces an overproduction of nitric oxide in the brain of rabbits that correlates with virus dissemination and precedes the development of neurological signs. **Journal of Neurovirology**, v.15, p.153-1639, 2009.

DI VIRGILIO, F. Purinergic mechanism in the immune system: A signal of danger for dendritic cells. **Purinergic Signalling**, v.1 (3), p.205–209, 2005.

DÍAZ-HERNANDEZ, M. et al. Co-localisation of functional nicotinic and ionotropic nucleotide receptors in isolated cholinergic synaptic terminals. **Neuropharmacology**, v.24, p.20-33, 2002.

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

DOMERCQ, M. et al. P2Y1 receptor- evoked glutamate exocytosis from astrocytes: control by tumour necrosis factor- α and prostaglandins. **Journal of Biological Chemistry**, v.281, p.30684–30696, 2006.

EDWARDS, F.A. et al. ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. **Nature**, v.359, p.144–147, 1992.

ELSSNER, A. et al. A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 beta processing and release. **Journal of Immunology**, v.172 (8), p.4987-4994, 2004.

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

- ERB, L. et al. P2 receptors: intracellular signaling. **Pflugers Archiv**, v.452, p.552-562, 2006.
- FERRARI, D. et al. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. **Journal of Immunology**, v.176, p.3877–3883, 2006.
- FERREIRA, A.L.A; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, p.61-68, 1997.
- FIELDS, R.D.; BURNSTOCK, G. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. **Nature Reviews Neuroscience**, v.7, p.423-436, 2006.
- FILIPPINI, A. et al. Ecto-ATPase activity in cytolytic T-lymphocytes. Protection from the cytolytic effects of extracellular ATP. **Journal of Biological Chemistry**, v.265 (1), p. 334-340, 1990.
- FLORES, E.F. et al. Neuropatogênese experimental da infecção pelo herpesvírus bovino tipo 5 em coelhos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, p.1-16, 2009.
- FLORES, E.F.; DONIS, R.O. Isolation and characterization of a bovine cell line resistant to infection with the pestivirus bovine viral diarrhoea virus (BVDV). **Virology**, v.208, p.565-575, 1995.
- FRANCO, R. et al. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. **Progress of Neurobiology**, v.52, p.283–294, 1997.
- FRANCO, R. et al. Heterogeneous localization of some purine enzymes in subcellular fractions of rat brain and cerebellum. **Neurochemical Research**, v.11, p.423–435, 1986.
- FREDHOLM, B.B. et al. Structure and function of adenosine receptors and their genes. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.** v.362, p.364-374, 2000.
- FRENCH, E.L. A specific virus encephalitis in calves: isolation and characterization of the causal agent. **Australian Veterinary Journal**, v.38, p.216-221, 1962.
- GARCIA, A.F. et al. Bovine herpesvirus type 5 infection regulates Bax/BCL-2 ratio. **Genetics and Molecular Research**, v.12 (3), p.3897-3904, 2013.

GEIGER, J.D., NAGY, J.I. Distribution of adenosine deaminase activity in rat brain and spinal cord. **Journal of Neuroscience**, v.6, p.2707-2714, 1986.

GESSI S. et al. Adenosine receptors in colon carcinoma tissues and colon tumoral cell lines: Focus on the A3 adenosine subtype. **Journal of Cellular Physiology**, v.211 (3), p.826–836, 2007.

GHIBELI, L. et al. Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion. **FASEB Journal**, v.12, p.479-486, 1998.

GLOENBOCK, D.T. et al. Lipid A1-like molecule that antagonize the effects of endotoxin on human monocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v.266, p.19490-19498, 1991.

GMIINDER, H. et al. Macrophages regulate intracellular glutathione levels of lymphocytes. Evidence of an immunoregulatory role of cysteine. **Cellular Immunology**, v.129, p.32-46, 1990.

GOMES, L.I. et al. Detecção de herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) em bovinos do Sudeste Brasileiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol.54 (2), 2002.

GRIOT, C. et al. Antibody-induced generation of reactive oxygen radicals by brain macrophages in canine distemper encephalitis: a mechanism for bystander demyelination. **Acta Neuropathologica**, v.78, p.396-403, 1989.

GUERRA, A.N. et al. Purinergic receptor regulation of LPS-induced signaling and pathophysiology. **Journal of Endotoxin Research**, v.9 (4), p.256-263, 2003.

GUL, M. et al. Cellular and clinical implications of glutathione. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.38, p.625-634, 2000.

HALLIWELL, B.; CROSS, C.E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. **Environmental Health Perspectives**, v.102 (Suppl. 10), p.5-12, 1994.

HAMPTON, M.B.; ORRENIUS, S. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. **FEBS letters**, v.414 (3), p.552-556, 1997.

HASKO, G., CRONSTEIN, B.N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. **Trends Immunology**, v.25, p.33-39, 2004.

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

HENNET, T. et al. Alterations in antioxidant defences in lung and liver of mice infected with influenza A virus. **Journal of General Virology**, v.73, p.39-46, 1992.

HENTZE, H. et al. Glutathione dependence of caspase-8 activation at the death-inducing signaling complex. **The Journal of Biological Chemistry**, v.277, p.5588-5595, 2002.

HERRMANN, J. L. et al. Cell death signal transduction and Bcl-2 function. **Biochemical Society Transactions**, v.24, p.1059–1065, 1996.

HOLZ, C.L. et al. Soroprevalência de herpesvírus bovinos tipos 1 e/ou 5 no Estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29 (9), p.767-773, 2009.

JOHNSTON, L.A.Y. et al. A viral meningo-encephalitis in calves. **Australian Veterinary Journal**, v.38, p.207-215, 1962.

JUNGER, W.G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signaling. **Nature Reviews Immunology**, v.11, p.201-212, 2011.

KACZMAREK, E. et al. Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. **Journal of Biological Chemistry**, v.20, n.271 (51), p.33116-22, 1996.

KAIZER, R.R. et al. The effect of aluminum on NTPDase and 5'-nucleotidase activities from rat synaptosomes and platelets. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v.25, p.381-386, 2007.

KANE, D.J. et al. Bcl-2 inhibition of neural death: Decreased generation of reactive oxygen species. **Science**, v.262 (5137), p. 1274-1277, 1993.

KARADENIZ, A. et al. Relationship between Canine Distemper and Oxidative Stress in dogs. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v.159 (8-9), p.462 – 467, 2008.

KIDD, P.M. Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. **Alternative Medicine Review**, v.2, p.155-176, 1997.

KIM, B. et al. Uridine 5'-diphosphate induces chemokine expression in microglia and astrocytes through activation of the P2Y6 receptor. **Journal of Immunology**, v.186, p.3701–3709, 2011.

KOLAKOWSKA, A. Lipid Oxidation in Food Systems. In: SIKORSKI, Z.E.; KOLAKOWSKA, A. **Chemical and Functional Properties of Food Lipids**. Boca Raton: CRC Press, 2003.

KOPROWSKI, H. et al. In vivo expression of inducible nitric oxide synthase in experimentally induced neurologic diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.90, p.3024-3027, 1993.

KUNAPULI, S.P.; DANIEL, J.L. P2 receptor subtypes in the cardiovascular system. **Biochemical Journal**, v.336, p.513-523, 1998.

LA SALA, A. et al. Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. **Journal of Leukocyte Biology**, v.73 (3), p.339-343, 2003.

LAURENT-CRAWFORD, A. G. et al. The cytopathic effect of HIV is associated with apoptosis. **Virology**, v.185, p.829-839, 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.

LUNKES, G.I. et al. NPTDase and 5'-nucleotidase activities in rats with alloxan-induced diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.65 (1), p.1-6, 2004.

MACHADO, G.F. et al. Bovine herpesvirus-5 infection in a rabbit experimental model: Immunohistochemical study of the cellular response in the CNS. **Microbial Pathogenesis**, v.57, p.10-16, 2013.

MANNICK, J. B. The antiviral role of nitric oxide. **Immunologic Research**, v.146, p.693-697, 1995.

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

MARIN, M. C. et al. Apoptosis suppression by bcl-2 is correlated with the regulation of nuclear and cytosolic Ca²⁺. **Oncogene**, v.12, p.2259–2266, 1996.

MEYER, G.M. et al. Establishment of a rabbit model for bovine herpesvirus type 5 neurological acute infection. **Veterinary Microbiology**, v.51, p.27-40, 1996.

MILLS, C.D. et al. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. **Journal of Immunology**, v.164, p.6166–6173, 2000.

MOLLER, T. et al. Activation of mouse microglial cells affects P2 receptor signaling. **Brain Research**, v.853, p.49-59, 2000.

MORETTI, B. et al. Infectious bovine rhinotracheitis clinical observations and isolation of virus. **Veterinaria Italiana**, v.15, p.676, 1964.

MULERO, J.J. et al. CD39-L4 is a secreted human apyrase, specific for the hydrolysis of nucleoside diphosphates. **Journal of Biological Chemistry**, v.274, p.20064-20067, 1999.

MULLER, F. et al. Reduced oxidative burst responses in monocytes and monocyte-derived macrophages from HIV-infected subjects. **Clinical & Experimental Immunology**, v.82, p.10-15, 1990.

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

MUYLKENS, B.; THIRY, J.; KIRTEN, P.; SCHYNTS, F.; THIRY, E. Bovine herpesvirus infection and bovine herpesvirus rhinotracheitis. **Veterinary Research**, v.38, p.181-209, 2006.

NAGY, A.; DELGADO-ESCUETA, A.V. Rapid Preparation of Synaptosomes from Mammalian Brain Using Nontoxic Isoosmotic Gradient Material (Percoll). **Journal of Neurochemistry**, v.43, p.1114–1123, 1984.

NAGY, A.K. et al. Synaptosomal ATPase activities in temporal cortex and hippocampal formation of humans with focal epilepsy. **Brain Research**, v.529 (1-2), p.192-201, 1990.

NAGY, A.K. et al. Reduced cortical ecto-ATPase activity in rat brains during prolonged status epilepticus induced by sequential administration by lithium and pilocarpine. **Molecular and Chemical Neuropathology**, v.31, p.135–147, 1997.

NEELEY, S.P. et al. Herpes simplex virus encephalitis. Neuroanatomical and neurochemical selectivity. **Journal of the Neurological Sciences**, v.71, p.325-337, 1985.

NOBEL, C.S. et al. Mechanism of dithiocarbamate inhibition of apoptosis: thiol oxidation by dithiocarbamate disulfides directly inhibits processing of the caspase-3 proenzyme. **Chemical Research in Toxicology**, v.10 (6), p.636-643, 1997.

NORTH, R.A. Molecular physiology of P2X receptors. **Physiological Reviews**, v.82, p.1013-1067, 2002.

NORTH, R.A.; VERKHRATSKY, A. Purinergic transmission in the central nervous system. **Pflugers Archiv**, v.452, p.479-485, 2006.

PASQUIER, C. et al. **Oxidative stress, cell activation and viral infection.** (Conference), 1994.

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

PERRY, V.H.; TEELING, J. Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration. **Seminars in Immunopathology**, v.35, p.601-612, 2013.

PETERHANS, E. Oxidants and Antioxidants in Viral Diseases: Disease Mechanisms and Metabolic Regulation. **American Society for Nutritional Sciences**, (Suppl), p.962-965, 1997.

PICCONE, M.E. et al. Identification of Cellular Genes Affecting the Infectivity of Foot-and-Mouth Disease Virus. **Journal of Virology**, v.83 (13), p.6681-6688, 2009.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacological Reviews**, v.50 (3), p.413-492, 1998.

RANSOHOFF, R.M.; PERRY, V.H. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. **Annual Review of Immunology**, v.27, p.119-145, 2009.

RANSOHOFF, R.M.; BROWN, M.A. Innate immunity in the central nervous system. **Journal of Clinical Investigation**, v.122, p.1164–1171, 2012.

RATHBONE, M.P. et al. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. **Progress Neurobiology**, v.59, p.663–690, 1999.

RISSI D.R. et al. Meningoencephalitis by bovine herpesvirus-5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, p.251-260, 2007.

ROBSON, S.C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationship and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, v.2, p.409-430, 2006.

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

ROOS, D. Oxidative killing of microbes by neutrophils. **Microbes Infection**, v.5, p.1307-1315, 2003.

RYU, J.K. et al. Adenosine triphosphate induces proliferation of human neural stem cells: role of calcium and p70 ribosomal protein S6 kinase. **Journal of Neuroscience Research**, v.72, p.352-362, 2003.

SABIROV, R.Z.; OKADA, Y. ATP release via anion channels. **Purinergic Signalling**, v.1 (4), p.311-328, 2005.

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

SCEMES, E.; DUVAL, N.; MEDA, P. Reduced expression of P2Y1 receptors in connexin43-null mice alters calcium signaling and migration of neural progenitor cells. **Journal of Neuroscience**, v.23, p.11444-11452, 2003.

SCHRECK, R. et al. Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor B activation in intact cells. **Journal of Experimental Medicine**, v.175, p.1181-1194, 1992.

SCHULZE-OSTHOFF, K. et al. Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. **Journal of Biological Chemistry**, v.167, p.5317-5323, 1992.

SCHWARZ, K.B. Oxidative stress during viral infection: a review. **Free Radical Biology & Medicine**, v.21, p.641-649, 1996.

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

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

SHI, J.D. et al. Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo-apyrase (LALP1). **Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.17474-17478, 2001.

SHISLER, J. L. et al. Ultraviolet-induced cell death blocked by a selenoprotein from a human dermatotropic poxvirus. **Science**, v.279, p.102-105, 1998.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v.82, p.291-295, 1997.

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

SITKOVSKY, M.V. Extracellular purines and their receptors in immunoregulation. Review of recent advances. **Nippon Ika Daigaku Zasshi**, v.65, p.351-357, 1998.

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

SNEDDON, P. et al. Modulation of purinergic neurotransmission. **Progress in Brain Research**, v.120, p.11-20, 1999.

SPANVELLO, R.M. et al. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of rats experimentally demyelinated with ethidium bromide and treated with interferon β . **Neurochemical Research**, v.31, p.455-462, 2006.

STEHLE, J.H. et al. Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A2-adenosine receptor subtype. **Molecular Endocrinology**, v.6, p.384-393, 1992.

STEINER, I.; KENNEDY, G.E. Herpes simplex virus latent infection in the nervous system. **Journal of Neurovirology**, v.1, p.19-29, 1995.

TRAMS, E.G.; LAUTER, C.J. Ecto-ATPase deficiency in glia of seizureprone mice. **Nature**, v.271, p.270–271, 1978.

TROMBETTA, E.S.; HELENIUS, A. Glycoprotein reglycosylation and nucleotide sugar utilization in the secretory pathway: identification of a nucleoside diphosphatase in the endoplasmic reticulum. **EMBO Journal**, v.18, p.3282-3292, 1999.

TURRENS, J.F. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. **Bioscience Reports**, v.171, p.3-8, 1997.

URSO, M.L. & CLARKSON, P.M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v.189, p.41-54, 2003.

VASCONCELOS, S. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30 (5), p.1323-1338, 2007

VASSORT G. Adenosine 5'-triphosphate: a P2-purinergic agonist in the myocardium. **Physiological Reviews**, v.81, pp.767-806, 2001.

VENTURA, M.A.; THOMOPOULOS, P. ADP and ATP activate distinct signaling pathways in human promonocytic U-937 cells differentiated with 1,25-dihydroxy-vitamin D3. **Molecular Pharmacology**, v.47 (1), p.104-114, 1995.

VERDERIO, C.; MATTEOLI, M. ATP mediates calcium signaling between astrocytes and microglial cells: modulation by IFN- γ . **Journal of Immunology**, v.166, p.6383– 6391, 2001.

VOEHRINGER, D.W. et al. Bcl-2 expression causes redistribution of glutathione to the nucleus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.95, p.2956–2960, 1998.

VOGEL, M. et al. Association of the HNK-1 epitope with 5'-nucleotidase from *Torpedo marmorata*. **Biochemical Journal**, v.278, p.199-202, 1991.

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

WAGNER, E.K. & BLOOM, D.C. Experimental investigation of herpes simplex virus latency. **Clinical Microbiology Reviews**, v.10, p.419-434, 1997.

WEIBLEN R. et al. Bovine meningo-encephalitis from IBR virus. **Veterinary Record**, v.124, p.666-667, 1989.

WHITE, E. et al. The 19-kilodalton adenovirus E1B transforming protein inhibits programmed cell death and prevents cytolysis by tumor necrosis factor alpha. **Molecular and Cellular Biology**, v.12, p.2570-2780, 1992.

WILLIAMS, B.B.; LERNER, A.M. Antiviral activity of an adenosine deaminase inhibitor: decreased replication of herpes simplex virus. **Journal of Infectious Diseases**, v.131 (6), p.673-677, 1975.

WISE, D.J. et al. **A Concise Review of Veterinary Virology**. International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), 2004.

WU, G., et al., Glutathione metabolism and its implications for health. **Journal of Nutrition**, v.134, p.489-492, 2004.

XIA, M.; ZHU, Y. Signaling pathways of ATP-induced PGE₂ release in spinal cord astrocytes are EGFR transactivation-dependent. *Glia*, v.59, p.664–674, 2011.

XU, J. et al. Prostaglandin E₂ production in astrocytes: regulation by cytokines, extracellular ATP, oxidative agents. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.69, p.437–448, 2003.

YEGUTKIN, G. Nucleotide and nucleoside converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1783, p.673-694, 2008.

YOUNG, D.; DRAGUNOW, M. Status epilepticus may be caused by loss of adenosine anticonvulsant mechanisms. **Neuroscience**, v.58, p.245–261, 1994.

ZIMMERMANN, H. Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. **Progress Neurobiology**, v.49 (6), p.589-618, 1996.

ZIMMERMANN, H. Purinergic signaling in neural development. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v.22, p.194-204, 2011.

ZOPPELLARO, C. et al. Adenosine-Mediated Enteric Neuromuscular Function Is Affected during Herpes Simplex Virus Type 1 Infection of Rat Enteric Nervous System. **PLoS ONE**, v.8 (8), p.e72648, 2013.