



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

# **AVALIAÇÃO DOS GENES DE HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5 NO CONTROLE DA APOPTOSE**

**ALICE MARTINS DA SILVA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA-DF  
JULHO/2019



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

# **AVALIAÇÃO DOS GENES DE HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5 NO CONTROLE DA APOPTOSE**

**ALICE MARTINS DA SILVA**

**ORIENTADOR: JOSÉ RENATO JUNQUEIRA BORGES**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL  
PUBLICAÇÃO 165/2019

BRASÍLIA/DF  
JULHO/2019



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

## AVALIAÇÃO DOS GENES DE HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5 NO CONTROLE DA APOPTOSE

Alice Martins da Silva

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO  
PROGRAMA DE SAÚDE ANIMAL COMO PARTE  
DOS REQUISITOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE  
MESTRE EM SAÚDE ANIMAL.

Aprovado por :

---

José Renato Junqueira Borges, Prof. Dr. (UnB)  
(ORIENTADOR).

---

Simone Perecmanis, Prof. Dra. (UnB)  
(EXAMINADOR INTERNO)

---

Ana Cláudia Franco, Prof. Dra. (UFRGS).  
(EXAMINADOR EXTERNO)

---

Fabrício Souza Campos, Prof. Dr. (UFT).  
(EXAMINADOR EXTERNO)

BRASÍLIA, DF, 10 DE JULHO DE 2019.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

Silva.A.M. Avaliação dos genes de herpesvírus bovino tipo 5 no controle da apoptose. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília. UnB. 2019. 65p. Dissertação de mestrado.

Documento formal autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização exclusivamente para fins acadêmicos. Foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas desde que citada a fonte.

### FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Alice Martins.

Avaliação dos genes de herpesvírus bovino tipo 5 no controle da apoptose.

Alice Martins da Silva; orientação de José Renato Junqueira Borges - Brasília, 2019. 65 p: il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2019.

1. Alfaherpesvírus bovino tipo 5. 2. US3. 3. Apoptose I. Borges, J.R.J. II. Avaliação dos genes de herpesvírus bovino tipo 5 no controle da apoptose.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## DEDICATÓRIA

À Ariane Abrunhosa e Luiz Martins da Silva.

Meus companheiros de travessias.

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. José Renato Junqueira por acreditar em mim e me proporcionar a liberdade de realizar o mestrado na área de Microbiologia.

Agradeço às professoras Dra. Lígia Cantarino e Dra. Simone Perecmanis por terem me incentivado a realizar o mestrado e me ajudado a crescer desde a graduação. Ambas são para mim, uma referência de profissionalismo e dedicação.

Ao Professor Dr. Bergmann Ribeiro pela paciência, cordialidade, ensinamentos e, principalmente, pelo exemplo de mestre e pesquisador. Agradeço pelas sábias palavras, quando tudo parecia não dar certo. Sem o seu apoio nada disso teria sido possível.

Um agradecimento especial ao Professor Dr. Fabrício Souza Campos, pelo acompanhamento no desenvolvimento desse trabalho, pelas correções e pela paciência e confiança depositadas em mim.

À Professora Dra. Ana Cláudia Franco, a Prof. Dra. Ângela Patrícia Santana e ao Prof. Dr. Renato Resende por aceitarem participar da banca.

Agradeço a todos os técnicos e terceirizados do Hospital Veterinário de Pequenos Animais da UnB: Maurício Macêdo, Cléia Nunes, Ernane Paiva, Marcela Scalon, Bruno Dallago, Salvina, Célia, Dino, Léo e a toda equipe do Laboratório de Microbiologia Veterinária pela amizade, boa companhia e pelo café da tarde de todos esses anos.

Aos doutores Leonardo Assis e Fabrício Morgado pessoas que me aconselharam, gastaram longas horas me explicando técnicas, refazendo experimentos, revisando e discutindo resultados. Ainda, agradeço a convivência e bons momentos com todos os colegas do Laboratório de Baculovírus e Laboratório de Virologia Vegetal: estagiários, mestrados, pós-doutorandos, que de alguma maneira me ajudaram a amadurecer tanto profissionalmente como pessoalmente.

Às amigas de uma vida, Luciana Santos, Sabrina Azevedo, Nanci Hokino, Letícia Muller que independente do momento ou da distância, sempre estiveram por perto.

Agradeço ao meu namorado Juliano Terra que suportou a distância nesses anos e que esteve comigo em todos os momentos, me apoiando e encorajando a ser sempre melhor.

A toda minha família, mas principalmente à minha incrível mãe, Ariane Abrunhosa, que me apoiou e nunca mediu esforços para que eu realizasse meus sonhos. Ao meu pai, Luiz Martins da Silva, meu primeiro professor, por ser tão amoroso e um exemplo de pessoa em tantos aspectos.

Aos órgãos de fomento, FAPDF e CAPES que financiaram esse projeto.

À Universidade de Brasília, essa incrível instituição, e a todos os seus funcionários e professores, muito obrigada!

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>RESUMO</b>	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b>	<b>X</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>3</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>4</b>
3.1. Alfaherpesvírus bovino tipo 5	4
3.2. Epidemiologia e controle	5
3.3. Etiologia – descrição do agente	6
3.4. Genoma	7
3.4.1. Ciclo Replicativo	8
3.4.2. Adsorção, fusão e penetração	9
3.4.3. Transporte e penetração nuclear	9
3.4.4. Expressão gênica e replicação do genoma	9
3.4.5. Morfogênese, maturação e egresso	10
3.4.6. Latência	11
3.4.7. Gene US3	13
3.5. Apoptose	15
3.6. Baculovírus: características gerais	17
3.6.1. Baculovírus no controle da morte celular programada	19
<b>4. REFERÊNCIAS</b>	<b>22</b>
<b>5. INFORMAÇÕES ADICIONAIS</b>	<b>29</b>
<b>6. ARTIGO CIENTÍFICO</b>	<b>30</b>

## RESUMO

### AVALIAÇÃO DOS GENES DE HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5 NO CONTROLE DA APOPTOSE

O *Alphaherpesvirus bovinum* tipo 5 (BoHV-5) é um dos principais agentes responsáveis pela meningoencefalite em bovinos no Brasil, causando perdas econômicas significativas. Sabe-se que outros vírus da família *Herpesviridae*, como o *Alphaherpesvirus bovinum* tipo 1, o *Alphaherpesvirus suíno* tipo 1 e o *Alphaherpesvirus humano* tipo 1 e 2, codificam genes homólogos ao BoHV-5, com reconhecida ação no controle da apoptose. O objetivo deste trabalho foi expressar o gene BoHV-5 US3 em um sistema de expressão baseado em baculovírus para a produção da proteína serina/treonina quinase e avaliar sua atividade no controle da apoptose *in vitro*. Um baculovírus recombinante derivado do *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) contendo o gene US3 e uma deleção no gene *p35* anti-apoptótico de baculovírus foi construído usando o sistema Bac-to-Bac™. Este baculovírus recombinante foi utilizado para avaliar a atividade anti-apoptótica do gene US3 em células de inseto comparando-o com outros dois recombinantes de AcMNPV. Um vírus contendo uma cópia funcional do gene anti-apoptótico *p35* de AcMNPV e outro AcMNPV *p35* knockout com o gene *iap-3* anti-apoptótico do vírus *Anticarsia gemmatilis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV). Descobrimos que o nível de caspase (indicador de apoptose) foi maior nas células de inseto infectadas com o vírus recombinante contendo o gene US3 do que nas células infectadas com os recombinantes AcMNPV com os genes *p35* e *iap-3*. Além disso, o gene *iap-3* AgMNPV foi capaz de substituir eficientemente o gene *p35* no controle da apoptose durante a infecção de células de insetos pelo recombinante AcMNPV contendo o gene *iap-3*. Estes resultados indicam que o gene da proteína quinase BoHV-5 US3 não é capaz de bloquear a apoptose em células de inseto induzidas pela infecção de um AcMNPV *p35* knockout.

**Palavras-chave:** Alphaherpesvírus bovino tipo 5, US3, apoptose.

## ABSTRACT

### EVALUATION OF BOVINE TYPE 5 HERPESVIRUS GENES IN THE CONTROL OF APOPTOSIS

*Bovine alphaherpesvirus* type 5 (BoHV-5) is one of the main agents responsible for meningoencephalitis in bovines in Brazil, causing significant economic losses. It is known that other viruses of the *Herpesviridae* family such as *Bovine alphaherpesvirus* type 1, *Swine alphaherpesvirus* type 1 and the *Human alphaherpesvirus* types 1 and 2 encode genes homologous to BoHV-5, with recognized action in the control of apoptosis. The objective of this work was to express the BoHV-5 US3 gene in a baculovirus based expression system for the production of the serine/threonine kinase protein and to evaluate its activity in the control of apoptosis *in vitro*. A recombinant baculovirus derived from the *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) containing the US3 gene and a deletion in the baculovirus anti-apoptotic gene *p35* gene was constructed using the Bac-to-Bac™ system. This recombinant baculovirus was used to evaluate the anti-apoptotic activity of the US3 gene in insect cells comparing with two other AcMNPV recombinants. One containing a functional copy of the AcMNPV anti-apoptotic *p35* gene and an AcMNPV *p35* knockout virus with the anti-apoptotic *iap-3* gene from *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV). We found that the caspase level (indicator of apoptosis) was higher in insect cells infected with the US3-containing recombinant virus than in cells infected with the AcMNPV recombinants containing the *p35* and *iap-3* genes. Moreover, the AgMNPV *iap-3* gene was able to efficiently substitute the *p35* gene in the control of apoptosis during infection of insect cells by the AcMNPV recombinant containing the *iap-3* gene. These results indicate that the BoHV-5 US3 protein kinase gene is not able to block apoptosis in insect cells induced by the infection of a *p35* knockout AcMNPV.

**Key words:** Alphaherpesvirus Bovine 5, US3, apoptosis.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcMNPV: *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus*  
AcMNPV $\Delta$ p35: *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* com deleção do gene p35  
AcMNPV $\Delta$ p35.IAP3: *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* com deleção do gene p35 e adicionado do gene IAP3 de AgMNPV  
AcMNPV $\Delta$ p35.US3: *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* com deleção do gene p35 e adicionado do gene US3 de BoHV-5  
AgMNPV: *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus*  
BICP0: “bovine infected cell protein”  
BIR: Repeat Baculovirus IAP  
BoHV-1: Alfaherpesvírus bovino tipo 1  
BoHV-5: Alfaherpesvírus bovino tipo 5  
bp: “base pair” ou pares de base  
C-terminal: extremidade carboxi-terminal  
DMSO: dimetilsulfóxido  
DNA: ácido desoxirribonucléico  
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético  
ELISA: “enzyme linked immunosorbent assay”  
EMEM: meio mínimo essencial de “Eagle”  
Fig.: figura  
g: glicoproteína, por exemplo, gB: glicoproteína B  
GC: guanina + citosina  
GenBank: banco de dados do NCBI (“National Center for Biotechnology Information”)  
HHV-1: Alfaherpesvírus humano tipo 1  
HHV-2: Alfaherpesvírus humano tipo 2  
h.p.i.: horas pós infecção  
IAP: Inibidor de apoptose  
IBR: Rinotraqueíte infecciosa bovina  
ICTVdb: banco de dados do “International Committee of Taxonomy of Viruses”  
IF: imunofluorescência  
IPV: vulvovaginite pustular infecciosa  
IRs: sequência repetida interna  
Kb: kilobases  
LTP: “latency-related products”  
M: marcador  
MDBK: células renais de bovino “Madin-Darby”  
mg: miligrama  
MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio  
Min.: minutos  
Mix: mistura dos reagentes para o teste de PCR  
mL: mililitros  
mM: milimolar  
ng: nanogramas  
N-terminal: região amino-terminal  
°C : graus Celsius  
p.: página  
pb: pares de bases  
PCR: reação em cadeia da polimerase

PF: oligonucleotídeo “forward”  
pH: potencial de hidrogênio iônico  
PR: oligonucleotídeo “reverse”  
PRV: Vírus da pseudorraiva  
%: porcentagem  
RNA: ácido ribonucleico  
SDS: dodecil sulfato de sódio  
SFB: soro fetal bovino  
SNC: sistema nervoso central  
Tab.: tabela  
Taq polimerase: enzima extraída da bactéria *Thermus aquaticus*  
TE: tampão Tris-EDTA  
*UL*: região *única longa*  
*US*: região *única curta*  
UV: luz ultravioleta  
 $\mu\text{g}$ : micrograma  
 $\mu\text{L}$ : microlitro  
 $\mu\text{M}$ : micromolar  
v.: volume  
WT: “wild type” ou tipo selvagem

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças causadas por alfa herpesvírus acometem diversas espécies de animais como mamíferos, aves e répteis. São amplamente disseminadas e possuem como principais características um ciclo de replicação curto e capacidade de realizar latência no sistema nervoso de seus hospedeiros (Davidson, et al., 2009; Thiry, et al., 2006). Dentro da pecuária brasileira podemos citar como principais doenças causadas por estes vírus presentes no rebanho a rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) e a meningoencefalite não supurativa. Ambas as doenças possuem como agentes etiológicos, respectivamente, os alfa herpesvírus bovino tipos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) que geram anualmente prejuízos aos produtores (Ackermann and Engels, 2006).

O BoHV-5 é responsável por causar principalmente meningoencefalite não supurativa em bovinos jovens, doença respiratória e, com menor frequência, abortos (Del Médico Zajac, 2010). O BoHV-5 é antigenicamente semelhante ao BoHV-1, agente responsável pela IBR, vulvovaginite pustular infecciosa (IPV), balanopostite e abortos em bovinos (Delhon, et al. 2003; Thiry, et al. 2006). Apesar de ambos serem neurotrópicos, apenas ocasionalmente o BoHV-1 está associado a forma neurológica da doença (Rissi et al., 2007; Blume et al., 2018).

Os animais infectados por BoHV-5 podem apresentar diversos sinais clínicos neurológicos, tais como: andar em círculos, andar cambaleante, opistótono, tremores musculares, ranger de dentes, cegueira, incoordenação, sialorréia, ataxia e, com menor frequência, doenças reprodutivas (Rissi et al., 2007.; Blume et al., 2018.; Favier et al., 2012). Sua morbidade é baixa. Contudo, a letalidade geralmente é alta (Rissi et al., 2007). O estresse associado ao desmame, mudanças alimentares ou de ambiente, transporte, aglomerações ou vacinações, podem prejudicar o sistema imunológico dos animais, predispondo-os à infecção ou à reativação do vírus (Elias et al., 2004).

Um maior número de estudos já foi realizado com o BoHV-1, havendo um crescente conhecimento sobre as características virais e as principais funções de cada gene. Entretanto, comparando essas informações obtidas às do seu homólogo, BoHV-5, responsável por gerar quadros neurológicos e geralmente fatais, pouco se conhece sobre a biologia, virulência e mecanismos de ação desse patógeno. Alguns genes de diferentes alfa herpesvírus como o US3 têm recebido atenção de pesquisadores por serem conhecidamente capazes de regular a morte celular em seus hospedeiros (Yu & He, 2016; Cartier et al., 2003; Barry & McFadden, 1998; Deruelle, et al., 2007; Deruelle & Favoreel., 2011). Em humanos, alguns alfa herpesvírus,

como o *Alfaherpesvírus humano* tipo 1 (HHV-1) e o *Alfaherpesvírus suíno* tipo 1 (SHV-1), esse gene já foi bem estudado e detalhado demonstrando que é capaz de regular a via intrínseca da apoptose celular (Yu & He,2016; Deruelle et al.,2007; Deruelle & Favoreel, 2011).

Para a expressão do gene US3 de BoHV-5, escolhemos um modelo de expressão baseado em baculovírus (BEV). Os baculovírus são vírus de inseto, especificamente de lagartas, que são empregados amplamente para a produção de proteínas heterólogas devido a sua característica biológica que permite a produção de elevada quantidade de proteínas (Ribeiro et al., 2015; Luckow, V. A., 1988). Além disso, também são usados como bioinseticidas no controle de pragas e recentemente ainda têm sido utilizados na terapia gênica como um *delivery* por conseguir ingressar em células de mamíferos. Diversos estudos relacionados à expressão de genes pertinentes à agricultura e de importância médica são realizados com o modelo de vetores baseados em baculovírus, já havendo sido utilizado para a expressão de outras proteínas de alfaherpesvírus e em estudos relacionados à apoptose (Luckow, V.A.,1998; Brzozowska et al., 2010; Munger & Roizman, 2001).

## **2. OBJETIVOS**

### **Objetivo geral:**

O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade anti-apoptótica do gene “unique short” 3 (US3) do BoHV-5, utilizando-se um vetor baseado em baculovírus como modelo de expressão de genes heterólogos.

### **Objetivo específico:**

Clonar o gene US3 de BoHV-5 (amostra EVI88/95) em um vetor de expressão de proteínas baseado em baculovírus e medir a sua influência no controle da apoptose em células de inseto.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Alfaherpesvírus bovino 5

O BoHV-5 foi primeiramente descrito e caracterizado por French E.L, em 1962, na Austrália, em casos de meningoencefalite não supurativa esporádica em bovinos relatados por Johnston, et al. (1962). Inicialmente, foi classificado como um tipo de BoHV-1. Metzler, et al. (1986) utilizou ensaios de restrição enzimática do DNA, testes de reação cruzada e reatividade a anticorpos monoclonais em amostras de vírus causadores de meningoencefalite bovina de casos ocorridos na Austrália e na Argentina com cepas já identificadas e classificadas de BoHV-1 (tipos 1 e 2). Assim, classificou o vírus neurovirulento como um terceiro tipo (BoHV-1 tipo 3). Entretanto, em 1992, o BoHV-5 foi reconhecido e reclassificado pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICVT) como uma espécie distinta de vírus (Roizman, 1992; Del Médico Zajac, et al., 2010).

A doença ocasionada por BoHV-5 não tem caráter sazonal ou predileção por raça ou sexo (Elias et al., 2004). A transmissão do vírus ocorre principalmente por contato direto ou indireto entre bovinos por aerossóis, saliva, sêmen e outras secreções (Rissi et al., 2007). O agente penetra no organismo principalmente pela cavidade nasal, orofaringe, olhos, trato genital e por lesões de pele (Engels & Ackermann, 1996). Esse é transportado de células epiteliais para células do sistema nervoso periférico (bulbo olfatório, gânglio trigêmeo) por via axonal retrógrada até o encéfalo (ponte, bulbo olfatório) onde pode migrar para outras regiões do encéfalo, como cerebelo e tálamo, alcançando o córtex cerebral (Franco & Roehe, 2007). Após a infecção, o vírus pode iniciar o ciclo lítico ou entrar em latência. O período de incubação é de 10 a 15 dias, no qual, após excessiva replicação viral durante o ciclo lítico, a célula hospedeira sofre lise para a liberação das progênies virais e se iniciam dessa forma os sinais clínicos observados. A apresentação neurológica da doença no Brasil tem sido observada em forma de surtos ou de casos individuais, de forma espontânea ou experimental, apresentando alta letalidade e morbidade variável (Rissi et al., 2007; Elias et al., 2004).

Sinais clínicos neurológicos, principalmente em animais jovens, podem ser sugestivos da infecção de BoHV-5. Os principais sinais clínicos neurológicos observados durante a infecção são: convulsões, movimentos de pedalagem, opistótono, decúbito, andar em círculos, cegueira, incoordenação, depressão, anorexia (Rissi et al., 2007; Del Médico Zajac et al., 2010; Elias et al., 2004). Sinais clínicos respiratórios como descarga nasal, conjuntivite, anorexia também podem ocorrer, assim como abortos (Rissi et al., 2007; Favier et al., 2012).

De maneira semelhante, já foram relatados casos de meningoencefalite não supurativa causados por BoHV-1 (Blume et al., 2018; Silva et al., 2007; Favier et al., 2012).

Como achados macroscópicos de necropsia podem ser notadas áreas de malácia, congestão e hemorragia multifocais com achatamento das circunvoluções. Entretanto, lesões macroscópicas no sistema nervoso central nem sempre ocorrem na infecção por BoHV-5 (Elias et al., 2004). Pode haver também acometimento do sistema respiratório com possível broncopneumonia e congestão nasal. Na microscopia podem ser observados meningite não supurativa necrosante, neuroniofagia, necrose do córtex cerebral, degeneração e corpúsculos de inclusão intranucleares eosinofílicos (Del Médico Zajac et al., 2010; Elias et al., 2004).

Diferentes técnicas laboratoriais podem ser utilizadas para a confirmação de casos, como técnicas sorológicas (ELISA, imunoperoxidase, vírus neutralização) moleculares (PCR, nested PCR, restrição enzimática), isolamento viral, imunohistoquímica e histopatologia (Rissi et al., 2007; Campos et al., 2009). Técnicas sorológicas apresentam limitações devido à semelhança gênica com o BoHV-1 e até mesmo com o *Alfaherpesvírus bubalino* tipo 1 (BuHV-1), não sendo indicados para a identificação do vírus.

### **3.2. Epidemiologia e controle**

A presença de BoHV-5 já foi confirmada em diversos países, entretanto possui um maior número de relatos na América do Sul, principalmente no Brasil e na Argentina. A razão dessa maior ocorrência permanece desconhecida (Rissi, et al., 2007; Del Médico Zajac et al.; 2010). Sua prevalência é difícil de estimar devido à sua similaridade com o BoHV-1 e a dificuldade de distinguir as espécies sorologicamente (Franco & Roehe, 2007). Mais recentemente, há relatos de casos em diversos Estados, como Goiás, Rio Grande do Sul, Mato Grosso, Pará (Blume, G.R, 2018; Santos, B.L, 2018; Rondelli L.A.S, 2017; Riet-Correa G., 2006) entre outros. Campos et al. (2009) expõe em seu estudo, com 200 animais no Estado do Rio Grande do Sul, que 75,9% dos animais analisados apresentaram co-infecção com as duas cepas virais e que 93,1% foram positivos para BoHV-5, revelando uma altíssima prevalência do agente.

O continente Europeu possui um histórico no controle e erradicação de BoHV-1, com a erradicação do vírus em alguns países, como Áustria, Dinamarca, Finlândia, Noruega, Suécia e Suíça, nos quais o BoHV-1 é de notificação obrigatória e sua vacinação é proibida (Ackermann & Engels, 2006). A fiscalização sanitária brasileira ainda não possui uma legislação específica que permita o controle dos alfaherpesvírus bovinos, sendo tal

dependente de uma ação voluntária do produtor (Del Médico Zajac et al., 2006). Medidas de manejo como separação de animais soropositivos de negativos, eliminação de animais positivos e reposição com animais negativos, vacinação, teste de sêmen e embriões, higienização de equipamentos com álcool, formaldeído ou detergentes podem diminuir a incidência da doença em propriedades e reduzir prejuízos (Ackermann & Engels, 2006; Rissi et al., 2007; Favier et al., 2012; Franco & Roehe, 2007).

No controle da infecção são utilizadas vacinas comerciais inativadas contendo cepas de BoHV-1 e BoHV-5 (SINDAN, 2019). Existe também uma vacina viva atenuada contra BoHV-1, na qual a glicoproteína E foi deletada. Esta vacina induz proteção cruzada parcial contra BoHV-5 (Del Médico Zajac, et al. 2006; Silva et al., 2006; Spilki et al., 2007). Franco et al. (2007) desenvolveram um BoHV-5 recombinante com deleções dos genes gI, gE e US9. Tal vírus foi testado como candidato vacinal por Campos et al. (2011). Contudo, tanto as vacinas inativadas como as atenuadas, não são capazes de impedir a infecção celular, o estabelecimento da latência e a excreção do vírus no ambiente (Ackermann & Engels, 2006).

### **3.3. Etiologia – descrição do agente**

O BoHV-5 pertence à ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e gênero *Varicellovirus* (ICTV, 2015). Em um estudo realizado por análise de restrição enzimática de isolados australianos, argentinos e brasileiros, o BoHV-5 foi subdividido em subtipos: BoHV-5a, BoHV-5b e BoHV-5c (D'Arce et al., 2002; Del Médico Zajac et al., 2010).

Sua morfologia organiza-se em um vírion geralmente esférico a pleomórfico, com diâmetro de 120 a 200 nm, formado por um nucleocapsídeo icosaédrico de, em média, 100nm de diâmetro formado por 150 hexâmeros e 12 pentâmeros, um tegumento com proteínas dispersas e um envelope formado por glicoproteínas que se organizam em uma membrana com proteínas associadas (Thiry et al., 2006) (Fig.1).

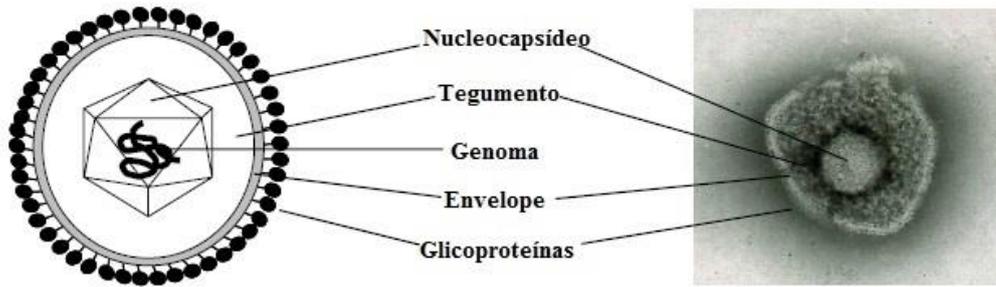


Figura.1. Organização morfológica de alfa herpesvírus de ruminantes.  
Fonte: Thiry, et al. 2006. Tradução nossa.

### 3.4. Genoma do BoHV-5

O genoma completo da amostra SV507/99 de BoHV-5 foi primeiramente sequenciado por Delhon et al. em 2003. Ele é constituído por DNA dupla fita linear não segmentado, com 138.390 bp e 75% de seu conteúdo formado por bases G+C que codificam 72 genes e possui aproximadamente 82% de identidade proteica com BoHV-1. Seu genoma é dividido em duas sequências classificadas como única longa ( $U_L$ ), com 104.054 bp e única curta (do inglês *unique short* ou  $U_S$ ) com 9.548 bp. Essa última uma sequência flanqueada por regiões repetidas inseridas de forma invertida: região interna repetida (IR) e região terminal repetida (TR), codificando 12.109 bp cada (Fig. 2, baseada no genoma de BoHV-1). A replicação do genoma gera quantidades equimolares das duas principais formas do isômero, que difere por uma relativa orientação dos segmentos  $U_S$ . Com esse arranjo o BoHV-5 é classificado como um genoma de herpesvírus tipo D (Roitzman et al., 2007). Dos 72 genes codificados, 68 se localizam na região única longa e curta, enquanto dois genes (BICP4 e BICP22) se iniciam e estão completamente localizados nas regiões repetidas (Delhon et al., 2003).

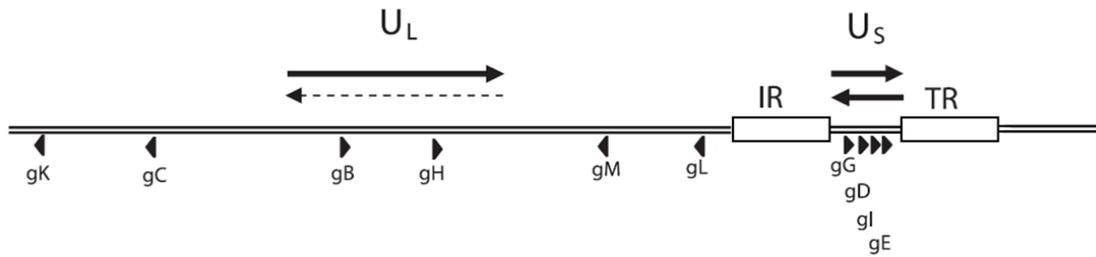


Figura 2. – Organização do genoma de BoHV-1 incluindo as duas sequências únicas, uma longa (UL) e uma curta (US). Esta última é flanqueada por duas sequências repetidas e invertidas (uma interna, IR; e outra terminal, TR). A replicação do genoma gera quantidades equimolares das duas principais formas do isômero, que difere por uma relativa orientação dos segmentos US e UL (setas horizontais preenchidas); o segmento UL é predominantemente observado em uma única orientação, mas pode aparecer raramente invertido (seta horizontal tracejada). A localização dos 10 genes que codificam glicoproteínas é indicada pelas cabeças de seta. Adaptado de Thiry et al. (2006).

A maior similaridade dos produtos de BoHV-5 com BoHV-1 (95% de identidade entre os aminoácidos) é encontrada em proteínas envolvidas na replicação e no processamento do DNA viral (UL5, UL15, UL29, UL39), estando os genes UL14 e UL48 relacionados ao tegumento e o UL19 ao capsídeo. Com menor identidade com o BoHV-1 encontram-se os genes: UL49, UL44, UL24, UL11, UL3.5, UL3, UL0.7, LR e BICP0 (Delhon et al., 2003).

### 3.4.1 Ciclo replicativo

O ciclo replicativo do BoHV-5 ainda não está completamente descrito. Os ciclos explicados a seguir baseiam-se em modelos fundamentados principalmente na replicação dos vírus da subfamília *Alphaherpesvirinae*. Dois ciclos replicativos podem ser reconhecidos nessa subfamília: (i) ciclo lítico ou infecção aguda; (ii) infecção latente. O ciclo lítico ocorre principalmente em células permissivas nos locais de penetração do vírus no hospedeiro como células do tecido epitelial e inicialmente também em neurônios. Durante esse período, os genes para a produção de progênes virais, como os genes *immediate early* (IE), *early* (E) e genes tardios, *late* (L) são expressos em cascata (Silvestro & Bratanich, 2016). Os produtos dos genes IE estão envolvidos em funções iniciais da infecção viral, como a regulação da expressão dos demais genes virais. As principais proteínas produzidas na fase IE são as BICP (*bovine infected cell protein*) bICP0, bICP4, bICP22 e a proteína *cir* (KOPPEL et al., 1997).

A infecção latente ocorre quando o vírus entra em contato com células semipermissivas do hospedeiro como neurônios e ao ter sua atividade de expressão suprimida pela célula, o DNA viral se circulariza de forma epissomal no núcleo. Durante esse período a

expressão gênica é completamente paralisada com exceção do gene LR ou LAT em HHV-1, podendo o vírus ser detectado por PCR ou por hibridização *in situ* (Silvestro & Bratanich, 2016). Períodos de estresse ou uso de terapias com glicocorticoides permitem que a latência viral seja suprimida e o DNA viral passe a ser expresso pela maquinaria celular. O mecanismo de latência é uma característica chave da biologia dos herpesvírus e permite a esses permanecerem em células linfóides ou neurônios de seus hospedeiros por toda a vida, evitando o sistema imunológico (Engels & Ackermann, 1996).

### **3.4.2 Adsorção, fusão e penetração**

Mais detalhadamente, o ciclo replicativo se inicia com a partícula viral entrando em contato com a membrana plasmática da célula alvo por meio de receptores celulares. Os herpesvírus fazem uso de moléculas de glicosaminoglicano, como o sulfato de heparina. Essa primeira interação entre célula (sulfato de heparina) e vírion é realizada pela glicoproteína C (gC). Essa glicoproteína é codificada pelo gene UL44 e é expressa em grandes quantidades no envelope viral e na membrana de células infectadas (Franco & Roehle, 2007; Delhon et al., 2003; Engels & Ackermann, 1996).

Em seguida, acontece a penetração viral por fusão do envelope com a membrana celular. Posteriormente, ocorre a liberação do nucleocapsídeo viral com o tegumento no citoplasma. Durante esse processo, há uma atuação conjunta das glicoproteínas gB e gD e o heterodímero formado pelas glicoproteínas gH e gL (Engels & Ackermann, 1996).

### **3.4.3 Transporte e penetração nuclear**

O transporte do nucleocapsídeo até as proximidades dos poros nucleares acontece pelo auxílio dos microfilamentos celulares. Algumas proteínas do tegumento permanecem no citoplasma, enquanto outras migram em direção ao núcleo. Ao entrar em contato com a membrana nuclear, ocorre a desintegração do nucleocapsídeo e a liberação do DNA viral no núcleo celular (Franco, A.C & Roehle, 2007).

### **3.4.4 Expressão gênica e replicação do genoma**

Após a entrada no núcleo celular, o DNA viral se circulariza e com o auxílio de fatores celulares, virais e da RNA polimerase II celular, inicia-se a transcrição do genoma viral. Os RNAs mensageiros são transportados para o citoplasma onde codificam proteínas envolvidas na regulação do ciclo viral (alfa), na replicação do DNA viral (beta) e na morfogênese de novos vírions (gama) (Franco & Roehle, 2007).

Para a produção das proteínas alfa é necessária a presença da proteína viral 16 (VP16), presente no tegumento. Em HHV-1 a VP16 possui a função de ativar os genes IE que irão produzir as proteínas ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 e ICP47, as quais estão relacionadas à transcrição de genes *Early*. Os genes *Beta* estão relacionados à produção de enzimas, e proteínas acessórias para a replicação viral, enquanto os genes tardios (*Late*) são envolvidos na produção de proteínas que participam na produção de novos vírions. Após a entrada no núcleo, o DNA viral pode ou não se circularizar durante a replicação (Franco & Roehle, 2007). Esse processo ocorre de forma bidirecional, pelo mecanismo de círculo rolante e produz DNA concatemérico (cadeias de genomas recém-formadas ligadas uma as outras) (Jacob et al., 1979).

### **3.4.5 Morfogênese, maturação e egresso**

A morfogênese consiste na montagem das partículas víricas recém formadas, transformando-as em partículas infectivas. O processo se inicia no núcleo onde o DNA replicado é empacotado e encaixado no capsídeo que é formado principalmente pelas proteínas produzidas pelos genes UL33; UL32; UL28; UL25; UL15; UL 26.5 (Delhon et al., 2003; Franco & Roehle, 2007; Kawaguchi et al., 2018). Antes de chegar ao citoplasma, essa partícula deve passar pela membrana nuclear interna, havendo uma interrupção das laminações da membrana, interrompendo a membrana nuclear externa também, até que o nucleocapsídeo “brote” no citoplasma (Kawaguchi et al., 2018). Nesse local, associa-se a proteínas do tegumento. Essa partícula ainda não acabada pode ser empacotada pelo retículo endoplasmático e pelo complexo de Golgi e receber o envelope viral. Pode também egressar da célula em forma de vesículas ou pode adquirir seu envelope ao migrar para a periferia da célula e se fundir com a membrana plasmática e liberar as partículas virais da célula (Kawaguchi, et al., 2018).

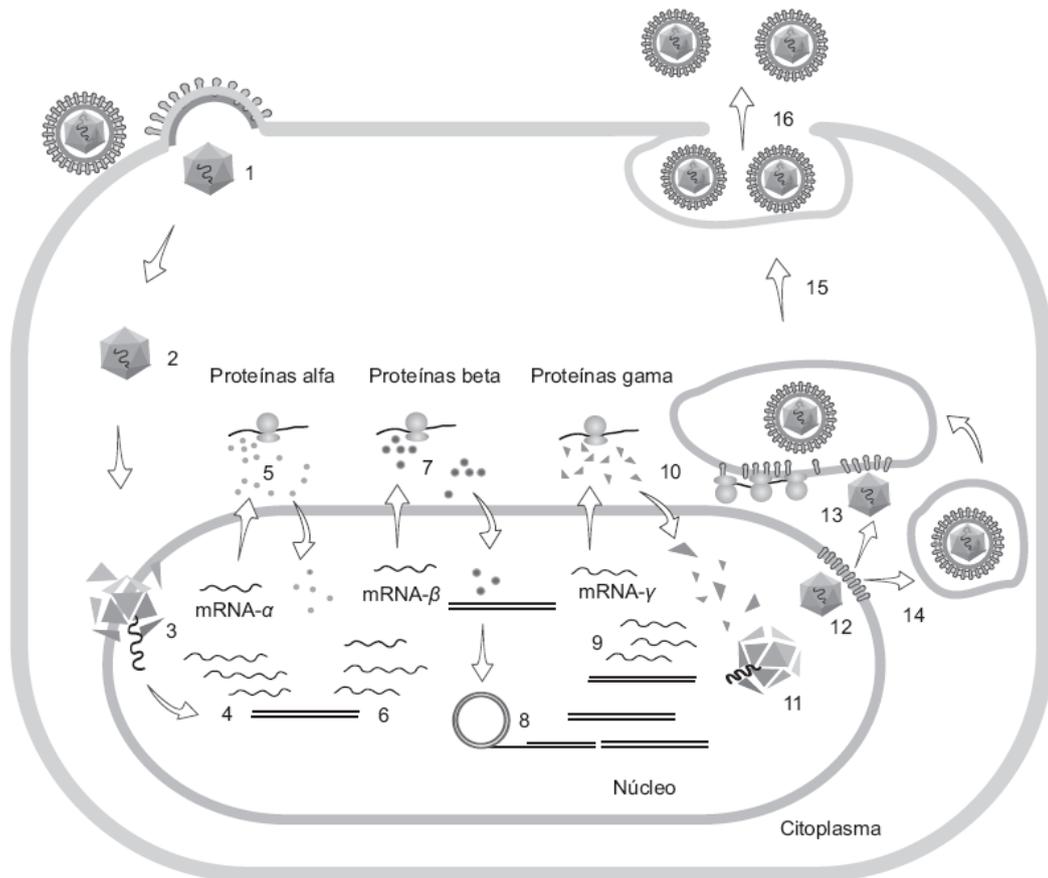


Figura 3 : Ciclo replicativo lítico dos alfa herpesvírus: (1) Penetração por fusão do envelope com a membrana plasmática. (2) Transporte do nucleocapsídeo até os poros nucleares. (3) Desnudamento e liberação do genoma no interior do núcleo. (4) Transcrição dos genes alfa. (5) Tradução das proteínas alfa. (6) Transcrição dos genes beta. (7) Tradução das proteínas beta (8) Replicação do genoma. (9) Transcrição dos genes gama. (10) Tradução das proteínas gama. (11) Início da morfogênese. (12) Aquisição do envelope por brotamento através da membrana nuclear. (13) Aquisição do envelope no aparelho de Golgi. (14) e (15) Transporte dos vírions em vesículas até a superfície celular. (16) Liberação por exocitose. Fonte: Franco & Roehle, 2007.

### 3.4.6 Latência

Os vírus podem estabelecer diferentes estratégias para evadirem do sistema imune, replicarem em maior quantidade ou mesmo conservarem-se no hospedeiro (Barry & McFadden, 1998). Os herpesvírus possuem a característica de serem capazes de permanecer no hospedeiro após infecção aguda por tempo indeterminado. Os principais locais de latência são células altamente diferenciadas como neurônios presentes em gânglios nervosos periféricos e células linfoides, enquanto que no ciclo lítico, as células epiteliais são as mais infectadas (Engels & Ackermann, 1996).

O mecanismo de latência consiste da principal forma do microrganismo permanecer na população hospedeira. O vírus pode ser reativado naturalmente em situações de estresse, terapia com glicocorticoides e ser re-excretado no ambiente, favorecendo a contaminação de novos animais (Rissi et al., 2007). Em bovinos, os locais de latência dos alfa herpesvírus incluem o gânglio do nervo trigêmeo, córtex telencefálico, mesencéfalo, ponte, cerebelo, medula e, menos frequentemente, o bulbo olfatório (Vogel et al., 2003).

Durante a fase de latência, contrariamente ao ciclo lítico, apenas o gene LAT (HHV-1) ou LR (BoHV-1) é transcrito, produzindo os produtos relacionados à latência (LTP – “*latent transcript products*”). O gene relacionado à latência (LR) é assim denominado por ser possivelmente o único gene a ser transcrito em neurônios infectados durante a fase de latência e ser importante durante a reativação viral (Jones & Chowdhury, 2008). Esse gene está localizado na região interna repetida (IR) e é constituído pela presença de duas *open read frame* 1 (ORF1) e 2 (ORF2) (Delhon, et al., 2003).

Uma das funções do gene LR em BoHV-1 ou o seu homólogo LAT de HHV-1 é a inibição da apoptose em neurônios com a finalidade de proteger essas células durante o período de latência (Peng et al., 2004, Ciacci-Zanella et al., 1999). Durante a infecção latente de BoHV-1 o DNA viral pode ser detectado por PCR em células infectadas. Entretanto, apenas o transcrito do gene LR é detectado, sendo transcrito no sentido oposto ao gene IE *BICP0* (Jones & Chowdhury, 2008; Silvestro & Bratanich, 2006).

A maioria das funções essenciais desempenhadas pelo gene LR são codificadas pela ORF2, responsável por modular componentes da sinalização do ciclo celular. Ao se comparar a similaridade das sequências das ORFs de BoHV-5, a ORF1 apresenta 66% e a ORF2 82% de identidade com as ORFs semelhantes de BoHV-1. Sendo a ORF1 um dos genes com menor semelhança entre o homólogo BoHV-1 (Delhon, et al. 2003). Essa região em BoHV-5, diferente do BoHV-1, apresenta-se interrompida quatro vezes, resultando uma leitura de frames de a – d. Nessas diferenças entre as sequências de homólogos possivelmente há uma alteração na funcionalidade das proteínas (Silvestro & Bratanich, 2006).

Terapias com corticosteroides, estresse ou imunodepressão podem iniciar a reativação da latência. Durante esse período pode ser observado maior produção de genes virais, redução drástica da expressão do gene LR e presença de vírus infectivos nas cavidades nasais ou oculares (Jones & Chowdhury, 2008).

### 3.4.7 Gene US3

O gene US3 recebe essa designação por ser o terceiro gene no segmento da região curta do genoma dos alfa herpesvírus (US). Ele é responsável pela codificação da proteína serina / threonina quinase ou proteína quinase, com uma quantidade de aminoácidos variável de acordo com a espécie viral (Barry & McFadden, 1998; Deruelle & Favoreel, 2011). Essa proteína está presente na subfamília *Alphaherpesvirinae* em todos os seus membros e é formada por um domínio de quinase (280-300 aminoácidos) contendo um domínio de ligação de ATP e um sítio ativo catalítico (Deruelle & Favoreel, 2011). A cepa de BoHV-5 SV507/99 contém um gene US3 com 1335 pares de bases e codifica uma proteína com 444 aminoácidos.

Já se tem conhecimento que a proteína quinase do HHV-1, HHV-2 e SHV-1 é uma proteína multifuncional que atua na fosforilação de substratos celulares virais e celulares. Está envolvida em diferentes processos virais como na evasão do sistema imunológico, replicação do DNA viral, egresso da partícula viral do núcleo, remodelamento do citoesqueleto de actina e também em mecanismos relacionados à inibição da apoptose. Essas funcionalidades podem estar ausentes ou com atividade reduzida dependendo da espécie de alfa herpesvírus (Deruelle & Favoreel, 2011; Kawaguchi et al., 2018).

No contexto de apoptose, sabe-se que o gene US3 de HHV-1 é capaz de fosforilar diretamente a proteína da família de BCL-2 pró-apoptótica BAD (Ser-112, Ser-136, Ser-155) inibindo a via intrínseca de apoptose (Kato et al., 2005; Cartier et al., 2003; Munger & Roizman, 2001; Kawaguchi et al., 2018). Cartier et al. (2003) ao avaliar o HHV-1 selvagem e o mutante HHV-1 US3 deletado em células HEp-2 (células de carcinoma laringo epidermóide humano), observou que o vírus selvagem foi capaz de fosforilar a proteína BAD e prevenir a ativação de caspases 9 e 3, além de inibir apoptose causada por estímulos externos como tratamento com sorbitol. Enquanto o mutante US3 deletado apresentou concentrações de caspases 3 e 9 maiores que as do controle. No estudo os autores salientaram que a expressão do gene US3 sozinho não foi capaz de impedir a fragmentação do DNA celular e tão pouco de desativar as caspases 3 e 9 em células HEp-2 tratadas com sorbitol. Além disso, foi observado que após super-expressar esse gene, as funções foram mantidas, justificando então que possivelmente a atividade anti-apoptótica do gene possa ser dose dependente.

Deruelle et al. (2010) infectou células de testículo suíno (ST) e HEp-2 com um SHV-1 selvagem e um SHV-1 mutante US3 deletado (US3null) e observou que o mutante US3null apresentou títulos virais menores que o selvagem em ambas as células. Além disso, demonstrou, mediante a imunomarcagem de caspase 3 ativada, níveis de caspase elevados para o mutante. Anteriormente, em 2007, o mesmo autor realizou um estudo com uma metodologia

diferente ao inserir um ponto de mutação no sítio de ligação de ATP na sequência da proteína quinase US3 de SHV-1, demonstrando que esse sítio é importante para a atividade anti-apoptótica.

Takashima et al. (1999) demonstrou em seu estudo que o gene US3 de BoHV-1 não é essencial para o crescimento *in vitro* em células MDBK ao comparar o crescimento do vírus selvagem com o mutante US3 deletado, que, entretanto, replicou-se mais lentamente. Ainda, observou que o vírus BoHV-1 selvagem foi capaz de inibir a apoptose causada pelo tratamento com sorbitol, de forma mais lenta, impedindo a fragmentação do DNA celular. Além disso, demonstrou que após a infecção com o seu mutante US3 deletado, as células não apresentaram morfologia apoptótica nem sofreram degradação do seu material genético. Esses resultados indicam que o gene US3 não está diretamente envolvido na atividade anti-apoptótica relacionada ao vírus.

Em 2011, Ladelfa et al., realizou o primeiro estudo avaliando a atividade anti-apoptótica do gene US3 de BoHV-5 e possíveis desorganizações causadas no citoesqueleto celular. Os autores utilizaram como metodologia a transfecção do gene US3 selvagem e a transfecção do gene US3 com a proteína quinase inativada em células Vero (células de rim de macaco-verde africano) e ST. Para avaliação anti-apoptótica do gene foi utilizada marcação por imunofluorescência para caspase-3 ativa. Posteriormente, as células ST foram tratadas com estaurosporina para a indução da morte celular. Como resultado, entre as células não infectadas (Mock) foi observado mais de 80% de atividade de caspase 3. O BoHV-5 US3 selvagem, SHV-1 US3 selvagem (usado para comparação) e o BoHV-5 US3 quinase inativada demonstraram, respectivamente, 63%, 56% e 80% de atividade de caspase-3. Esses dados não indicam uma completa atividade anti-apoptótica, mas sugerem que o gene possa estar envolvido na prevenção da apoptose por estímulos externos em células infectadas.

Outra função conhecida do gene US3 é o rearranjo drástico do citoesqueleto na célula hospedeira. Essa reorganização causa um arredondamento celular devido ao estresse das fibras e com frequência, a formação de projeções celulares. Essas projeções podem conter actina e microtúbulos, estando possivelmente envolvida na disseminação viral célula-a-célula (Deruelle & Favoreel, 2011). Brzowska et al., (2010) também observaram marcado rearranjo do citoesqueleto e projeções celulares contendo microtúbulos ao expressar o gene US3 de BoHV-1, utilizando o sistema de vetores baseados em baculovírus em diferentes tipos celulares (Vero, células do esôfago bovino - KOP, células de rim suíno - SK6 e células traqueais bovinas embrionárias - EBTr). Mutantes do gene US3 que continham alterações de aminoácidos em suas sequências não demonstraram alterações morfológicas.

Deruelle & Favoreel (2011) realizaram um estudo comparativo entre a similaridade de sequências de aminoácidos codificados pelos genes US3 ortólogos de diferentes espécies virais e observaram que a semelhança entre aminoácidos é variável, mas que há pouca diferença entre os domínios de quinase. A sequência de aminoácidos da proteína US3 quinase de BoHV-5 apresenta 81% de similaridade com BoHV-1, 41% com SHV-1 e apenas 31% com HHV-1 e HHV-2, o que pode estar relacionado às diferenças funcionais dessa proteína entre os vírus.

### **3.5 Apoptose**

A palavra apoptose foi proposta por Kerr, Wyllie e Currie em 1972 e significa “o cair”, como o cair de folhas em uma árvore, ou seja, a eliminação de algo não mais necessário (Kerr et al.,1972). Apoptose ou morte celular programada é um processo celular que tem como objetivo a eliminação de células não mais úteis, anormais ou em excesso para o organismo. Essa eliminação segue um mecanismo altamente complexo e sofisticado que gera um padrão morfológico característico que é regulado por diversos fatores como genes, enzimas e estímulos diversos. Quando seu controle não é realizado corretamente pela célula ou quando ocorre uma infecção por um agente infeccioso capaz de regular a apoptose, podem ocorrer desequilíbrios, infecções mais intensas ou a formação de neoplasias, por exemplo, (D’arcy, M.S. 2019).

A apoptose se opõe a outro processo celular, a necrose, que do grego significa “matar”. Nesse segundo processo ocorre a morte acidental, passiva e de maneira abrupta, onde as células incham e estouram extravasando seu conteúdo celular entre os tecidos adjacentes. A necrose é geralmente desencadeada por dois principais fatores: interferência no suprimento de energia e dano direto à membrana plasmática da célula (Elmore, S., 2007).

Durante o processo de apoptose, modificações celulares são reguladas e padrões morfológicos podem ser visualizados, como o desprendimento da matriz extracelular, enrugamento/“embolhamento” da membrana plasmática, condensação da cromatina, quebra do citoesqueleto e formação de corpos apoptóticos com organelas pouco afetadas (Raff, M.,1998; Elmore, S. 2007). Durante esse mecanismo celular de “fragmentar” a célula em porções menores (corpos apoptóticos), ocorre também a mudança na organização da membrana plasmática, acontecendo a externalização da fosfatidil serina 1, havendo então uma alteração na sua estrutura onde células como macrófagos as reconhecem e as fagocitam sem que ocorra um processo inflamatório (Suzanne, M. 2013).

A apoptose é iniciada pela ativação de um grupo de cisteínas proteases, ou também conhecidas como caspases. Essas são produzidas nas células na forma inativa e são ativadas quando ocorre uma quebra proteolítica (Elmore, S. 2007). Essas enzimas podem ser ativadas e desencadeadas por duas diferentes vias de estímulos: a via extrínseca e a via intrínseca. A primeira via consiste da ativação de caspases devido a um fator como falta de nutrientes, choque térmico, drogas ou dano externo. Por outro lado, a via intrínseca, está relacionada ao detrimento interno, ou seja, ao dano direto ao DNA ou em suas organelas, como por exemplo: hipóxia, estresse oxidativo, radiação, toxinas, vírus, entre outros. Independentemente da via, assim que um dano celular é detectado ocorre a sinalização, ativando pró-caspases e caspases iniciadoras que, em seguida, ativam caspases executoras (3, 6, 7), capazes principalmente de desorganizar o citoesqueleto, romper a membrana nuclear, ativar endonucleases, fragmentar o DNA celular e causar a morte celular (D'arcy, M.S. 2019).

A via intrínseca envolve uma variedade de estímulos e ocorre quando há dano celular e a permeabilidade do poro da membrana mitocondrial é alterada liberando fatores mitocondriais pró-apoptóticos como o citocromo c e proteína Smac/Diablo (D'arcy, M.S. 2019). O citocromo c, presente na respiração mitocondrial, quando liberado no citoplasma ativa a proteína adaptadora com fator de ativação de apoptose 1 (apaf1) que se oligomeriza formando o apoptossomo que se liga a pró-caspase 9 e a ativa em caspase 9, ativando as caspases executoras. Essa permeabilidade no poro mitocondrial pode ser controlada por proteínas pró-apoptóticas ou anti-apoptóticas, todas pertencentes à família das proteínas Bcl 2 (D'arcy, M.S. 2019). As proteínas BAX e BAK, são geralmente ativadas quando não são detectados fatores de crescimento, hormônios, citocinas ou sinais de sobrevivência e então, essas permitem a abertura dos poros mitocondriais para a ativação da apoptose pela via intrínseca. Ainda dentro da mesma família, outras proteínas como a própria Bcl2 e a Bcl X<sub>L</sub> têm o papel de impedir a apoptose inibindo as próprias proteínas Bcl2 pró-apoptótica. Esses mecanismos de regulação entre as proteínas irá depender do estímulo recebido pela célula (Raff, M., 1998; D'arcy, M.S. 2019).

A ativação da via extrínseca é desencadeada por fatores externos. Na superfície celular estão presentes proteínas transmembranas que possuem um domínio fora da membrana citoplasmática, um domínio transmembrana e domínios intracelulares no citoplasma. Essas proteínas recebem o nome de FAS (CD95), ligantes ou domínios de morte e são ativadas quando proteínas extracelulares ligantes como as presentes no linfócito citotóxico se conectam a elas e sinalizam à célula o estímulo para a realização da apoptose (Raff, M. 1998; Elmore, S. 2007). Após essa ligação, ocorre a formação do complexo de sinalização indutora

da morte (do inglês *death inducing signaling complex* ou DISC), que consiste na junção de proteínas adaptadoras e de pró-caspases que serão ativadas em caspases iniciadoras (8 e 10) e logo ativarão as executoras. Para esse mecanismo de ativação de morte celular, existem proteínas como as FLIP e proteínas semelhantes às pró-caspases sem sítio de ativação, que podem competir ou bloquear esses estímulos externos quando inadequados (Elmore, S. 2007). O mecanismo de ativação da via extrínseca pode ainda não ser o suficiente para a ativação da apoptose, podendo a via intrínseca ser ativada adicionalmente e, ambas, desencadearem estímulos para a ativação da apoptose na célula.

### **3.6 Baculovírus, características gerais:**

Os baculovírus são vírus espécie-específicos de invertebrados pertencentes à família *Baculoviridae*. São vírus amplamente utilizados e estudados devido às suas aplicabilidades na agricultura como controle biológico de insetos-pragas e principalmente como ferramenta de expressão de genes heterólogos dentro de laboratórios de pesquisa, além de serem empregados como vetores em terapias gênicas (Castro et al., 2005; Kost et al. 2005; Clem, R. J, 2001).

Esses vírus de inseto possuem as características de serem envelopados, com nucleocapsídeo em formato de bastonete e formados por material genético de DNA dupla fita circular e genomas entre 80-180 kb, capazes de codificar entre 90 e 181 genes em suas duas fitas (Ayres et al., 1994; Ribeiro et al., 2015). Sua principal característica é sua capacidade de gerar dois fenótipos durante o ciclo viral: os vírus brotados (BV) e os vírus derivados de oclusão (ODV) (Carpes et al., 2005).

O primeiro fenótipo é responsável pela disseminação das progênes virais célula-a-célula. O segundo fenótipo são partículas virais revestidas por proteínas que formam uma estrutura cristalina (poliedrina ou granulina) dentro do núcleo das células hospedeiras. Esses cristais ao se acumularem no núcleo destroem a célula e após a morte de seu hospedeiro permanecem nos tecidos em decomposição de seus hospedeiros. Outras larvas ingerem esses cristais presentes no ambiente e em folhas. No intestino médio, sob pH alcalino do suco gástrico, esses cristais se dissolvem liberando partículas víricas que, em contato com as células intestinais, são adsorvidos em sua membrana e penetram no citoplasma onde são englobados por endossomos e, com o auxílio de microtúbulos e filamentos de actina, seu nucleocapsídeo é direcionado ao núcleo, reiniciando o ciclo (Carpes et al., 2005; Luckow, V.A.,1988; Qin et al., 2019).

A família *Baculoviridae* é formada por quatro gêneros distintos (*Alphabaculovirus*, *Betabaculovirus*, *Gamabaculovirus* e *Deltabaculovirus*) que abrangem principalmente vírus de lagartas, mosquitos, moscas e crustáceos. A espécie mais estudada e considerada como protótipo dessa família é a do *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) pertencente ao gênero *Alphabaculovirus* (ICTV, 2019; Ribeiro et al., 2015).

Como modelos aplicados desses vírus podemos citar o uso do baculovírus *Anticarsia gemmatilis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) como um bioinseticida de pragas que tem sido utilizado aproximadamente em um milhão de hectares anualmente no Brasil no controle da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatilis*) com a finalidade de reduzir o uso excessivo de defensivos agrícolas químicos (Moscardi, F., 1999). Outro produto fundamentado no uso de baculovírus é o sistema de expressão baseado em vetores de baculovírus (*baculovirus expression vectors* - BEV). Esse sistema é baseado em duas estratégias de manipulação do genoma do baculovírus AcMNPV: recombinação homóloga ou transposição sítio específica. Esse sistema é capaz de expressar grandes quantidades de proteínas (fusionadas ou não fusionadas) de eucariotos e procariotos em células de inseto devido a presença de fortes promotores gênicos, como o gene da proteína fibrosa *p10* e o gene da proteína poliedrina (*polh*) (Ribeiro et al., 2015; Luckow, V.A, 1988). Outra vantagem desse sistema é a especificidade desse vírus em infectar células de inseto, o que o torna uma ferramenta de expressão segura (pouco patogênica) para mamíferos e plantas. Como exemplo de proteínas de herpesvírus já expressas em sistema BEV podemos citar as proteínas polimerase, helicase e nuclease alcalina de HHV-1 (Grady, et al. 2014), glicoproteína E do SHV-1 (Dambros et al., 2007; Serena et al., 2013) e a proteína serina / treonina quinase de BoHV-1 (Brzozowska et al., 2010).

Baseado nos estudos de Ciccarone et al. (1997) e Luckow et al. (1993) foi criado um modelo comercial para a produção de baculovírus recombinantes. O Sistema de expressão Bac-to-Bac<sup>TM</sup> é fundamentado na transposição de um plasmídeo doador (pFastBac<sup>TM</sup>) contendo um múltiplo sítio de clonagem e a presença do promotor da poliedrina dentro do transposon Tn7 com as regiões de transposição Tn7R/Tn7L. Nesse sítio de clonagem é inserido o gene de interesse com o uso de enzimas de restrição. Após isso é realizada a transposição do plasmídeo para uma *Escherichia coli* modificada contendo o genoma de AcMNPV (bacmídeo) modificado (DH10Bac<sup>TM</sup>) com auxílio da enzima transposase presente em um plasmídeo auxiliar (Fig. 4). Posteriormente, o DNA desse plasmídeo contendo o DNA de AcMNPV adicionado do gene de interesse é transfectado em células de inseto com o uso de um lipossomo catiônico.

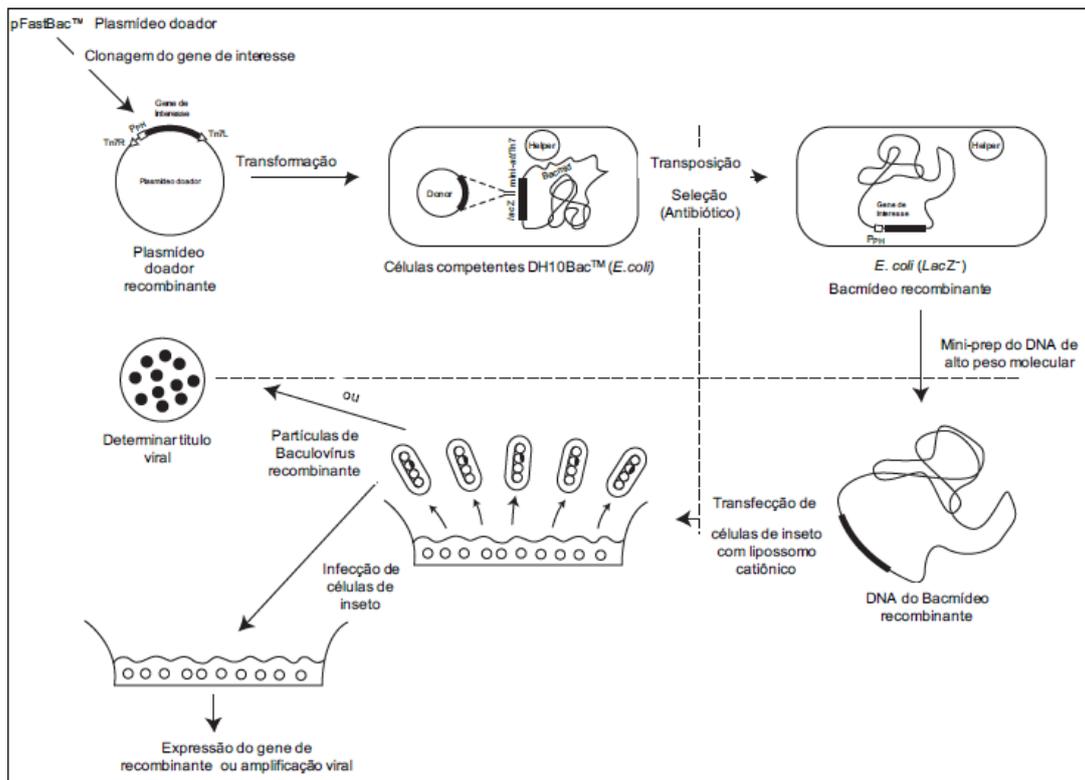


Figura 4. Esquema demonstrando o sistema Bac-to-Bac<sup>TM</sup> e suas etapas. Inicialmente o gene de interesse é clonado em sítio múltiplo de clonagem dentro de um plasmídeo doador específico contendo o transposon Tn7. Esse plasmídeo é transformado em uma *Escherichia coli* recombinante contendo o genoma completo do AcMNPV (bacmídeo) e com o auxílio de um plasmídeo auxiliar ocorre a transposição sítio-específica entre o gene de interesse e o bacmídeo. Após essa inserção o DNA plasmideal dessa bactéria é extraído por uma lise alcalina (mini-prep) e transfectado em células de inseto utilizando-se um lipossomo catiônico. O DNA viral entra nas células e inicia o ciclo replicativo do baculovírus, gerando vírus brotados e oclusos. Os vírus recombinantes brotados são coletados e se é realizada a amplificação do vírus recombinante de interesse. Fonte: Bac-to-Bac<sup>TM</sup>. Baculovirus expression system (ThermoFisher, Waltham, MA, USA).

### 3.6.1 Baculovírus no controle da morte celular programada.

Dentro do contexto de morte celular programada e apoptose, os baculovírus possuem relevada importância devido à presença de diferentes genes com reconhecida atividade anti-apoptótica em seus genomas e ao seu histórico na descoberta dos genes IAPs (Inibidores de

apoptose) (Clem, R.J, 2001). Nesse conjunto histórico, foi graças à observação da atividade anti-apoptótica do gene *p35* do AcMNPV pelos pesquisadores do laboratório da Dra. Lois Miller, em 1991, que se encontraram os genes IAPs e foi possível o aprofundamento dos mecanismos de regulação da morte celular por vírus e pela própria célula hospedeira (Clem, R.J, 2015).

Entre os genes supressores de apoptose nos baculovírus podemos citar o gene *p35* presente no AcMNPV, capaz de produzir uma proteína de 35 Kda. Essa proteína atua no fim da cascata de caspases, como substrato das caspases, inibindo caspases efetoras e também caspase-1 em linhagem de *Spodoptera frugiperda* (Clem, R.J. 2001). Sua proteína, ao ser clivada por alguma dessas caspases, gera um complexo irreversível, impedindo que as modificações celulares pró-apoptóticas se iniciem e que ocorra a ativação de demais caspases. Tal gene já foi testado em diversos modelos como nematódeo (*C. elegans*), inseto, mamífero e em diferentes linhagens celulares apresentando sempre o mesmo fenótipo supressor de apoptose. Até hoje, genes com atuação semelhante não foram relatados (Clem, R.J. 2015., Barry & McFadden,1998).

Os genes IAPs, são genes presentes em baculovírus e em diversos outros organismos, incluindo células de mamíferos. São capazes de suprimir a apoptose celular e também de modulá-la de acordo com o estímulo recebido. Sua descoberta ocorreu primeiramente nos baculovírus *Orgyia pseudotsugata multiple nucleopolyhedroviruse* (OpNMPV) e *Cydia pomonella granulovirus* (CpNMPV). Esses genes recebem essa classificação devido à semelhança entre as sequências presentes neles. Para um gene ser considerado um IAP é necessário que possua uma ou duas sequências BIR (Repeat baculovirus IAP) na posição amino terminal e uma sequência de Ringer Finger na extremidade carboxi-terminal (Barry & McFadden,1998). Os genes IAPs de baculovírus são classificados dentro de 6 diferentes grupos (1-6) de acordo com o tamanho do seu produto, a quantidade e posição da sequência BIR e também pelo seu hospedeiro (Fig. 5).

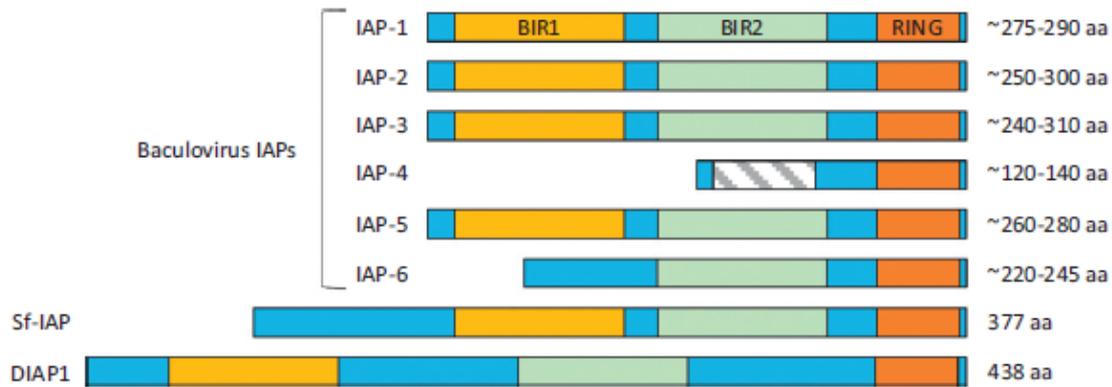


Figura 5: Diagrama generalizado ilustrando os domínios presentes nas seis diferentes linhagens de IAPs de baculovírus, assim como o Sf-IAP de *S. frugiperda* e *Drosophila* DIAP1. Domínios BIR1 são mostrados em amarelo, domínio BIR2 em verde e os domínios de RING em laranja. O domínio BIR homólogo de IAP-4 é mostrado em cinza e são pouco conservados. A faixa aproximada de tamanho (em aminoácidos) de cada linhagem é mostrada à direita. Fonte: Clem, R.J, 2015, tradução nossa.

Os mecanismos de inibição de apoptose utilizados pelas IAPs ainda não são completamente esclarecidos, sabendo-se que esses podem variar. Existem genes IAPs sem atividade supressora significativa de apoptose como os IAP-1 e IAP-2 presentes no AcMNPV, sendo ainda desconhecida a função desses genes nesse vírus. Conhecidamente já é reconhecida e explicada a função anti-apoptótica dos genes IAP-3 presente nos Alpha e Betabaculovírus. Esse grupo inibe a atividade de caspases iniciadoras, bloqueando assim o restante da cascata de caspase. Clem, R.J (2015) afirma que com exceção do grupo IAP-3, as IAPs inibem a apoptose não apenas bloqueando a via de caspase, mas também ubiquitinando proteínas pró-apoptóticas e inibindo fatores mitocondriais.

#### 4. REFERÊNCIAS

- Ackermann, M. & Engels, M. Pro and contra-IBR eradication. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.113, p.293-302, 2006.
- Ayres, MD, Howard S.C, Kuzio J, Lopez-Ferber M, Possee R.D. The complete DNA sequence os *Autographa californica* nuclear polyhedrosis vírus, **Virology**, 202:586-605. 1994.
- Barry, M., McFadden, G. Apoptosis regulators from DNA viroses. **Current Opinion in Immunology**, 10: 422 - 430.1998.
- Blume, G.R., Silva, L.F., Borges, J.R.J., Nakazato L., Terra, J.P., Rabelo, R.E., Vulcani V.A.S. & Sant'Ana, F.J.F. Caracterização etiológica, epidemiológica e clínico-patológica da meningoencefalite por herpesvírus bovino em bovinos no Estado de Goiás. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 38 (5): 902-912. 2018.
- Bratanich, A., Silvestro, Carolina. The latency related gene of bovine herpesvirus types 1 and 5 and its modulation of cellular processes. **Arch Virol**, 161:3299-3308.2016.
- Brzozowska, A., Rychlowski, M., Lipinska, A. D. & Bienkowska- Szewczyk, K. Point mutations in BHV-1 Us3 gene abolish its ability to induce cytoskeletal changes in various cell types. **Vet Microbiol** 143, 8–13. 2010.
- Campos, F.S., Franco, A.C., Hübner, S.O., Oliveira, M.T., Silva, A.D., Esteves, P.A., Roehe, P.M., Rijsewijk, F.A.M. Hight prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. **Vet. Microbiol.**, v. 139, p. 67-73, 2009.
- Campos F.S, Dezen D, Antunes D.A, Santos H.F, Arantes T.S, Cenci A, Gomes F, Lima F.E.S, Brito W.M.E.D, Filho H.C.K, Batista H.B.C.R, Spilki F.R, Franco A.C, Rijsewijk F.A.M, Roehe P.M: Efficacy of an inactivated, recombinant bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) vaccine. **Vet Microbiol.**, 148: 18-26. 2011.

Carpes MP, de Castro MEB, Soares EF, Villela AG, Pinedo FJR, Ribeiro BM. The inhibitor of apoptosis gene (iap-3) of Anticarsa gemmatalis multicap-sid nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) encodes a functional IAP. **Arch Virol**, 150:1549–62. 2005.

Ciccarone, V. C., Polayes, D., and Luckow, V. A. Generation of Recombinant Baculovirus DNA in E. coli Using Baculovirus Shuttle Vector. **Methods in Molecular Medicine** (Reischt, U., Ed.), 13, Humana Press Inc., Totowa, NJ. 1997.

Ciacchi-Zanella J, Stone M, Henderson G and Jones C. The latency-related gene of bovine herpesvirus 1 inhibits programmed cell death. **Journal of Virology**, 73:9734–9740.1999.

Clem, R.J, Miller LK. Control of programmed cell death by the baculovirus genes p35 and iap. **Mol Cell Biol**, 14:5212-5222. 1994.

Clem, R.J. Review. Baculoviruses and apoptosis: the good, the bad, and the ugly. **Cell Death and Differentiation**, 8, 137 - 143. Nature Publishing Group. 2001.

Clem, R.J. Viral IAPs, then and now. **Semin Cell Dev Biol** 39:72-79. 2015.

Dambros, R.M.F., Ribeiro, B.M., Aguiar, R.W.S., Schaefer, R., Esteves, P.A., Perecmanis, S., Simon, N.L., Silva, N.C., Coldebella, M., Ciacchi-Zanella, J.R., 2007. Cloning and expression of Aujeszky's disease virus glycoprotein E (gE) in a baculovirus system. **Braz. J. Microbiol.** 38, 494–499.

D'Arce, R.C., Almeida, R.S., Silva, T.C., Franco, A.C., Spilki, F., Roehle, P.M., Arns, C.W., Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. **Veterinary Microbiology**, 88, 315–324. 2002.

D'Arcy, M.S. Cell Death. A review of the major forms of Apoptosis, Necrosis and Autophagy. **Cell biology international**. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cbin.11137>. Acesso em: 09 de maio de 2019.

Davison, A.J.; Eberle, R.; Ehlers, B.; Hayward, G.S.; McGeoch, D.J.; Minson, A.C.; Pellett, P.E.; Roizman, B.; Studdert, M.J.; Thiry, E. The order Herpesvirales. **Arch. Virol.**, 154, 171–177, 2009.

Del Médico Zajac, M.P., Puntel, M., Zamorano, P., Sadir, A.M., Romera, S.A. BHV-1 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle. **Research in Veterinary Science** 81, 327–334. 2006.

Del Médico Zajac, M.P., Ladelfa, M. F. ; Kotsias. F., Muylkens, B., Thiry, J., Thiry, E, Romera, S.A. Biology of bovine herpesvirus 5. **The Veterinary Journal** 184, 138–145. Elsevier. 2010.

Delhon, G.; Moraes, M.P.; Lu, Z.; Afonso, C.L.; Flores, E. F.; Weiblen, R.; Kutish, G.F.; Rock, D.L. Genome of bovine herpesvirus 5. **J. Virology**, 77:10339-10347, 2003.

Deruelle, M., Geenen, K., Nauwynck, H. J. & Favoreel, H. W. A point mutation in the putative ATP binding site of the pseudorabiesvirus US3 protein kinase prevents Bad phosphorylation and cell survival following apoptosis induction. **Virus Res** 128, 65–70. 2007.

Deruelle, M. J., De Corte, N., Englebienne, J., Nauwynck, H. J. & Favoreel, H. W. Pseudorabies virus US3-mediated inhibition of apoptosis does not affect infectious virus production. **J Gen Virol** 91, 1127–1132. 2010.

Deruelle, M., Favoreel, H.W. Keep it in the subfamily: the conserved alphaherpesvirus US3 protein kinase. **J. Gen. Virol.** 92, 18-30. 2011.

Elias F., Schild A.L. & Riet-Correa F. Meningoencefalite e encefalomalacia por herpesvírus bovino-5: distribuição das lesões no sistema nervoso central de bovinos naturalmente infectados. **Pesq. Vet. Bras.** 24:123-131. 2004.

Elmore, S. Apoptosis: A Review of programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, 35:495–516, 2007.

Engels, M., Ackermann, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Veterinary Microbiology**, v. 53, p. 3-15, 1996.

Favier, P.A, Marin, M.S, Pérez, S.E. Role of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) in diseases of cattle. Recent findings on BoHV-5 association with genital disease. **Open Veterinary Journal**, Vol. 2: 46-53.2012.

Franco, A.C. & Roehle P.M. Herpesviridae, p.433-488. In: Flores E.F.(Ed.), **Virologia Veterinária**. Editora UFSM, Santa Maria. 2007.

French, E.L. A specific virus encephalitis in calves: isolation and characterization of the causal agent. **Australian Veterinary Journal** 38, 216–221.1962.

Grady, L.M., Ping, B., Weller, S.K.HSV-1 Protein Expression Using Recombinant Baculoviruses. **Methods Mol Biol**. 2014; 1144: 293–304. 2014.

ICTV. Disponível online em: [https://talk.ictvonline.org/ictv/proposals/2015.010aD.A.v2.Herpesvirales\\_spreng.pdf](https://talk.ictvonline.org/ictv/proposals/2015.010aD.A.v2.Herpesvirales_spreng.pdf). 2015.

ICTV. Disponível online em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. 2019

Jacob, R.J.; Morse, L.S.; Roizman, B. Anatomy of herpes simplex virus DNA. Accumulation of head-to-tail concatemers in nuclei of infected cells and their role in the generation of the four isomeric arrangements of viral DNA. **J. Virol.**, United States, v.29, p.448-457, 1979.

Johnston, L.A.Y., Simmons, G.C., McGavin, M.D. A viral meningoencephalitis in calves. **Australian Veterinary Journal** 38, 207–215. 1962.

Jones, C. Alphaherpesvirus latency: its role in disease and survival of the virus in the nature. **Adv. Virus Res.** 51:47-99. 1998.

Jones, C. Chowdhury, S. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. **Animal Health Research Reviews**. 8(2); 187-205. 2008.

Kato A, Yamamoto M, Ohno T, Kodaira H, Nishiyama Y, Kawaguchi Y. Identification of proteins phosphorylated directly by the Us3 protein kinase encoded by herpes simplex virus 1. **J Virol** 79(14):9325–9331. 2005.

Kawaguchi, Y., Mori, Y., Kimura, H. **Human Herpesviruses**. Advances in Experimental Medicine and Biology. Vol 1045. Springer. 2018.

Kerr, J.F.; Wyllie, A.H.; Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**., v.26 (4), p. 239-57, 1972.

Kost, T.A., Condreay, J.P. and Jarvis, D.L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. **Nat Biotechnol** 23: 567–575. 2005.

Ladelfa, M.F., Kotsias, Fiorella., Del Médico Zajac, M.P., Broeke, C.V., Favoreel, H., Romera, S.A., Calamante, Gabriela. Effect of the US3 protein of bovine herpesvirus 5 on the actin cytoskeleton and apoptosis. **Veterinary Microbiology** 153, 361-366. 2011.

Luckow, V.A., Trends in the development of baculovirus expression vectors. **Nat. Biotechnol.** Vol.6, 47. 1988.

Luckow, V. A., Lee, C. S., Barry, G. F., and Olins, P. O. Efficient Generation of Infectious Recombinant Baculoviruses by Site-Specific Transposon-Mediated Insertion of Foreign Genes into a Baculovirus Genome Propagated in *Escherichia coli*. **J. Virol.** 67, 4566-4579. 1993.

Metzler, A.E., Schudel, A.A., Engels, M. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. **Archives of Virology** 87, 205–217. 1986.

Moscardi, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. **Annu Rev Entomol** 44: 257– 289. 1999.

Munger, J., Chee, A. V. & Roizman, B. The US3 protein kinase blocks apoptosis induced by the d120 mutant of herpes simplex virus 1 at a premitochondrial stage. **J Virol** 75, 5491–5497. 2001.

Qin, F., Xu, C., Hu, J., Lei, C., Zheng, Z., Peng, K., Wang, H., Sun, X. Dissecting the cell entry pathway of baculovirus by single particle tracking and quantitative electron microscopic analysis. **Journal of Virology**. JVI Accepted Manuscript Posted Online. 2019.

Raff, M. Cell suicide for beginners. **Nature** 396:119–22.1998.

Reed, L.J.; Muench, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **Am. J. Epidemiol.** 1938, 27,493–497.

Ribeiro, B.M., Morgado, F.S., Ardisson-Araújo, D.M.P.,Silva, L.A., Cruz, F.S.P., Chaves, L.C.S., Quirino, M.S., Andrade, M.S., Corrêa, R.F.T., Baculovírus para a expressão de proteínas recombinantes em células de inseto. In: Resende, R. R. (Org.). **Biotecnologia Aplicada à Saúde**. 255-306. Ed. Blucher. Vol.2. 2015.

Riet-Correa G., Duarte M.D., Barbosa J.D., Oliveira C.M.C., Cerqueira V.D., Brito M.F. & Riet-Correa F. Meningoencefalite e polioencefalomalacia causadas por Herpesvírus bovino-5 no Estado do Pará . **Pesquisa Veterinária Brasileira** 26(1):44-46. 2006.

Rissi D.R., Rech R.R., Flores E.F., Kommers G.D. & Barros C.S.L. Meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 27(7): 251-260. 2007.

Rondelli L.A.S., Silva G.S., Bezerra K.S., Rondelli A.L.H., Lima S.R., Furlan F.H., Pescador C.A. & Colodel E.M. Doenças de bovinos no Estado de Mato Grosso diagnosticadas no Laboratório de Patologia Veterinária da UFMT (2005-2014). **Pesquisa Veterinária Brasileira** 37(5):432-440.2017.

Roizman, B., R. C. Desrosiers, B. Fleckenstein, C. Lopez, A. C. Minson, and M. J. Studdert. The family *Herpesviridae*: an update. **Arch. Virol.** 123: 425–449. 1992.

Roizman, B., Pellet, P.E. The family Herpesviridae: a brief introduction. In: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., Chanock, R.M., Monath, T.P., Melnick, J.L., Roizman, B.,

Straus, S.E. (Eds.), **Fields Virology**, 4<sup>a</sup> ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 2480–2499. 2007

Santos B.L., Estima-Silva P., Coelho A.C.B., Oliveira P.A., Soares M.P., Sallis E.S.V., Bruhn F.R.P. & Schild A.L. Doenças do sistema nervoso central de bezerros no sul do Rio Grande do Sul: uma contribuição ao diagnóstico diferencial. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 38(4): 685-691. 2018.

Serena, S.M, Geisler,C., Metz, G.E, Corva S.G. Mórtoła, E.C, Larsen, A., Jarvis,D., Echeverría, G.M. Expression and purification of Suid Herpesvirus-1 glycoprotein E in the baculovirus system and its use to diagnose Aujeszky's disease in infected pigs. **Protein expression and purification**. 90. 1- 8. 2013.

Silva, A.D., Spilki, F.R., Franco, A.C., Esteves, P.A., Hu"bner, S.O., Driemeier,D., Oliveira, A.P., Rijsewijk, F., Roehe, P.M. Vaccination with a gE-negative bovine herpesvirus type 1 vaccine confers insufficient protection to a bovine herpesvirus type 5 challenge. **Vaccine** 24, 3313–3320. 2006.

Silva, M.S.; Brum, M.C.S.; Loreto, E.L.S.; Weiblen, R.; Flores, E.F. Molecular and antigenic characterization of Brazilian bovine herpesvirus type 1 isolates recovered from the brain of cattle with neurological disease. **Virus Research**. V. 129, p.191–199. 2007.

SINDAN. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal. Disponível em: <https://sistemas.sindan.org.br/cpvs/pesquisar.aspx>. Acesso 01 de junho de 2019.

Spilki, F.R., Silva, A.D., Hu"bner, S., Esteves, P.A., Franco, A.C., Driemeier, D., Roehe, P.M. Partial Protection induced by a BHV-1 recombinant vaccine against challenge with BHV-5. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 1026, 247– 250. 2004.

Studdert, M. J. Bovine encephalitis herpesvirus. **Vet.Rec.** 125:584. 1989.

Suzanne M.; Steller. H. Review. Shaping organisms with apoptosis. **Cell Death and differentiation**. 20, 669–675. 2013.

Takashima, Y., Tamura, H., Xuan, X. & Otsuka, H. Identification of the US3 gene product of BHV-1 as a protein kinase and characterization of BHV-1 mutants of the US3 gene. **Virus Res** 59, 23–34. 1999.

Thiry, J.; Keuser, V.; Muylkens, B.; Meurens, F.; Gogev, S.; Vanderplasschen, A.; Thiry, E. Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. **Vet. Res.**, v.37, p.169-190, 2006.

Vogel F.S.F., Caron L., Flores E.F., Weiblen R., Winkelmann E.R., Mayer S.V. & Bastos R.G. Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous system of latently, experimentally infected calves. **J. Clin. Microbiol.** 41:4512-4520. 2003.

Yu X., He Sudan. The interplay between human herpes simplex virus infection and the apoptosis and necroptosis cell death pathway. **Virology Journal.** 13:77. 2016.

## 5. INFORMAÇÕES ADICIONAIS

Como parte da dissertação, foi redigido um artigo científico intitulado “Evaluation of anti-apoptotic activity of Bovine alphaherpesvirus type 5 US3 protein kinase in baculovirus” que será submetido para publicação no periódico Veterinary Microbiology.



23 **Abstract**

24 *Bovine alphaherpesvirus* type 5 (BoHV-5) is one of the main agents responsible for  
25 meningoencephalitis in bovines in Brazil, causing significant economic losses. It is known  
26 that other viruses of the *Herpesviridae* family such as *Bovine alphaherpesvirus* type 1, *Swine*  
27 *alphaherpesvirus* type 1 and the *Human alphaherpesvirus* types 1 and 2 encode genes  
28 homologous to BoHV-5, with recognized action in the control of apoptosis. The objective of  
29 this work was to express the BoHV-5 US3 gene in a baculovirus based expression system for  
30 the production of the serine/threonine kinase protein and to evaluate its activity in the control  
31 of apoptosis *in vitro*. A recombinant baculovirus derived from the *Autographa californica*  
32 multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) containing the US3 gene and a deletion in the  
33 baculovirus anti-apoptotic gene *p35* gene was constructed using the Bac-to-Bac™ system.  
34 This recombinant baculovirus was used to evaluate the anti-apoptotic activity of the US3 gene  
35 in insect cells comparing with two other AcMNPV recombinants. One containing a functional  
36 copy of the AcMNPV anti-apoptotic *p35* gene and an AcMNPV *p35* knockout virus with the  
37 anti-apoptotic *iap-3* gene from *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus  
38 (AgMNPV). We found that the caspase level (indicator of apoptosis) was higher in insect  
39 cells infected with the US3-containing recombinant virus than in cells infected with the  
40 AcMNPV recombinants containing the *p35* and *iap-3* genes. Moreover, the AgMNPV *iap-3*  
41 gene was able to efficiently substitute the *p35* gene in the control of apoptosis during  
42 infection of insect cells by the AcMNPV recombinant containing the *iap-3* gene. These results  
43 indicate that the BoHV-5 US3 protein kinase gene is not able to block apoptosis in insect cells  
44 induced by the infection of a *p35* knockout AcMNPV.

45

46 *Key words:* Bovine alphaherpesvirus 5, US3, apoptosis.

47

## 48        **1. Introduction**

49        *Bovine alphaherpesvirus 5* (BoHV-5) is a pathogen causing mainly meningoencephalitis  
50 in young cattle, and occasionally respiratory and reproductive disease. BoHV-5 belongs to the  
51 family *Herpesviridae* and is very similar to *Bovine alphaherpesvirus 1* (BoHV-1) (French,  
52 E.L., 1962; Del Médico Zajac et al., 2010). Like other herpesviruses, BoHV-5 has evolved  
53 strategies to escape from the immune system and remain in the host for its entire lifespan  
54 (Griffin et al., 2010). These viruses efficiently invade the peripheral nervous system and  
55 establish lifelong latency in neurons present in peripheral ganglia (Jones, C. 1998; Ciacci-  
56 Zanella et al. 1999).

57        The serine/threonine kinase protein encoded by US3 gene has recognized anti-apoptotic  
58 activity and is produced by *Alphaherpesvirinae* subfamily members, such as *Human*  
59 *alphaherpesvirus 1* (HHV-1), *Human alphaherpesvirus 2* (HHV-2), *Suid alphaherpesvirus 1*  
60 and *Gallid alphaherpesvirus 2* (Deruelle et al., 2011; Kato et al., 2005; Murata et al.,2002;  
61 Deruelle et al., 2007; Schumacher et al., 2008). Virally encoded kinases are able to  
62 phosphorylate viral and cellular substrates. In HHV-1, some studies have shown that US3 is  
63 able to phosphorylate the pro-apoptotic proteins Bad (Bcl-2-antagonist of cell death) and Bid  
64 (BH3 interacting-domain death agonist) to block their function in promoting apoptosis  
65 (Munger and Roizman, 2001; Cartier et al., 2003a; Cartier et al., 2003b). These functionalities  
66 may be absent or reduced depending on the alphaherpesvirus species (Deruelle and Favoreel,  
67 2011; Kato and Kawaguchi, 2018).

68        A few studies have been carried out with respect to the BoHV-1 and BoHV-5 US3 gene  
69 (Takashima et al., 1999; Ladelfa et al., 2011; Brzozowska et al.,2018). Takashima et al.  
70 (1999) in their work with wild-type BoHV-1 and BoHV-1 US3 mutants did not observe  
71 apoptosis in any of the cells infected with the wt virus and with US3 mutants when these cells  
72 were treated with sorbitol. Demonstrating that the gene US3 has no direct effect in apoptosis.

73 In a more recent study involving the BoHV-1 US3 gene Brzozowska et al., (2018) have  
74 demonstrated with more modern and sensitive techniques that the protein kinase of US3 is  
75 able to inhibit apoptosis triggered by viral infection and by external stimuli (sorbitol or  
76 staurosporine). They linked the presence of US3 with the phosphorylation of BAD, a pro-  
77 apoptotic protein. Similar data were observed for HHV-1 and SHV-1 (Cartier et al., 2003a;  
78 Duroelle et al., 2007). Ladelfa et al. (2011) carried out a similar study with the BoHV-5 US3  
79 gene, concluding that the US3 gene shows resistance to apoptosis and is capable of inducing  
80 modifications in the cytoskeleton. The aim of the present work was to test the anti-apoptosis  
81 activity of the BoHV-5 US3 in insect cells using a recombinant baculovirus containing the  
82 US3 gene and with a deletion in the *p35* gene (baculovirus anti apoptotic gene).

## 83 **2. Materials and methods**

### 84 *2.1 Virus and cell culture*

85 CRIB cell (Flores and Donis, 1995) were cultured in Eagle's minimal essential  
86 medium supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics for virus replication.  
87 The BoHV-5 strain EVI 88/95 (Salvador et al., 1998) was used for US3 gene amplification.  
88 The insect cells *Trichoplusia ni* (TN5B), *Spodoptera frugiperda* (Sf-21) and *Spodoptera*  
89 *frugiperda* 9 Easy Titration (Sf9-ET) were cultured for the replication of recombinant and  
90 control baculoviruses at 27° C in TC-100 medium (Vitrocell, Campinas, SP, Brazil)  
91 supplemented with 10% FBS (ThermoFisher) (for details about cells and virus used in this  
92 study see Table 1 in supplementary material).

### 93 *2.2 BoHV-5 US3 gene cloning*

94 BoHV-5 US3 gene was amplified by PCR from viral DNA (BoHV-5 EVI88/95 strain)  
95 and cloned into pFastBac™1 (ThermoFisher) donor plasmid. First, amplification was carried  
96 out with forward primer 6xHis-US3F: 5'-

97 GGATCCATGCACCATCACCATCACCATGGAGCGCGCGGGCGGAGCGGCTGGCC-3'  
98 and reverse primer US3R: 5'-AAGCTTTTACCCCAAGGCCGCGCTGAAGGCGG-3',  
99 which introduced the recognition sites for *Bam*HI, 6xHisTag, and *Hind*III, respectively. The  
100 BoHV-5 US3 PCR product of 1335 bp in length was amplified with 5 µl of 10X PCR Buffer,  
101 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 3% DMSO, 10 µM of each primer, 200 µM dNTPs, 5 units of Taq DNA  
102 polymerase (ThermoFisher) and was added ultrapure water to a final volume of 50 µl. The  
103 reaction was carried out for 35 cycles of 95°C for 30 s, 65°C for 30 s, and 72°C for 1 min 30 s  
104 and final extension for 10 minutes at 72°C. The PCR product was visualized by UV light on  
105 ethidium bromide-stained 0.8% agarose gel and purified with the GFX PCR Kit and Gel Band  
106 Purification Kit (GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA). Following PCR, the purified  
107 product and the donor plasmid were digested with the restriction enzymes described above,  
108 ligated and transformed into DH10β competent cells to generate pFastBac1.US3 (Fig. 1). The  
109 correct orientation of the US3 BoHV-5 gene into this plasmid was checked by plasmid DNA  
110 sequencing at Macrogen (South Korea).

### 111 *2.3 Recombinant virus*

112 The pFastBac<sup>TM</sup>1.US3 was then used to produce a recombinant (Us3.bacmid) via  
113 transposition in *E. coli* DH10Bac cells containing the *Autographa californica*  
114 nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) genome with a deletion in the baculovirus antiapoptotic  
115 gene *p35* in a plasmid form called bacmid, according to the Bac-to-Bac<sup>TM</sup> system manual.  
116 The AcMNPV *p35* knockout with BoHV-5 US3 gene (AcMNPVΔ*p35*.US3) bacmid DNA  
117 was extracted and then was used for transfection in Sf-21 and TN5B cells. Virus titrations  
118 were done in 96-well microtiter plates (O'Reilly et al., 1992) using *Spodoptera frugiperda* 9  
119 Easy Titration (Sf9-ET) insect cells (Hopkins & Esposito, 2009).

120

121 *2.4 BoHV-5 US3 protein expression analysis*

122 Western blot was used to detect the expression of BoHV-5 US3 in Sf-21 cells. Sf-21  
123 ( $10^6$  cells) were infected with the recombinant and wild type viruses (MOI of 1) and at 72  
124 hours post-infection (h p.i.) the supernatant was removed, cells were washed with 1X PBS  
125 (Phosphate Buffered Saline) and centrifuged in a microfuge (5000 x g/ 5 min). The precipitate  
126 was separated by electrophoresis on 12% polyacrylamide denaturing gel (SDS-PAGE) and  
127 transferred to a PVDF membrane with a semi-dry transfer cell (BioRad) following the  
128 manufacturer's instructions. The membrane was blocked in 1x PBS Buffer (137 mM NaCl,  
129 2.7 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4) containing 3% skimmed milk  
130 powder for 16 h at 4 °C, washed three times with PBS tween (0.05%) and incubated with  
131 mouse monoclonal anti-hexa-histidine (anti-6xHis) antibody (Sigma), followed by incubation  
132 with the alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse/rat or anti-rabbit secondary antibodies  
133 (Sigma). In order to detect the recombinant BoHV-5 US3 polypeptides expressed in the Sf-21  
134 cells, blots were developed using the NBT/BCIP (Sigma) substrate dissolved in alkaline  
135 phosphatase buffer (NaCl 100 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM e Tri-HCl 100 mM – pH 9.0).

136

137 *2.5 Morphological and immunofluorescence assay analysis*

138 Sf-21 cells were infected with recombinant AcMNPV.US3 at the MOI of 1. After 48 h  
139 p.i., cells were fixed by incubation with 3.7% formalin at room temperature for 30 min. Cells  
140 were washed and permeabilized by incubation with 0.1% Triton-X at room temperature for 10  
141 min. After blocking with 3% BSA solution, the anti-6xHis-tag primary antibody was added at  
142 a dilution of 1:1000 at 4°C for 24 h. Cells were washed and incubated with secondary  
143 antibodies containing goat anti-rabbit IgG-Alexa 488 (ThermoFisher) at 37°C in the dark for  
144 1 h to detect cellular localization of BoHV-5 US3. Cells were counterstained with DAPI

145 (ThermoFisher) to label the nuclei and the microscopy images were analyzed by ImageJ  
146 software.

## 147 *2.6 Viral DNA quantification by quantitative real time PCR*

148 Quantitative real time PCR (qPCR) assay was performed to analyze the numbers of  
149 viral genome copies. During apoptosis, cells undergo several morphological and biochemical  
150 changes and fewer viral copies can be detected. So, the assay was conducted to assess whether  
151 BoHV-5 US3 gene was able to inhibit apoptosis in Sf-21 cells. In this case 24 well plates  
152 containing  $2 \times 10^5$  cells/well were infected at a MOI of 1 in biological triplicates of the  
153 following virus: (i) AcPG (AcMNPV with GFP) (Ardisson-Araújo et al., 2015), (ii)  
154 AcMNPV $\Delta$ p35 (AcMNPV p35 knockout) (Clem and Miller, 1994), (iii) AcMNPV $\Delta$ p35.US3  
155 (AcMNPV p35 knockout with BoHV-5 US3 gene) (this study), (iv) AcMNPV $\Delta$ p35.IAP3  
156 [AcMNPV p35 knockout with the *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus *iap-3*  
157 gene] (unpublished data) (Table 1 in supplementary material). After 1h incubation at 27°C,  
158 excess virus was removed by collecting the viral inoculum, washing the cells and replacing  
159 with fresh medium which constitutes the start of infection time. Cells were monitored daily  
160 the cell pellets were collected at 0, 24 and 48 hours post infection (h.p.i.). qPCR assays were  
161 performed in triplicate with the DNA extracted of each sample in a Rotor-Gene Q (Qiagen®).  
162 For this, 10  $\mu$ L reaction volume containing 10ng DNA of each virus, 1  $\mu$ M of each primer  
163 (AcMNPVIE1F: 5'-CCATCGCCAGTTCGCTTA-3' and AcMNPVIE1R: 5'-  
164 CTGTTAAGGGTTGCACACAGC-3'), 5  $\mu$ L of SYBR Green Real time PCR master mix and  
165 ultrapure water.

## 166 *2.7 Assays for caspase 3/7 activities and cell viability*

167 Sf-21 insect cells were infected at a MOI 1 with the viruses described previously or  
168 mock-inoculated, and tested for caspase-3/7 activity and cell viability at 12, 24 and 48 hours

169 p.i. in biological triplicate using a specific-substrate, luminescent and fluorescent based  
170 commercial kit (ApoLive-Glo™ Multiplex Assay Kit, Promega). Total fluorescent light and  
171 luminescent light were measured in the same time points using SpectraMax M2 microplate  
172 reader and GloMax®.

### 173 *2.8 Statistical analysis*

174 Data were analyzed using GraphPad Prism Software version 7 (GraphPad Software,  
175 Inc., San Diego, CA, USA) and presented as mean ± standard deviation (SD).

176

## 177 **3. Results**

### 178 *3.1 BoHV-5 US3 protein expression analysis*

179 BoHV-5 US3 protein was expressed in the cultured Sf-21 insect cells and detected by  
180 SDS-PAGE and Western Blot. The recombinant full-length serine/threonine kinase protein  
181 (US3) was detected as a band between 50 and 75 kDa (Fig. 2) as expected from its theoretical  
182 molecular mass.

### 183 *3.2 Morphological and immunofluorescence assay analysis*

184 Sf-21 insect cells exhibited various responses against baculovirus recombinants. AcPG  
185 showed few morphological changes at 24 h.p.i. (Fig. 3A). After 48 h.p.i. the cells showed the  
186 presence of occlusion bodies (polyhedral) in the nucleus of the cells and absence of apoptosis  
187 (Fig. 3B). The AcMNPVΔp35 infected cells showed apoptotic bodies, cell shrinkage and  
188 disorganization of the plasma membrane at 24 h.p.i. (Fig. 3C) and multiple apoptotic bodies  
189 and polyhedra production at 48 h.p.i. (Fig. 3D). The AcMNPVΔp35.IAP3 virus induced few  
190 morphological changes by 24 h.p.i. (Fig. 3E) and the absence of cells in apoptosis at 48 hours

191 (Fig. 3F). The AcMNPV $\Delta$ p35.US3 induced the same morphological changes as the  
192 AcMNPV $\Delta$ p35 at 24 h.p.i. (Fig. 3G). After 48 h.p.i., it was possible to observe an increase in  
193 the number of apoptotic cells (Fig. 3H). Mock infected cells showed the same pattern at 24  
194 h.p.i. (Fig. 3I) and after 48 h.p.i. (Fig. 3J). Additionally, in cells infected with the  
195 AcMNPV $\Delta$ p35.US3, more elongated cells were noted, with formation of multiple and large  
196 cytoplasmic vacuoles and cells varying in size (Fig. 4A). To verify these vacuoles in the Sf-  
197 21 cells infected with the AcMNPV $\Delta$ p35.US3 cells were prepared for immunostaining  
198 labelling. The BoHV-5 US3-tagged was identified by indirect immunofluorescence using the  
199 6xHis-tag monoclonal antibody and was found in the cytoplasm, surroundings the nucleus  
200 and the vacuole (Fig. 4B). Additionally, DAPI-stained nuclei showed nuclear fragmentation  
201 (Fig. 4B).

202

### 203 *3.3 Viral DNA quantification by qPCR*

204 Recombinant viruses (AcPG, AcMNPV $\Delta$ p35, AcMNPV $\Delta$ p35.IAP3 and  
205 AcMNPV $\Delta$ p35.US3) were independently quantified using a qPCR assay in Sf-21 insect cells.  
206 After 1 h. p. i. (time zero) the concentration of intracellular viral DNA was of  $10^4$  to  $10^5$  viral  
207 particles (Fig. 5). The amount of viral DNA increased significantly at 24 h. p. i. for all  
208 viruses. Copy numbers of viral DNA value ranged of  $10^7$  to  $10^8$  virus and was significantly  
209 lower for AcMNPV $\Delta$ p35.US3 at 24 h.p.i., but was not significantly different among  
210 recombinant viruses at 48 h p. i. (Fig. 5).

### 211 *3.4 Assays for caspase 3/7 activities and cell viability*

212 Caspase activity decreased overtime during AcPG and AcMNPV $\Delta$ p35.IAP3  
213 infection of Sf-21 insect cells (Fig. 6A). For AcMNPV $\Delta$ p35 and mock-infected cells the  
214 caspase activity increased between 12 to 24 h.p.i and decreased from 24 to 48 h.p.i. However,

215 to AcMNPV $\Delta$ p35.US3 there was an increase of caspase activity overtime and the caspase  
216 activity values were similar to AcMNPV $\Delta$ p35, significantly different from the other  
217 recombinant viruses (Fig. 6A). Additionally, we observed that there was a significant  
218 decrease in the viability of the Sf-21 insect cells between 12 and 24 h. p. i., but no significant  
219 decrease in viability was detected between 24 and 48 h. p. i. (Fig. 6B).

220

#### 221 4. Discussion

222 In this study, we used the baculovirus expression system to express the BoHV-5 US3  
223 protein kinase in Sf-21 insect cells. Western blot of AcMNPV $\Delta$ p35.US3 revealed the  
224 expression of a single protein band at approximately 62 kDa. A similar size has been observed  
225 in other studies (Brzozowska et al., 2018; Takashima et al., 1999; Purves et al., 1987;  
226 Daikoku et al., 1993). In addition, we compared the replication of three different  
227 recombinants (AcPG, AcMNPV $\Delta$ p35.US3 and AcMNPV $\Delta$ p35.IAP3) carrying different anti-  
228 apoptotic genes. Of the three anti-apoptotic proteins analyzed here (BoHV-5 US3, AcMNPV  
229 *p35* and AgMNPV *iap-3*), AgMNPV *iap-3* was found to be the most potent inhibitor of  
230 apoptosis. Moreover, BoHV-5 US3 protein kinase showed poor blockade in apoptosis  
231 induced during infection of Sf-21 cells with the recombinant AcMNPV $\Delta$ p35.US3.

232 Unlike other US3 protein kinases of other alphaherpesviruses ours finds related to  
233 apoptosis differs from the data of US3 orthologs genes (Brzozoska et al., 2018; Duroelle et  
234 al., 2007; Cartier et al., 2003a). Here, Sf-21 insect cells exhibited various responses against  
235 the recombinants baculoviruses. During the infection, it was possible to visualize by light  
236 microscopy the evident phenotypes of apoptosis in the AcMNPV $\Delta$ p35 infected cells and with  
237 less intensity in the AcMNPV $\Delta$ p35.US3 infected cells. These data are in agreement with the  
238 phenotype presented in other studies that used the mutant AcMNPV $\Delta$ p35 as a tool for the  
239 study of apoptosis (Chejanovsky, N., 2016; Yan et al., 2010). AcPG and AcMNPV $\Delta$ p35.IAP3

240 viruses induced few significant morphological changes during 48 hours post-infection, and no  
241 apoptotic cells or cell death were observed, which of probably due to the effect of their  
242 apoptosis suppressor genes *p35* and *iap-3* (Clem & Miller, 1994; Carpes et al., 2005).

243         Viral DNA quantification of the recombinant viruses was done by qPCR. It has been  
244 used for the quantification of several viruses and it is a sensitive and accurate method for  
245 baculovirus detection and quantification (Azhar et al., 2013). The amounts of intracellular  
246 viral DNA by qPCR after 24 h. p. i. increased for all viruses. AcMNPV $\Delta$ p35.US3 DNA  
247 quantification after 24 h. p. i. showed a slightly difference compared to others recombinants,  
248 probably caused by apoptosis as evidenced by an increased activation of caspases 3/7. The  
249 *iap-3* protein was able to block apoptosis efficiently, since little apoptotic cells were detected.  
250 Although there was induction of apoptosis in insect cells infected with the AcMNPV $\Delta$ p35 and  
251 AcMNPV $\Delta$ p35.US3 viruses, significant viral replication was detected over time.

252         The quantification of caspases 3/7 showed similarity between observed phenotypes in  
253 light microscopy. The viruses AcMNPV $\Delta$ p35 and AcMNPV $\Delta$ p35.US3 showed high levels of  
254 caspases with concomitant decreasing cell viability. The AcPG and AcMNPV $\Delta$ p35.IAP3  
255 viruses presented caspases values close to those of uninfected and decreasing number of cells  
256 with few changes in cell viability. Studies performed with the wild-type SHV-1 US3 gene, 24  
257 h.p.i showed low effector caspase 3 and low percentage of positive cells by the TUNEL assay,  
258 compared to their deletion mutants in the US3 gene when induced to apoptosis by either  
259 staurosporine or sorbitol (Duroelle et al., 2007; Geenen et al., 2005). Takashima et al., (1999)  
260 demonstrated that BoHV-1 US3 doesn't have activity in blocking apoptosis in MDBK cells,  
261 but no caspase activity was measured and apoptosis effects were only evaluated by DNA  
262 degradation, a poor sensitive technique. More recently, Brzozowska et al., (2018) showed, by  
263 TUNEL assay and flow cytometry that BoHV-1 US3 is capable to block external stimuli  
264 apoptosis and apoptosis induced during infection. In addition, Ladelfa et al. (2011), observed

265 that the BoHV-5 US3 gene is able to neutralize apoptosis induced by external stimuli  
266 (staurosporine) in Vero and ST cells (swine testicles) transfected cells , presenting 60% of  
267 effector caspase 3 labeled cells, while uninfected cells showed 80% of cells positive for  
268 caspase 3 labeling. These data indicates that there is activation of caspase 3 during infection  
269 of these cells, demonstrating the activation of the apoptotic pathway, and that the US3 gene of  
270 BoHV-5 was not able to inhibit or drastically reduce cellular apoptosis as demonstrated for  
271 SHV-1 or BoHV-1 (Duroelle et al., 2007; Brzozowska et al., 2018). Moreover, Duroelle et al.,  
272 2011 performed a comparison of the amino acid identity of the serine/threonine kinase  
273 proteins of some alphaherpesviruses with the BoHV-5 protein kinase and found only 31%  
274 identity to HHV-1 and HHV-2, 42% with SHV-1 and 81% identity to BoHV-1. These low  
275 identities between protein kinases possibly reflect the different efficacies in the control of  
276 apoptosis.

277 The labeling of the nucleus with DAPI also demonstrates the apoptosis activity of  
278 fragmented nuclei, a signal of apoptosis, similar to the cell nuclei observed by Murata et al.  
279 (2002) in cells induced to apoptosis by sorbitol. Other information corroborating cellular  
280 disorganization is the expression of the serine/threonine kinase protein mainly in the cell  
281 cytoplasm, as described for BoHV-1 and BoHV-5 (Brzozowska et al., 2010; Ladelfa et al.,  
282 2011).

283 To summarize, we showed that BoHV-5 US3 can be successful expressed in the  
284 baculovirus system. Additionally we compared the efficiency of the activity mechanisms of  
285 the three anti apoptotic genes and showed that they can be display different levels of activity.  
286 Finally, we demonstrate that AgMNPV. *iap-3* protein was as active in apoptosis control as the  
287 AcMNPV *p35* protein. In addition, the BoHV-5 US3 protein kinase showed poor blockage in  
288 apoptosis in cells infected with recombinant baculovirus. Since herpesvirus is an animal virus,

289 the anti-apoptotic effect of viral encoded genes could be restricted to the host tissues.  
290 Therefore, the lack of US3 anti-apoptotic function in insect cells could be due to the lack of  
291 the substrate for the kinase activity in insect cells.

### 292 **Conflict of interest**

293 The authors have declared that no conflict of interest exists.

294

### 295 **Acknowledgements**

296 This work was supported by Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal- FAPDF  
297 (Process number: 0193.001235/2016, FAPDF number: 1063/2016), and Coordenação de  
298 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior –CAPES.

299

### 300 **References**

301 Ardisson-Araújo, Daniel M. P., Melo, Fernando L., Clem, Rollie J., Wolff, José L.  
302 C., Ribeiro, Bergmann M, 2015. A betabaculovirus-encoded *gp64* homolog is a functional  
303 envelope fusion protein. *Journal of Virology* (Print), v. 90, p. JVI. 02491-15.

304

305 Azhar,M.,Somashekhar,R.,Kumar,P.P.B.S, 2013. A Quick and Efficient Method to Quantify  
306 Baculo Virus by Quantitative Real Time PCR. *Biosciences Biotechnology Research Asia* Vol.  
307 10(2), 659-663.

308

309 Brzozowska, A., Rychlowski, M., Lipinska, A. D. & Bienkowska- Szewczyk, K., 2010. Point  
310 mutations in BHV-1 Us3 gene abolish its ability to induce cytoskeletal changes in various cell  
311 types. *Vet Microbiol.* 143, 8–13.

312

313 Brzozowska, A., Lipińska, A.D., Derewońko. N., Lesiak, D., Rychłowski, M., Rąbalski,L.,  
314 Bieńkowska-Szewczyk,K., 2018. Inhibition of apoptosis in BHV-1-infected cells depends on  
315 Us3 serine/threonine kinase and its enzymatic activity. *Virology* 513: 136–145.  
316

317 Carpes, M.P., de Castro, M.E.B., Soares, E.F., Villela, A.G., Pinedo, F.J.R., Ribeiro,B.M.,  
318 2005. The inhibitor of apoptosis gene (iap-3) of *Anticarsa gemmatalis multicap-sid*  
319 nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) encodes a functional IAP. *Arch Virol.* 150:1549–62.  
320

321 Cartier, A., Komai, T. & Masucci, M. G., (2003a). The Us3 protein kinase of herpes simplex  
322 virus 1 blocks apoptosis and induces phosphorylation of the Bcl-2 family member Bad. *Exp*  
323 *Cell Res.* 291, 242–250.  
324

325 Cartier, A., Broberg, E., Komai, T., Henriksson, M. & Masucci, M. G., (2003b). The herpes  
326 simplex virus-1 Us3 protein kinase blocks CD8 T cell lysis by preventing the cleavage of Bid  
327 by granzyme B. *Cell Death Differ.* 10, 1320–1328.  
328

329 Chejanovsky, N., 2016. Using the Baculovirus/Insect Cell System to Study Apoptosis.  
330 *Methods in Molecular Biology* 1350: 477-89.  
331

332 Ciacci-Zanella, J., Stone, M., Henderson, G. and Jones, C., 1999. The latency-related gene of  
333 bovine herpesvirus 1 inhibits programmed cell death. *Journal of Virology* 73: 9734–9740.  
334

335 Clem, R.J, Miller L.K., 1994. Control of programmed cell death by the baculovirus genes p35  
336 and iap. *Mol Cell Biol.* 14:5212-5222.  
337

338 Daikoku, T., Yamashita, Y., Tsurumi, T., Maeno, K., Nishiyama, Y., 1993. Purification and  
339 biochemical characterization of the protein kinase encoded by the US3 gene of herpes simplex  
340 virus type 2. *Virology* 197 (2), 685–694.

341

342 Del Médico Zajac, M.P., Puntel, M., Zamorano, P., Sadir, A.M., Romera, S.A., 2006. BHV-1  
343 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle. *Research in Veterinary*  
344 *Science* 81, 327–334.

345

346 Deruelle, M. J., Geenen, K., Nauwynck, H. J. & Favoreel, H. W., 2007. A point mutation in  
347 the putative ATP binding site of the pseudorabiesvirus US3 protein kinase prevents Bad  
348 phosphorylation and cell survival following apoptosis induction. *Virus Res.* 128, 65–70.

349

350 Deruelle, M. J., De Corte, N., Englebienne, J., Nauwynck, H. J. & Favoreel, H. W., 2010.  
351 Pseudorabies virus US3-mediated inhibition of apoptosis does not affect infectious virus  
352 production. *J Gen Virol.* 91, 1127–1132.

353

354 Deruelle, M.J., Favoreel, H.W., 2011. Keep it in the subfamily: the conserved  
355 alphaherpesvirus US3 protein kinase. *J.Gen.Virol.* 92, 18-30.

356

357 Favoreel, H.W., Van Minnebruggen, G., Adriaensen, D., Nauwynck, H.J., 2005. Cytoskeletal  
358 rearrangements and cell extensions induced by the US3 kinase of an alphaherpesvirus are  
359 associated with enhanced spread. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 (25), 8990–8995.

360

361 French, E.L., 1962. A specific virus encephalitis in calves: isolation and characterization of  
362 the causal agent. *Australian Veterinary Journal* 38, 216–221.

363 Geenen, K., Favoreel, H. W., Olsen, L., Enquist, L. W. & Nauwynck, H. J., 2005. The  
364 pseudorabies virus US3 protein kinase possesses anti-apoptotic activity that protects cells  
365 from apoptosis during infection and after treatment with sorbitol or staurosporine. *Virology*  
366 331, 144–150.

367

368 Granados, R.R., Guoxun, L., Derksen, A.C.G., MecKenna, K.A., 1994. A New Insect Cell  
369 Line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4). Susceptible to *Trichoplusia ni* Single Enveloped  
370 Nuclear Polyhedrosis Virus. *Journal of Invertebrate Pathology* 64: 7.

371

372 Griffin, B.D., Verweij, M.C and Wiertz, E.J., 2010. Herpesvirus and immunity: the art of  
373 evasion. *Vet Microbiology*. 143:89-100.

374

375 Hopkins, R. & Esposito, D., 2009. A rapid method for titrating baculovirus stocks using  
376 the Sf-9 Easy Titer cell line. *Biotechniques* 47, 785–788.

377

378 Jones, C., 1998. Alphaherpesvirus latency: its role in disease and survival of the virus in the  
379 nature. *Adv. Virus Res.* 51:47-99.

380

381 Kato, A., Yamamoto, M., Ohno, T., Kodaira, H., Nishiyama, Y., Kawaguchi, Y., 2005.  
382 Identification of proteins phosphorylated directly by the Us3 protein kinase encoded by  
383 herpes simplex virus 1. *J Virol.* 79(14):9325–9331.

384

385 Kato, A., Kawaguchi, Y., 2018. Us3 Protein Kinase Encoded by HSV: The Precise Function  
386 and Mechanism on Viral Life Cycle. In: Kawaguchi, Y., Mori, Y., Kimura, H., *Human*  
387 *Herpesviruses. Advances in Experimental Medicine and Biology.* Vol 1045. Springer.

388 Ladelfa, M.F., Kotsias, Fiorella., Del Médico Zajac, M.P., Broeke, C.V., Favoreel, H.,  
389 Romera, S.A., Calamante, Gabriela., 2011. Effect of the US3 protein of bovine herpesvirus 5  
390 on the actin cytoskeleton and apoptosis. *Veterinary Microbiology* 153, 361-366.  
391

392 Munger, J. & Roizman, B., 2001. The US3 protein kinase of herpes simplex virus 1 mediates  
393 the posttranslational modification of BAD and prevents BAD-induced programmed cell death  
394 in the absence of other viral proteins. *Proc Natl Acad Sci.* 98, 10410–10415.  
395

396 Murata, T., Goshima, F., Yamauchi, Y., Koshizuka, T., Takakuwa, H.& Nishiyama, Y., 2002.  
397 Herpes simplex virus type 2 US3 blocks apoptosis induced by sorbitol treatment. *Microbes*  
398 *Infect.* 4, 707–712.  
399

400 O'Reilly, D., Miller, L. K. & Luckow, V. A., 1992. *Baculovirus Expression Vectors: a*  
401 *laboratory manual.* New York: Freeman and Company.  
402

403 Purves, F.C., Longnecker, R.M., Leader, D.P., Roizman, B.,1987. Herpes simplex virus 1  
404 protein kinase is encoded by open reading frame US3 which is not essential for vírus growth  
405 in cell culture. *J. Virol.* 61, 2896–2901.  
406

407 Salvador, S.C.; Lemos, R.A.A.; Riet-Correa, F.; Roehe, P.M.; Osório, A.L.A., 1998.  
408 Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino 5 no Mato Grosso do Sul e  
409 São Paulo. *Pesqui. Vet. Bras.* v.18, n.2, p.75-82.  
410

411 Schumacher, D., McKinney, C., Kaufer, B. B. & Osterrieder, N., 2008. Enzymatically  
412 inactive US3 protein kinase of Marek's disease virus (MDV) is capable of depolymerizing F-

413 actin but results in accumulation of virions in perinuclear invaginations and reduced virus  
414 growth. *Virology* 375, 37–47.

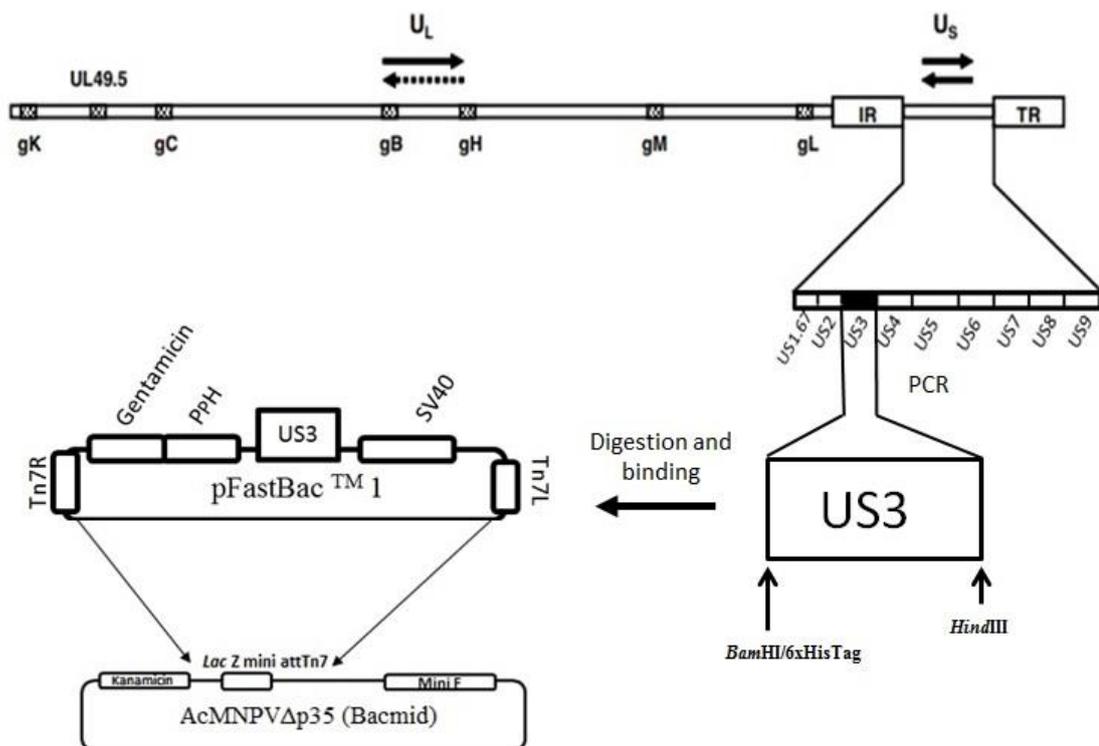
415

416 Vaughn, J. L., Goodwin, R.H., Tompkins, G.J., McCawley, P., 1997. The establishment of  
417 two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro*  
418 13(4), 213–217.

419

420 Yan, F., Deng, X., Yan, J., Wang, J., Yao, L., Iv, S., Qi, Y., Xu, H., 2010. Functional analysis  
421 of the inhibitor of apoptosis genes in *Antheraea pernyi* nucleopolyhedrovirus. *J. Microbiol.*  
422 48, 199–205.

423

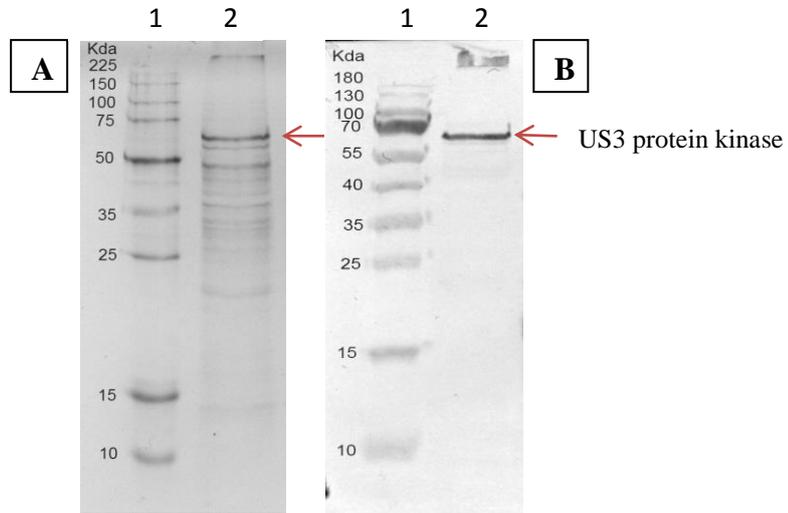


424

425 **Figure 1.** Construction of AcMNPVΔp35.US3 recombinant. The US3 gene is fused with  
426 6xHis Tag and cloned into pFastBac™1.US3. donor plasmid via the *Bam*HI/*Hind*III linker  
427 under the regulation of Polyedrin promoter. The transposition occurs between the mini-Tn7 to

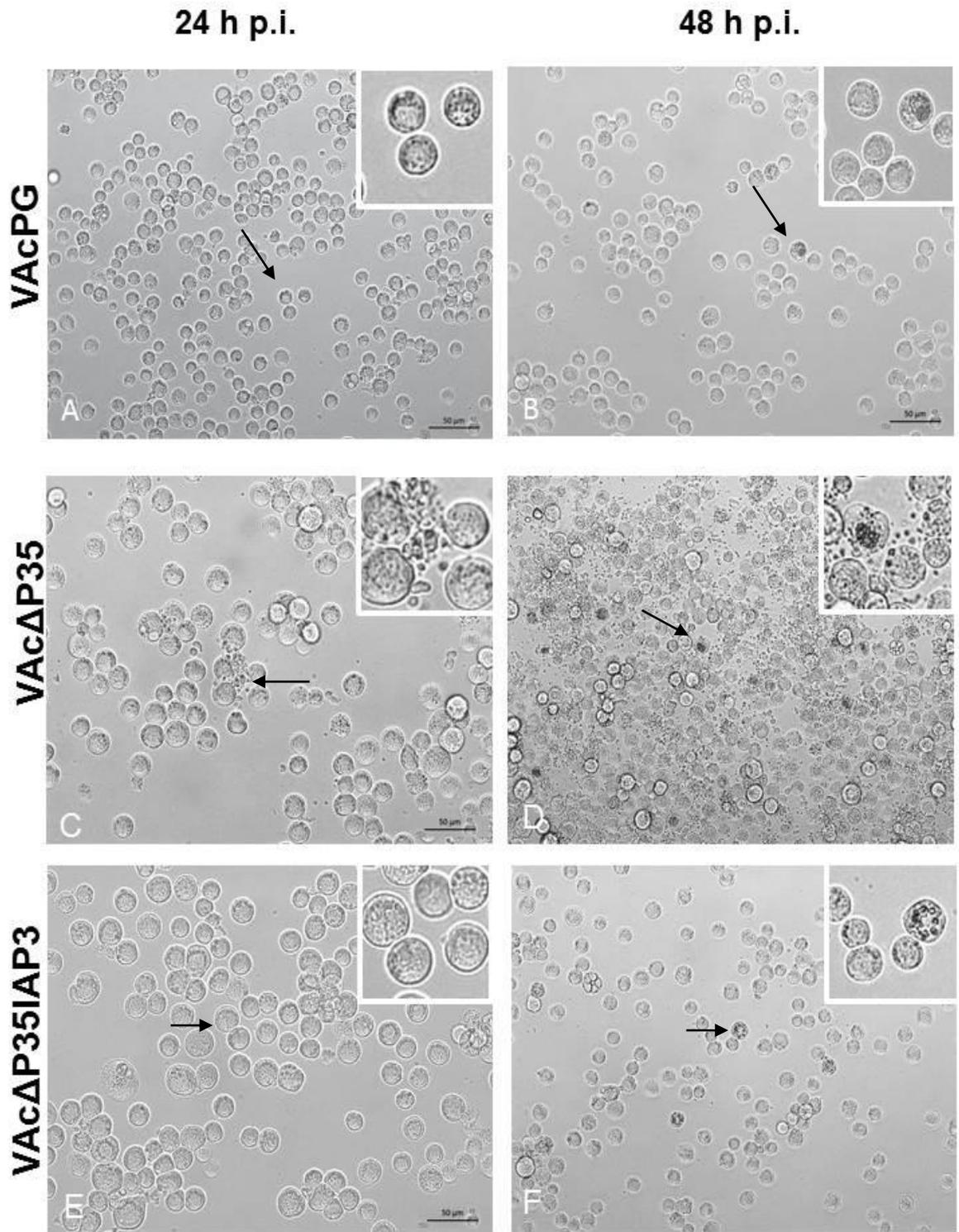
428 the mini attTn7 on the Bacmid to generate a recombinant Bacmid (For details see the manual  
429 Bac-to-Bac®).

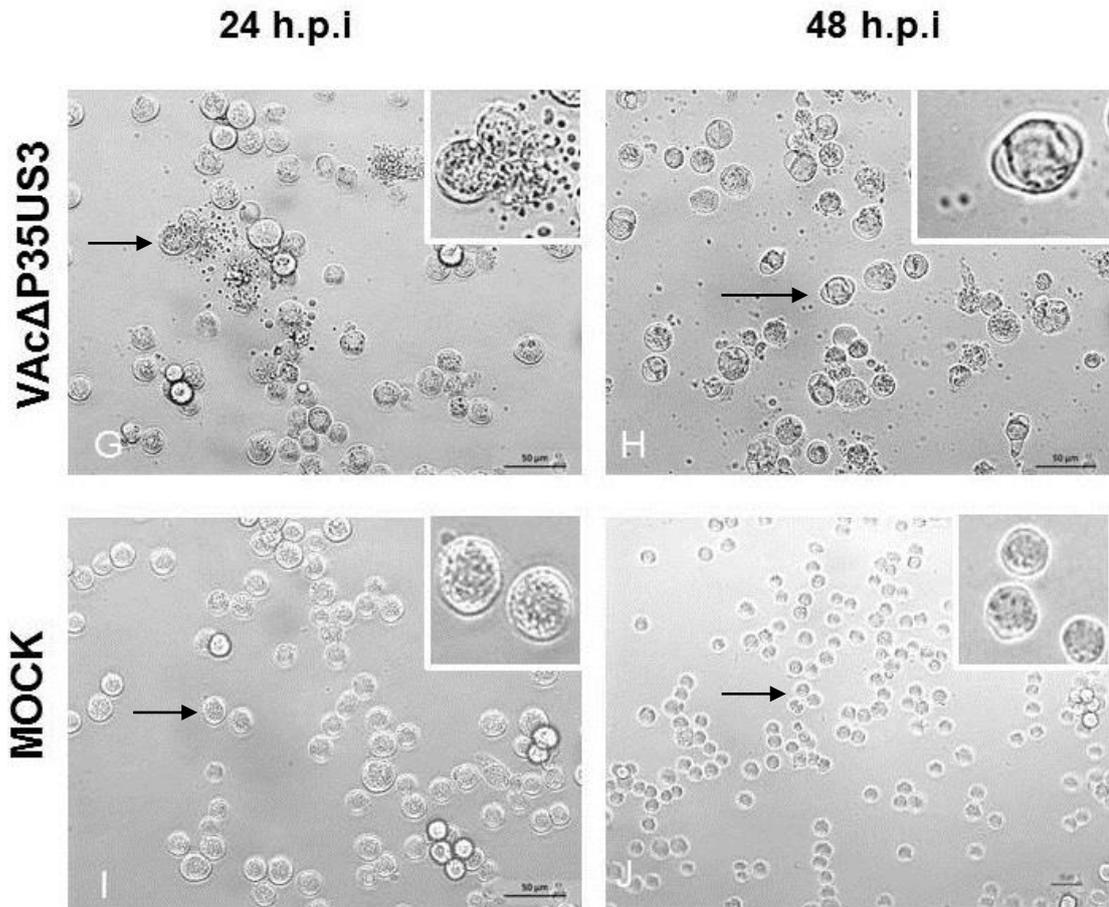
430



431

432 **Figure 2.** SDS-PAGE and Western Blot analysis of recombinant US3 protein kinase  
433 expressed in Sf-21 cells. A) SDS-PAGE 12% of cellular extracts infected with recombinant  
434 bacmid. 1: Broad Range Protein Molecular weight marker (Promega). 2: AcMNPV $\Delta$ p35.US3-  
435 infected insect cell extracts showing different proteins. An arrow points to a protein with  
436 around 62 kDa. B) Western Blot with 6xHis Tag antibody of cellular extracts infected with  
437 recombinant bacmid 1: Page Ruler<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder (ThermoFisher). 2.  
438 AcMNPV $\Delta$ p35.US3-infected insect cell extracts showing the detection of the US3 protein.

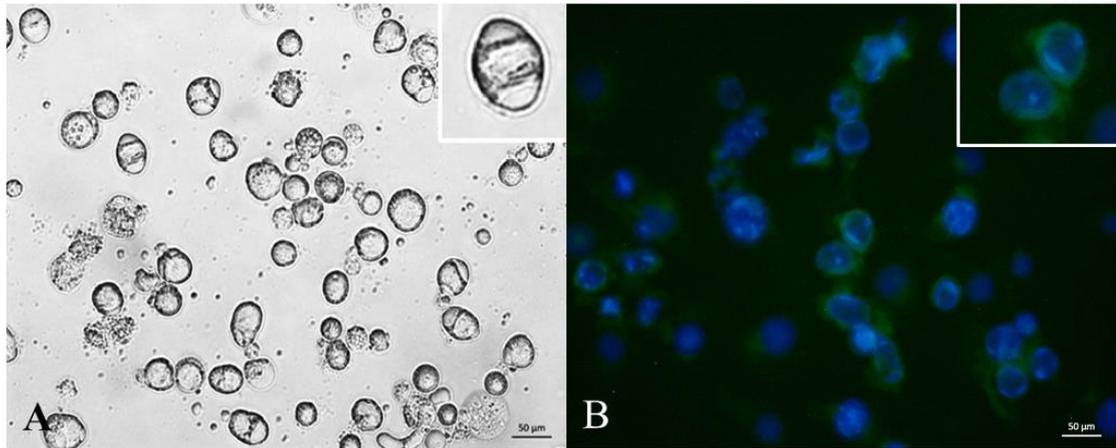




440

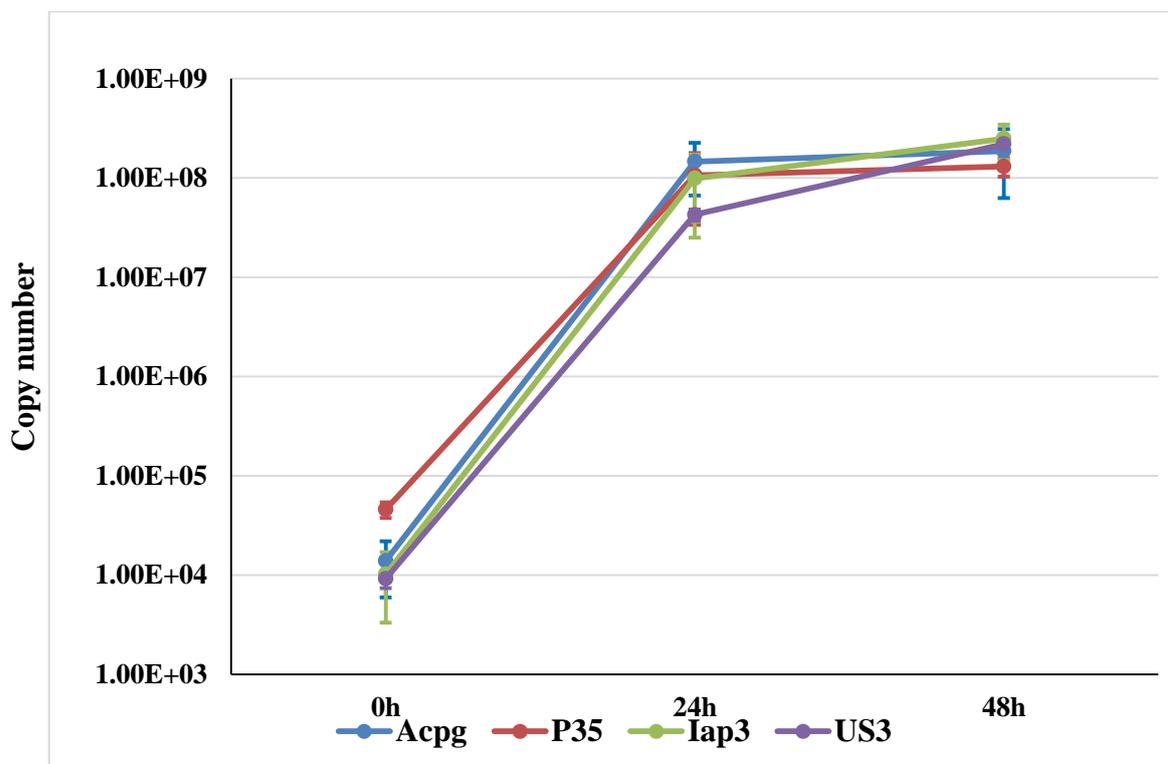
441 **Figure 3.** Morphology analysis with Sf-21 insect cells infected with different recombinant  
 442 AcMNPV baculovirus (MOI = 1) and mock-infected cells. Cells were visualized under light  
 443 microscope at 24 and 48 h p. i. (a-b) Cells infected with AcPg. Arrow: cells presenting  
 444 occlusion bodies (polyhedral) in their nuclei. (c-d) Cells infected with AcMNPVΔP35.  
 445 Arrow: Cells presenting surface blebbing and presence of apoptotic bodies. (e-f). Cells  
 446 infected with AcMNPVΔP35.IAP3. Arrow: cells presenting occlusion bodies (polyhedral) in  
 447 their nuclei. (g-h) Cells infected with AcMNPVΔP35.US3. Arrow: Cells presenting surface  
 448 blebbing and presence of apoptotic bodies. At 48 h.p.i: presence of cytoplasm disorganization  
 449 and vacuoles (i-j) Sf-21 mock infected cells.

450



451

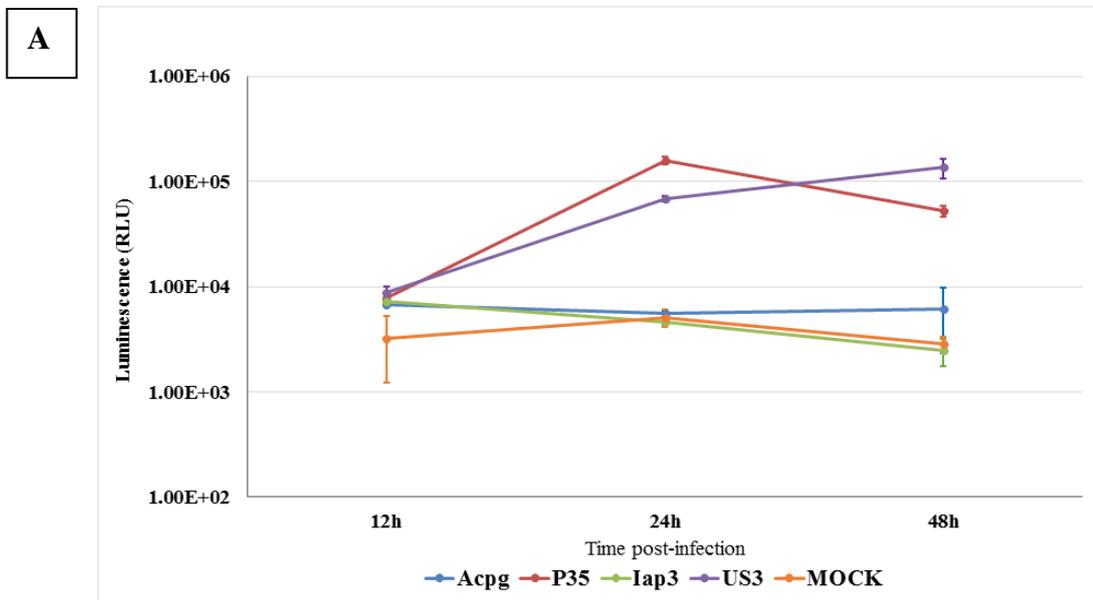
452 **Figure 4.** Morphology analysis with Sf-21 insect cells infected with AcΔp35MNPV.US3 after  
 453 48h.p.i. **A.** Cells visualized under light microscope. Presence of cytoplasm disorganization  
 454 and vacuoles. **B** Subcellular localization of US3 protein kinase by immunostaining. Green  
 455 fluorescence corresponds to secondary antibody Alexa 488<sup>TM</sup> against 6x His Tag. Blue  
 456 fluorescence corresponds to nuclear staining, performed with DAPI.



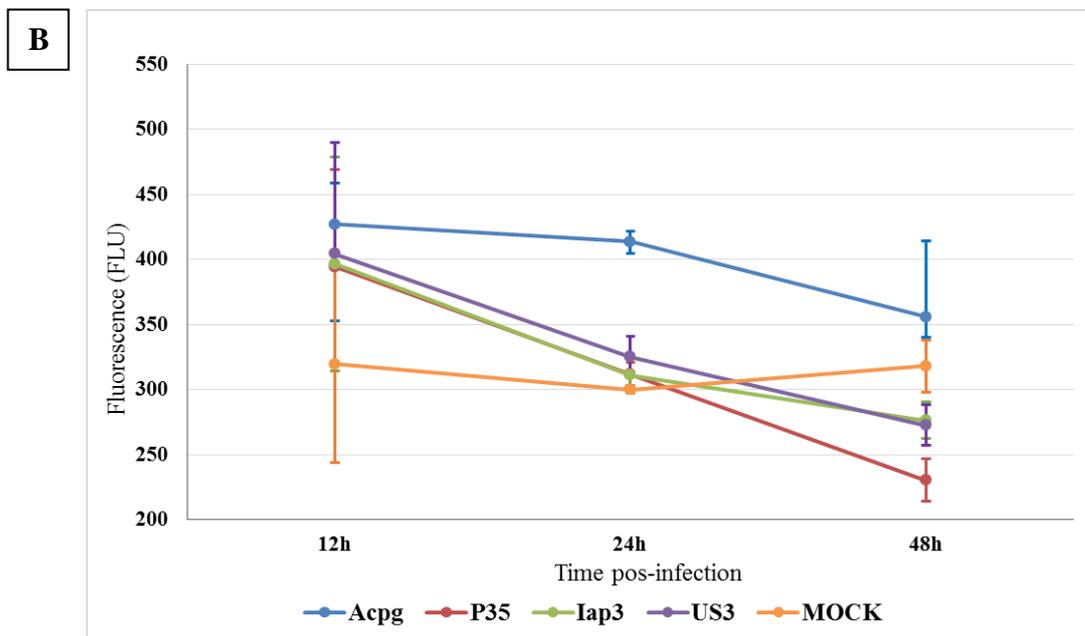
457

458 **Figure 5.** qPCR quantitation of intracellular viral DNA in Sf-21 insect cells infected  
 459 with different recombinant AcMNPV baculoviruses after 0, 24, 48 h. p. i. Data represent the

460 mean ( $\pm$  standard deviation, SD) of independent experiments, each performed in triplicate.  
 461 Error bars indicate SDs. Abbreviations: Acpg: AcPG virus; P35: AcMNPV $\Delta$ P35 virus; Iap3:  
 462 AcMNPV $\Delta$ P35.IAP3; US3: AcMNPV $\Delta$ P35.US3.



463



464

465 **Figure 6.A.** Caspase 3/7 activity assay in Sf-21 insect cell after 12, 24 and 48 post-infection  
 466 with the recombinant AcMNPV baculoviruses (MOI 1) and mock-infected cells. **B.** Cell  
 467 viability assay in Sf-21 insect cell after 12, 24 and 48 hours post-infection with recombinant

468 AcMNPV baculoviruses (MOI = 1) and mock-infected cells. Data represents the mean ( $\pm$ )  
 469 standard deviation, SD) of independent experiments, each performed in triplicate. Error bars  
 470 indicate SDs. RLU: relative light units. FLU: fluorescence light units. Abbreviations: Acpg:  
 471 AcPG virus; P35: AcMNPV $\Delta$ P35 virus; Iap3: AcMNPV $\Delta$ P35.IAP3; US3:  
 472 AcMNPV $\Delta$ P35.US3; MOCK: Mock infected cells.

**Table 1. Supplementary material**

Acronym	Description	Use	Reference
CRIB	Bovine diarrhea virus-resistant clone derived from Madin-Darby bovine kidney cells (MDBK)	BoHV-5 EVI 88/95 multiplication	Flores and Donis, 1995
Tn5B	<i>Trichoplusia ni</i>	Recombinant virus production	Granados et al., 1994.
Sf-21	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Recombinant virus production, assays of caspase, Western Blot, SDS-PAGE, qPCR, and immunostaining.	Vaughn et al., 1997
Sf9-ET	<i>Spodoptera frugiperda</i> 9 Easy Titration - cells with plasmid added the green fluorescent protein (GFP) gene	Viral titration assay	Hopkins & Esposito, 2009
AcPG	<i>Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus</i> (AcMNPV) with GFP	An anti-apoptotic virus control	Ardisson-Araújo et al., 2015
AcMNPV $\Delta$ p35	<i>Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus</i> (AcMNPV) p35 Knockout	An apoptotic virus control	Clem and Miller, 1994.
AcMNPV $\Delta$ p35.IAP3	AcMNPV with the p35 gene Knockout and replaced with the <i>Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus</i> IAP3 gene	A recombinant baculovirus anti-apoptotic control	unpublished data
AcMNPV $\Delta$ p35.US3	AcMNPV with the p35 gene Knockout and replaced with the alphaherpesvirus bovine 5 gene US3	Used to express US3 protein kinase and evaluate their anti-apoptotic potencial.	This study

473