

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**UTILIZAÇÃO DE PORFIRINAS NA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA  
DO HERPESVÍRUS BOVINO 1**

Amanda Vargas Teles

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Rocha Lino de Souza

GOIÂNIA

2016

## TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**       **Dissertação**       **Tese**

### 2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Amanda Vargas Teles		
E-mail:	amandavteles@gmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor			
Agência de fomento:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico	Sigla:	CNPq
País:	Brasil	UF:	GO
		CNPJ:	33.654.831/0001-36
Título:	Utilização de porfirinas na inativação fotodinâmica do Herpesvírus bovino 1		
Palavras-chave:	BoHV-1, fotoinativação, fotodegradação, fotossensibilizadores		
Título em outra língua:	Use of porphyrins in the photodynamic inactivation of Bovine herpesvirus 1		
Palavras-chave em outra língua:	BoHV-1, photoinactivation, photodegradation, photosensitizer		
Área de concentração:	Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	29/02/2016		
Programa de Pós-Graduação:	Ciência Animal		
Orientador (a):	Guilherme Rocha Lino de Souza		
E-mail:	grlino@gmail.com		
Co-orientador (a):*	Pablo José Gonçalves		
E-mail:	pablaojg@yahoo.com.br		

\*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

### 3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento  SIM       NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Data: 29 / 04 / 2016

Assinatura do (a) autor (a)

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

AMANDA VARGAS TELES

## **UTILIZAÇÃO DE PORFIRINAS NA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DO HERPESVÍRUS BOVINO 1**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal junto a Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

### **Área de Concentração:**

Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos (SANHTA)

### **Orientador:**

Prof. Dr. Guilherme Rocha Lino de Souza-EVZ/UFG

### **Comitê de Orientação:**

Prof. Dr. Pablo José Gonçalves - IF/UFG

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis- EVZ/UFG

GOIÂNIA  
2016

Ficha catalográfica elaborada automaticamente  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Vargas Teles, Amanda

Utilização de porfirinas na inativação fotodinâmica do Herpesvírus bovino  
1 [manuscrito] / Amanda Vargas Teles. - 2016.  
LV, 55 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Rocha Lino de Souza; co-orientador  
Dr. Pablo José Gonçalves; co-orientador Dr. Ana Paula Junqueira  
Kipnis.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de  
Veterinária e Zootecnia (EVZ) , Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal, Goiânia, 2016.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras.

1. BoHV-1. 2. fotoinativação. 3. fotodegradação. 4.  
fotossensibilizadores. I. Rocha Lino de Souza, Guilherme, orient. II.  
José Gonçalves, Pablo, co-orient. III. Título.

Amanda Vargas Teles

Dissertação defendida e aprovada em **29/02/2016**, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



---

Prof. Dr. Guilherme Rocha Lino de Souza  
(ORIENTADOR (A))



---

Prof. Dr. Ricardo Menegatti



---

Prof. Dr. Luiz Antônio Franco da Silva

Dedico aos meus eternos amores,  
meus pais Mauro Inocente Teles  
Iliciene de Oliveira Vargas Teles.

E também aos meus irmãos

Thaís Vargas Teles

Arthur Vargas Teles.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ter me proporcionado sabedoria e capacidade para ingressar no curso de Pós-graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás (UFG).

Ao meu orientador, Professor Dr. Guilherme Rocha Lino de Souza, por me auxiliar na realização deste trabalho e por caminhar ao meu lado durante todo este percurso. Minha eterna gratidão pela paciência e confiança depositada em mim.

Ao meu co-orientador, Professor Dr. Pablo José Gonçalves, o meu muito obrigada pelos ensinamentos de física e por todo auxílio sempre que precisei.

Aos professores Luiz Antônio Franco da Silva e Ricardo Menegatti pelas colaborações na correção deste trabalho visando uma melhora integral desta dissertação.

A minha grande amiga do mestrado, Taise Maria dos Anjos Oliveira, pela ajuda e entusiasmo mesmo quando tudo parecia perdido.

A colega de pós-graduação Greyciele Rodrigues de Almeida, pela disponibilidade em ter me ensinado grande parte dos procedimentos laboratoriais que sei hoje. Meus sinceros agradecimentos por ter auxiliado a minha evolução profissional.

Ao colega Fábio de Castro Bezerra do Instituto de Física-UFG, pelo apoio nos procedimentos físicos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela concessão da bolsa de estudos e pelo financiamento do projeto e a toda equipe do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da EVZ/UFG, que sempre estiveram disponíveis e fazem o melhor que podem pelo nosso programa.

A todos os familiares e amigos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao meu pai, Mauro Inocente Teles pelo estímulo e por ser meu exemplo de pessoa e profissional. A minha mãe, Iliciene de Oliveira Vargas Teles por todo o cuidado, amor, paciência.

Aos meus irmãos, por dividirem comigo a vida e por me apoiarem sempre.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 –CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
<b>2.1. Herpesvírus Bovino</b> .....	2
2.1.1. Nomeclatura e Classificação .....	2
2.1.2. Morfologia e Estrutura .....	2
2.1.3. Patogenia e Replicação viral .....	3
2.1.4. Sinais clínicos.....	5
2.1.5. Latência .....	7
2.1.6. Métodos diagnósticos .....	8
2.1.7. Epidemiologia.....	11
2.1.8. Epidemiologia.....	12
<b>2.2. Inativação Fotodinâmica</b> .....	13
2.2.1. Processo fotoquímico da inativação fotodinâmica .....	13
2.2.2. Fontes de luz para a inativação fotodinâmica.....	14
2.2.3. Fotossensibilizadores.....	16
2.2.4. Porfirinas .....	17
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	20
<b>CAPÍTULO 2 - UTILIZAÇÃO DE PORFIRINAS NA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DO HERPESVÍRUS BOVINO 1 E NA FOTODEGRADAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL</b> .....	28
Introdução.....	29
Material e Métodos.....	30
Cepa viral e Titulação.....	30
Fotossensibilizadores.....	30
Inativação fotodinâmica .....	31
Avaliação do DNA após a fotoinativação .....	32
Análise estatística .....	32
Resultados.....	32
Discussão .....	36
Conclusão .....	40
Agradecimentos.....	40

Referências .....40

**CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS .....44**

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- FIGURA 1 – Desenho esquemático de um Herpesvírus com suas estruturas especificadas. ....3
- FIGURA 2 – Esquema do transporte axonal do BoHV. Após a infecção primária (1), o vírus invade os terminais sensoriais dos neurônios (2), através do qual os nucleocapsídeos passam por transporte axonal retrógrado (3) até o corpo neural dentro do TG (4), onde estabelece sua latência e expressa RL e ORF-E (5). Durante o estresse animal, o vírus é ativado e transportado de maneira anterógrado (6) até o sítio inicial da infecção, produzindo assim grande quantidade de partículas virais. ....8
- FIGURA 3 – Propagação de luz através dos tecidos. A profundidade que a luz irá penetrar no tecido está relacionada com o comprimento de onda. Com isso, a luz azul penetra menos eficientemente através do tecido, enquanto as radiações vermelho e infravermelho penetram mais profundamente.....15
- FIGURA 4 - Etrutura química da porfirina .....17

### CAPÍTULO 2

- FIGURA 1 – Estrutura química da meso-porfirina e meso-porfirina metalada com zinco em seu anel central ..... 31
- FIGURA 2 – Avaliação do título viral após a fotoinativação do BoHV-1 utilizando as duas porfirinas aniônicas durante 120 minutos de irradiação e seus respectivos controles (• TPPS4, ° ZnTPPS4, ▪ L-PS-, ▼ L-PS+TPPS4, ◇ L-PS+ZnTPPS4)..... 33

- FIGURA 3 – Avaliação do título viral após a fotoinativação do BoHV-1 utilizando as duas porfirinas catiônicas durante 120 minutos de irradiação e seus respectivos controles (◦ TMPyP, ▼ ZnTMPyP, ▪ L-PS-, ● L-PS+TMPyP, ◇ L-PS+ZnTMPyP )..... 34
- FIGURA 4 – Avaliação do título viral após a fotoinativação do BoHV-1 utilizando as quatro porfirinas durante 120 minutos de irradiação e seus respectivos controles (● TPPS<sub>4</sub>, ◦ ZnTPPS<sub>4</sub>, ▼ TMPyP, ◇ ZnTMPyP ) ..... 35
- FIGURA 5 - Efeito da fotodegradação do DNA plasmidial avaliado em gel de agarose. (A) DNA incubado com TPPS. (B) DNA incubado com ZnTPPS. (C) DNA incubado com TMPP. (D) DNA incubado com ZnTMPP. Tempo de irradiação da direita para a esquerda (1 ao 7), 0, 30, 60, 90, 120,150, 180 minutos, respectivamente..... 36

## RESUMO

O herpesvírus bovino 1 (BoHV - 1) é um vírus da família *Herpesviridae* e da subfamília *Alphaherpesvirinae*, conhecido por causar diversas doenças em bovinos no mundo todo, incluindo a rinotraqueíte, vaginite, balanopostite, aborto, conjuntivite e enterite. O BoHV - 1 é responsável por grande perda econômica, tanto para produtores de leite quanto de carne, devido a uma diminuição na produção de leite, diminuição na taxa de ganho de peso animal, uma maior susceptibilidade às infecções secundárias e as ocorrências de abortos. Visando novas alternativas para o tratamento e eliminação deste patógeno do rebanho, a fotoinativação se torna uma alternativa viável devido ao fato deste tratamento ter se mostrado eficiente contra vários microrganismos de interesse animal e humano. A inativação fotodinâmica (PDI) é baseada na combinação de três componentes: fotossensibilizador (PS), oxigênio e luz. Ao ser irradiado por uma fonte de luz no comprimento de onda específico, o fotossensibilizador sofre uma série de processos fotofísicos que culminarão na geração de espécies reativas do oxigênio (ROS) que em grandes quantidades são tóxicos a patógenos. Visando uma melhor eficiência da fotoinativação, é necessário conhecer as características de cada fotossensibilizador, analisando a estrutura molecular, rendimento quântico, tempo de vida, toxicidade, estabilidade e absorção em comprimentos de onda específicos. O tempo de irradiação tem se mostrado muito importante, porque cada PS reage de uma maneira diferente em determinado período. Para avaliar a interferência das cargas elétricas presentes nos PS, a inserção de zinco no anel no anel central da molécula e o tempo de irradiação na inativação fotodinâmica, foram utilizadas alíquotas do BoHV-1 com título viral inicial de  $10^{5,75}$ , incubadas durante uma hora com quatro diferentes porfirinas como fotossensibilizadores: TPPS<sub>4</sub>, ZnTPPS<sub>4</sub>, TMP<sub>γ</sub>P e ZnTMP<sub>γ</sub>P. Posteriormente, foram irradiadas durante duas horas, sendo retiradas amostras a cada 15 minutos. Como controle foram utilizados vírus sem qualquer tipo de tratamento, vírus irradiado sem a presença de PS e vírus com PS sem irradiar. Após a irradiação a amostra foi adicionada em culturas de células permissíveis ao vírus, onde foi analisada a presença de efeito citopático (CPE) e os resultados foram expressos em títulos virais. Apesar de todos os tratamentos possuírem diferenças significativas, todos os PSs utilizados no estudo se mostraram eficazes no tratamento do BoHV-1. A ZnTMP<sub>γ</sub>P foi a mais eficiente, inativando totalmente o vírus com 30 minutos de irradiação, e a TPPS<sub>4</sub> apresentou o pior resultado não conseguindo inativar o vírus após o período de irradiação, porém reduziu consideravelmente a carga viral do BoHV-1. Analisamos também a fotodegradação de um DNA plasmidial utilizando os mesmos fotossensibilizadores. Novamente, a ZnTMP<sub>γ</sub>P apresentou melhores resultados.

**Palavras-chave:** BoHV-1, fotoinativação, fotodegradação, fotossensibilizadores

## ABSTRACT

Bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) is a virus of the family *Herpesviridae* and the subfamily *Alphaherpesvirinae*, known to cause several diseases worldwide in cattle, including rhinotracheitis, vaginitis, balanoposthitis, abortion, conjunctivitis, and enteritis. O BoHV-1 is a source of economic loss for both dairy and beef producer due to a decrease in dairy production, decrease in animal weight gain, a higher susceptibility to secondary infections, and the occurrences of abortions. Aiming at new alternatives for the treatment and disposal of these cattle pathogen, the photoinactivation becomes a viable alternative because this treatment has shown to be effective against animal and human microorganisms. The technique is based on the synergistic combination of a photosensitizer (PS), oxygen, and light. When irradiated by a light source, the photosensitizer undergoes a series of photophysical processes, which culminate in the generation of reactive oxygen species (ROS), which in large amounts are toxic to pathogens. Aiming at a better efficiency of photoinactivation is necessary to know the characteristics of each photosensitizer, analyzing the molecular structure, quantum yield, lifetime, toxicity, stability, and absorption at specific wavelengths. The irradiation time has shown to be very important because each PS reacts differently at a given time. To evaluate the effect of the electrical charges present on PS, zinc insert ring in the central ring of the molecule and the irradiation time in the photodynamic inactivation, BoHV-1 aliquots were used with initial viral titer from  $10^{5.75}$  incubated for one hour with four different photosensitizers: TPPS<sub>4</sub>, ZnTPPS<sub>4</sub>, TMPyP, and ZnTMPyP. Subsequently, they were irradiated for two hours and sampled every 15 minutes. As control, we used virus without any treatment, virus irradiated in the absence of PS, and virus with PS without radiating. After irradiation, the sample was added to cultures of cells permissive to the virus, which was analyzed for the presence of cytopathic effect (CPE), and the results were expressed as viral titers. Although all treatments had significant differences, all PSs used in the study were effective in the treatment of BoHV-1. The ZnTMPyP was the most efficient, fully inactivating the virus with 30 minutes of irradiation, and the TPPS<sub>4</sub> showed the worst result unable to inactivate the virus after the period of irradiation, but considerably reduced the viral load of BoHV -1. We also analyzed the photodegradation of a plasmid DNA using the same photosensitizers. Again, ZnTMPyP showed better results.

**Keywords:** BoHV-1, photoinactivation, photodegradation, photosensitizer.

## **CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS**

### **1. INTRODUÇÃO**

A bovinocultura é uma das mais importantes atividades econômicas do Estado de Goiás, assim como do Brasil, ocupando cerca de 20% da área do território nacional, sendo aproximadamente 174 milhões de hectares ocupados por pastagens, com 211 milhões de bovinos criados a pasto. A região Centro-Oeste é responsável por 33,6% do rebanho bovino nacional com cerca de 71 milhões de cabeças, das quais aproximadamente 21 milhões são do Estado de Goiás, considerado o terceiro rebanho bovino do país<sup>1,2</sup>.

Nos Estados Unidos, os prejuízos econômicos associados ao complexo de doenças respiratórias dos bovinos, dos quais o Herpesvirus bovino 1 (BoHV- 1) é considerado um dos principais agentes etiológicos, são de aproximadamente 640 milhões de dólares por ano de acordo com um relatório publicado em 2000<sup>3</sup>. Um estudo realizado em 2006, comprovou uma perda econômica de 13,90 dólares por animal em confinamento devido a menores ganhos de peso e custos com tratamento para doenças respiratórias<sup>4</sup>.

No plantel, infecções por BoHV- 1 causam também doenças reprodutivas, queda da fertilidade e aborto, gerando ainda mais custos aos produtores, os quais são difíceis de calcular devido à falta de dados estabelecidos<sup>5-7</sup>. Além das perdas diretas ocasionadas nos rebanhos infectados com BoHV-1, esse patógeno está associado às restrições ao comércio internacional de animais vivos ou seus subprodutos - sêmen, embriões e produtos de biotecnologia - previstos no Código Internacional de Saúde Animal<sup>8-11</sup>.

A infecção causada pelo BoHV-1 não possui tratamento e a vacinação é uma das estratégias com melhor custo/benefício para a prevenção e controle dos sinais clínicos e transmissão desses vírus<sup>12</sup>. Sendo que, vacinas clássicas complicam o diagnóstico sorológico e determinação da verdadeira prevalência da infecção<sup>13</sup>.

Com isso, faz-se necessário mais estudos com intuito de descobrir técnicas capazes de tratar infecções com o BoHV-1, impedindo a sua permanência e replicação no rebanho, diminuindo os problemas e gastos causados pelo vírus.

A inativação fotodinâmica (PDI) necessita da presença de três componentes: fossensibilizador (PS), radiação eletromagnética na faixa do visível de comprimento de onda apropriado e oxigênio molecular. Este tratamento vem sendo utilizado em vários microrganismos e células cancerígenas, e apresenta resultados positivos, se tornando uma possibilidade no tratamento de infecções pelo BoHV-1<sup>14</sup>.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Herpesvírus Bovino

#### 2.1.1. Nomeclatura e Classificação

O Herpesvírus pertence à família *Herpesviridae*, que possui quase duas centenas de vírus isolados a partir de diversos hospedeiros, como moluscos, peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos. Tais vírus são subdivididos em três subfamílias, *Alfa-*, *Beta-* e *Gammaherpesvirinae*<sup>15</sup>. O Herpesvírus Bovino (BoHV) pertence à sub-família *Alphaherpesvirinae* e apresenta dois gêneros: *Simplexvirus* e *Varicellovirus*. Quatro espécies são capazes de infectar bovinos: BoHV-1, BoHV-2, BoHV-4 e BoHV-5<sup>16</sup>.

O Herpesvírus bovino 1 (BoHV- 1) é um vírus de DNA envelopado e pertence ao gênero *Varicellovirus*, e pode ser diferenciado em subtipos 1.1, 1.2a e 1.2b. O subtipo 1.1 é o agente causador da Rinotraqueíte Infeciosa Bovina (IBR) e é frequentemente encontrado no trato respiratório dos animais e em fetos que foram abortados. O subtipo 1.2a está associado com uma ampla variedade de manifestações clínicas tanto nas vias respiratórias, quanto genitais, como a IBR, vulvovaginite pustular infecciosas (IPV), balanopostite (IPB) e abortos, já o subtipo 1.2b não causa aborto<sup>17-21</sup>.

#### 2.1.2. Morfologia e Estrutura

O Herpesvírus pode variar entre 120 a 300 nm de diâmetro e é constituído por um envelope glicoprotéico, tegumento que recobre o capsídeo, capsídeo icosaédrico e genoma<sup>22</sup>. O genoma é constituído por um DNA linear de fita dupla com cerca de 135,3 kb que codifica aproximadamente 70 proteínas<sup>17</sup>.

O envelope viral é composto por dez glicoproteínas (GPs), denominadas gB, gC, gD, gE, gI, gH, gL, gG, gK e gM, que se diferenciam em suas propriedades antigênicas, estruturas moleculares e função biológica nos processos de interação com a célula hospedeira e de replicação. As glicoproteínas gB, gC e gD são encontradas em maior quantidade<sup>22</sup>.

A gB é a mais imunogênica e, durante a replicação viral, está envolvida na adsorção, penetração e fusão celular, assim como a gD. A gC é muito importante na indução de anticorpos neutralizantes e possui a função de adsorção do vírus à célula hospedeira<sup>23-25</sup>.

O espaço entre o envelope e a superfície do capsídeo apresenta uma grande variedade de proteínas virais, que ficam dispostas em uma camada externa e interna. Tais proteínas

possuem função de transporte durante a entrada e saída do capsídeo, auxiliando a regulação da transcrição, tradução e apoptose<sup>26</sup>.

Os capsídeos são formados por várias subunidades, chamadas de capsômeros e são compostos por cinco proteínas altamente conservadas (pUL19, pUL18, pUL38, pUL35 e pUL6). O capsídeo é formado por duas camadas: uma camada exterior e outra intermediária, com canais de comunicação entre o núcleo e a parte externa do capsídeo<sup>27, 28</sup>.

O núcleo (ou core) de um vírion maduro contém o genoma viral conjugado com algumas proteínas codificadas pelo vírus, no caso do BoHV - 1 estas proteínas não são específicas.

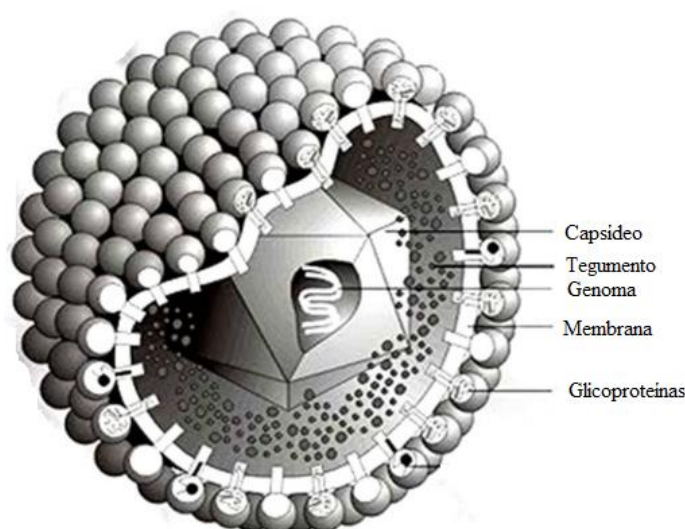


FIGURA 1 – Desenho esquemático de um Herpesvírus com suas estruturas especificadas.

Fonte: Modificado de Franco et al<sup>29</sup>.

### 2.1.3. Patogenia e Replicação viral

A porta de entrada do vírus é a mucosa do trato respiratório superior ou trato genital e a infecção pode ser transmitida também pela inoculação no epitélio conjuntival. Vale ressaltar, que para ocorrer a infecção genital é necessário o contato direto durante a cópula ou contato com sêmen contaminado com o vírus através de inseminação artificial<sup>30</sup>.

Após o contato com o vírus, ocorre a replicação viral inicial em células epiteliais da mucosa nasal ou genital, podendo permanecer nas secreções nasais e linfonodos do trato respiratório por mais de nove dias<sup>31</sup>. Uma vez que houve a penetração do vírus nas células epiteliais alvo, o BoHV-1 estabelece o ciclo de replicação lítica, que corresponde à expressão sequencial de genes virais, acarretando a produção de novos vírus e morte celular<sup>32</sup>.

Durante a replicação inicial, o BoHV-1 pode entrar nos axônios das células nervosas locais. Então, por transporte intraaxonal, os vírus atingem os corpos de neurônios nos gânglios regionais, onde a latência pode ser estabelecida<sup>33</sup>.

Dois modos diferentes permitem a disseminação da nova geração de BoHV-1 na mucosa infectada. Primeiro, é através das partículas presentes nos envelopes virais, são capazes de interagir com os receptores de células susceptíveis. Na segunda maneira, as partículas virais podem se propagar diretamente de uma célula infectada para as células vizinhas não infectadas<sup>22</sup>.

A transmissão no corpo se dá através da circulação sanguínea, nervos e tecidos por meio da transmissão do vírus entre células normais e infectadas. Com a viremia, locais secundários serão infectados, como o trato digestivo, úbere, feto e ovários. A partir do local da infecção, nervos periféricos serão alcançados por transporte axonal retrógrado, isto é, gânglio trigeminal em caso de doenças respiratórias e gânglio sacral após a infecção genital<sup>34</sup>.

A replicação viral do BoHV-1 possui as seguintes fases: adsorção, penetração, transporte do nucleocapsídeo, expressão gênica e replicação do genoma, morfogênese e liberação da progênie infecciosa<sup>35</sup>.

A entrada de vírus nas células é um processo de passos múltiplos envolvendo várias glicoproteínas e pelo menos dois receptores celulares<sup>34</sup>. A glicoproteína gC inicia estes passos através da ligação aos proteoglicanos na superfície celular, processo conhecido como adsorção. Posteriormente, ocorre a ligação estável da gD aos receptores específicos celulares, a qual é necessária para o início da entrada do vírus. Após esta interação de alta afinidade entre gD e receptores celulares, a penetração do vírus ocorre por meio da fusão do envelope do vírion com a membrana plasmática. Este processo crucial requer pelo menos o envolvimento de quatro glicoproteínas: gB, gD e o heterodímero formado pela gH e gL<sup>36-40</sup>.

Uma vez que o vírus entrou no citosol da célula, as partículas virais do BoHV-1 serão transportadas pelo citoesqueleto até o centro organizador de microtúbulos, que se localiza perto do núcleo celular, a fim de permitir a introdução de DNA viral no núcleo da célula<sup>41</sup>.

A expressão gênica do vírus é regulada temporariamente durante a infecção devido à expressão de genes virais que são divididos em três grupos: genes alfa ou de transcrição imediata, beta ou iniciais e gama ou tardios, os quais são responsáveis por codificarem proteínas envolvidas na regulação do ciclo viral, replicação do DNA do vírus e morfogênese de vírions novos, respectivamente<sup>42</sup>.

O processo de montagem dos vírions de Herpesvírus é complexo e prossegue ao longo de uma via morfogenética ordenada. As proteínas pré-sintetizadas no citoplasma são

transportadas para o núcleo, onde ocorre a finalização da montagem com a inserção do genoma viral. O nucleocapsídeo recém-formado pode deixar o núcleo através de duas rotas alternativas, na primeira, o egresso ocorre através da membrana interna da carioteca, adquirindo assim, o envelope viral primário; na segunda, a saída envolve a dilatação dos poros nucleares resultando em acesso direto do capsídeo ao citoplasma e adquire o envelope primário por brotamento a qualquer membrana celular<sup>43, 44</sup>.

No citoplasma, o capsídeo adquire o restante das proteínas que formam o tegumento e o envelope final, vírions se acumulam dentro de vesículas utilizando-se do complexo de Golgi para serem liberados por exocitose no meio extracelular<sup>29</sup>.

#### 2.1.4. Sinais clínicos

A gravidade da doença causada pelo Herpesvirus Bovino 1 é influenciada por vários fatores, tais como a virulência da estirpe, fatores de resistência do hospedeiro, especialmente a idade e infecção bacteriana concomitantemente. Geralmente, o BoHV - 1 infecta bovinos com idade superior a seis meses devido ao fato dos animais mais jovens apresentarem maiores quantidades de anticorpos colostrais, o que reduz a gravidade da infecção<sup>45, 46</sup>.

Os sinais clínicos associados à infecção incluem corrimento nasal, conjuntivite, febre, inapetência, queda na produção de leite, aborto e, às vezes, morte, embora a infecção sub-clínica também seja possível<sup>47, 48</sup>. O vírus é eliminado através das secreções dos olhos, nariz e órgãos reprodutivos. Além disso, a infecção pode ser também de forma indireta através de material contaminado e aerossóis<sup>47, 49</sup>.

##### a) Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR)

A forma respiratória da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) pode ocorrer de forma subclínica, suave ou severa. A morbidade se aproxima de 100%, enquanto a mortalidade pode chegar a 10%. Nos casos mais leves, os sinais clínicos podem se limitar a uma descarga ocular e nasal serosa. A IBR clássica é caracterizada por febre (40,5-42,0°C), inapetência, aumento da frequência respiratória, dispnéia, tosse severa e persistente, depressão e queda na produção de leite em vacas leiteiras. A secreção nasal bilateral é inicialmente serosa e passa a ser mucopurulenta<sup>33, 50</sup>.

Além disso, a mucosa nasal se torna hiperêmica e as lesões progridem de necrose pustular para grandes áreas hemorrágicas e ulceradas. Mau hálito, respiração pela boca,

salivação e tosse brônquica profunda são comuns. Os animais podem apresentar também sinais de bronquite e pneumonia<sup>51</sup>.

Na forma conjuntival da IBR, os animais podem apresentar conjuntivite unilateral ou bilateral que está associada com lacrimejamento abundante e fotofobia. O sintoma mais característico é a epífora e os pelos abaixo dos olhos tornam-se sujos, além disso, pode ocorrer a eversão das pálpebras. Em casos simples, os sintomas regredem dentro de cinco a 10 dias<sup>52</sup>.

#### b) Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IPV) e Balanopostite Pustular Infecciosa (IPB)

A Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IPV) aguda acomete fêmeas e geralmente se desenvolve entre um e três dias após o acasalamento, os principais sinais notados no início são micção frequente e cauda elevada. Os animais afetados desenvolvem também febre, depressão, anorexia e procuram evitar o contato da cauda com a vulva, a qual geralmente fica edemaciada e hiperêmica com pequenas pústulas (um a dois mm de diâmetro)<sup>52</sup>. As pústulas geralmente formam placas fibrinosas amareladas que, gradualmente, se desprendem e formam úlceras. As lesões cicatrizam-se entre 10 e 14 dias após o início da doença, mas em alguns animais o corrimento vaginal mucopurulento persiste durante várias semanas<sup>52</sup>.

Abortos geralmente ocorrem entre o quarto e sétimo mês de gestação após a infecção natural ou vacinação. Além disso, as vacas podem apresentar endometrite, baixa taxa de concepção e cio por um período curto após inseminação artificial com sêmen infectado com BoHV-1<sup>53, 54</sup>.

A Balanopostite Pustular Infecciosa (IPB) acomete machos, desenvolve após um período de incubação entre um e três dias e ocasiona lesões semelhantes às da IPV na mucosa peniana e prepucial. Se o acasalamento não é interrompido, forma-se o tecido de cicatrização e as sequelas desta condição incluem aderências extensas, constrictões circulares e distorções penianas. A cura ocorre em casos não complicados dentro de 10 a 14 dias, mas alguns animais podem perder o libido, ter ereção e ejaculação dolorosa e neste caso, necessitam de várias semanas para retomar o acasalamento regular<sup>31, 51</sup>.

### 2.1.5. Latência

A latência é definida como a persistência do vírus no organismo de forma silênciosa, não detectáveis pelos procedimentos virológicos normais<sup>31</sup>. Após a infecção primária com o BoHV-1, o animal torna-se um portador latente, já que o vírus estabelece latência ao longo da vida em neurônios sensoriais do sistema nervoso periférico<sup>55</sup>.

Apesar de uma vigorosa resposta imune durante a infecção aguda, o Herpesvírus bovino consegue estabelecer latência em neurônios sensoriais ganglionares, principalmente no gânglio trigêmeo (TG), no caso de infecção respiratória, ou na raiz dorsal do gânglio sacral quando a infecção for reprodutiva, após replicação inicial no epitélio da mucosa. O vírus pode se reativar e se espalhar para outros animais susceptíveis, isto ocorre após estresse natural ou induzido por corticosteróides<sup>56-58</sup>.

Este mecanismo justifica os períodos de reexcreção do vírus, que podem estar associados ou não com sintomatologia clínica, de forma que os animais uma vez infectados serão portadores do vírus e potenciais disseminadores da doença no rebanho.

As etapas do ciclo de latência-reativação podem ser divididas em três etapas principais: estabelecimento, manutenção e reativação do BoHV. A primeira etapa engloba a entrada do genoma viral em um neurônio sensorial e infecção aguda. Durante este período a expressão do gene viral é extinta, exceto a transcrição associada à latência (LAT)<sup>59</sup>.

A segunda fase, manutenção da latência, perdura a vida do hospedeiro. Neste período, o Herpesvírus infeccioso não é detectado através de procedimentos padrão de isolamento de vírus e a expressão abundante de genes virais necessárias para a infecção produtiva não ocorre<sup>59</sup>.

A perpetuação e transmissão do vírus na natureza ocorrem principalmente devido à reativação de latência, que é iniciada por um estímulo externo que leva à expressão gênica do vírus. O estresse, transporte de animais, tratamento com glicocorticoides e parto são alguns dos fatores que contribuem com esta reativação<sup>15, 59</sup>.

Durante este processo, novas partículas virais são sintetizadas no sítio de latência e reexcretadas. Tal replicação viral pode causar recorrência da doença, com manifestação dos sinais clínicos, muitas vezes mais graves que na infecção aguda<sup>15</sup>.

No decorrer da reativação, o vírus é transportado a partir dos gânglios periféricos, retornando assim, ao foco primário da infecção. Neste local ocorre replicação e eliminação viral. Com isso, o vírus é excretado e pode infectar outros animais<sup>60</sup>.

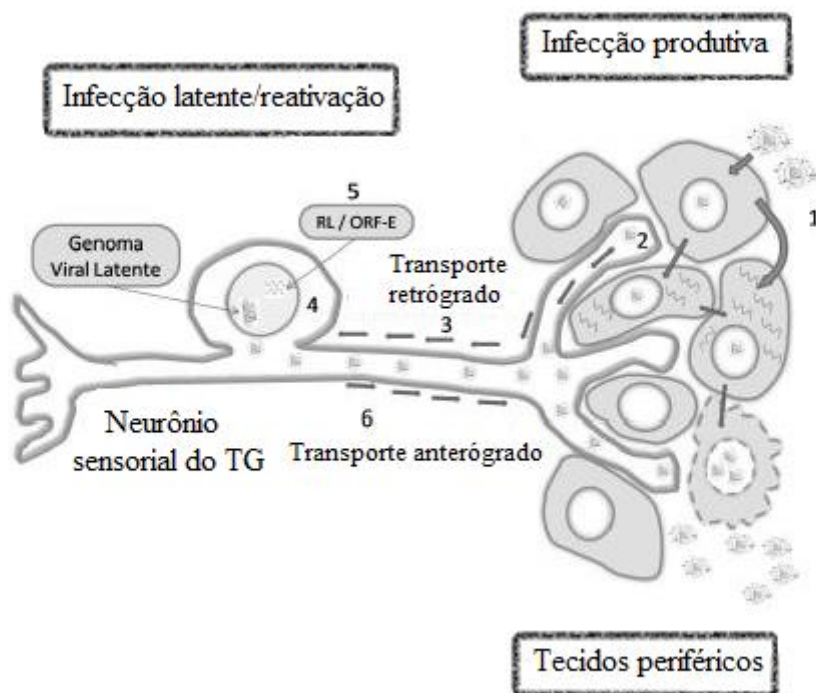


FIGURA 2 – Esquema do transporte axonal do BoHV. Após a infecção primária (1), o vírus invade os terminais sensoriais dos neurônios (2). Posteriormente, os nucleocapsídeos passam por transporte axonal retrógrado (3) até o corpo neural dentro do gânglio trigêmeo TG (4), onde estabelece sua latência e expressa o gen relacionado com a latência (RL) e ORF-E (5). Durante o estresse animal, o vírus é ativado e transportado de maneira anterógrado (6) até o sítio inicial da infecção, produzindo assim grande quantidade de partículas virais.

Fonte: Modificado de Ruiz et al<sup>61</sup>.

#### 2.1.6. Métodos diagnósticos

O diagnóstico clínico das infecções causadas pelo Herpesvirus Bovino 1 não é conclusivo. Mesmo na IPV e IPB onde as lesões são características, o diagnóstico é apenas presuntivo. As infecções com BoHV-1 podem ser diagnosticadas com base em testes sorológicos que detectam vírus, componentes de vírus ou anticorpos; ou por meio de ensaios moleculares que detectam DNA genômico por PCR<sup>33, 62</sup>.

#### a) Isolamento viral em cultivo celular

O BoHV - 1 pode ser facilmente isolado em cultura de células primárias ou secundárias de bovinos, tais como células do rim, pulmão, testículos, cornetos, traqueia ou em linhas celulares estabelecidas, tais como células de rim bovino Madin -Darby (MDBK). O vírus pode ser isolado através de *swab* nasal, conjuntival, vaginal e prepucial, além de cotilédones placentários de fetos abortados, linfonodo e fígado de fetos abortados<sup>62</sup>.

A presença do vírus em amostras é detectada por um efeito citopático (CPE) característico do BoHV-1 e aparece geralmente no prazo de três dias após a inoculação. Neste caso, serão observadas células arredondadas em forma de “cachos de uva”, células gigantes ou sincícios em torno de uma microplaca com cultivo celular<sup>63</sup>.

Entre as vantagens desta técnica destaca-se a universalidade, já que é aplicável a quase todos os vírus, e a obtenção do vírus viável para manutenção e posteriores estudos. Porém, possui desvantagens por ser uma técnica laboriosa, com alto custo e que necessita de correto acondicionamento das amostras por depender de partículas virais viáveis. Além disto, o tempo necessário para obtenção dos resultados pode levar alguns dias e os tecidos podem conter enzimas que são tóxicas para o cultivo de células<sup>64</sup>.

#### b) Reação em cadeia da polimerase

A Reação em cadeia de polimerase (PCR) é mais sensível do que o isolamento viral e é uma alternativa prática para a detecção rápida do vírus, já que o resultado está disponível dentro de 12 horas comparadas com o isolamento do vírus que requer sete dias<sup>65</sup>. O vírus pode ser detectado por PCR através de *swabs* nasais em até 14 dias após a infecção experimental de bovinos e também pode ser detectado em diversas amostras biológicas, como: soro fetal, sêmen, fragmentos de tecidos de feto abortado, sistema nervoso central, secreções, cultura de tecidos, contendo partículas virais viáveis e não viáveis. Vale ressaltar que, a técnica possibilita a detecção de partículas virais latentes, pois a análise é feita por meio da identificação do genoma viral, conferindo a técnica extrema importância nos casos de latência<sup>33, 64, 66, 67</sup>.

### c) Testes sorológicos

Vários testes sorológicos estão disponíveis para a detecção de anticorpos e aumento de título viral entre as fases aguda e convalescente da infecção. A resposta imune a infecção primária por BoHV-1 em animais experimentalmente contaminados é caracterizada pelo desenvolvimento de anticorpos IgM e IgG específicos no sétimo dia após a inoculação, já as respostas imunes secundárias são caracterizadas pelo desenvolvimento de anticorpos IgG<sup>68</sup>.

ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) indireto, direto, de bloqueio e c - ELISA são utilizados para amostras de soros bovinos<sup>69</sup>.

A soroneutralização (SN) é outro teste sorológico utilizado no diagnóstico do BoHV-1 e a identificação da infecção é feita pela detecção de anticorpos neutralizantes. Este teste, é utilizado para detectar anticorpos que possuem a capacidade de neutralizar a infectividade do vírus (anticorpos neutralizantes)<sup>70</sup>.

A detecção de anticorpos no soro indica que o animal teve contato com o antígeno, seja por infecção natural ou através da vacinação, não indicando se o animal realmente teve a doença clínica<sup>29</sup>.

Teste de soroneutralização e ELISA têm sido utilizados para a detecção de anticorpos contra o BoHV-1, porém o ELISA é mais específico, sensível e prático do que o SN<sup>71</sup>.

Outro teste sorológico utilizado na detecção do BoHV-1 é a imunoperoxidase (IPX), a qual é baseada na detecção de antígenos, por intermédio de anticorpos específicos conjugados a uma enzima. A presença do antígeno na solução testada é indicada pela mudança de coloração que ocorre quando um substrato enzimático é adicionado ao final da reação<sup>64</sup>.

A imunofluorescência (IF) permite a visualização de antígenos nos tecidos ou em suspensões celulares utilizando substâncias fluorescentes. A técnica consiste em usar anticorpos produzidos especialmente contra o vírus desejado, conjugado a uma substância fluorescente. O anticorpo conjugado é adicionado à solução teste, e na presença do vírus, este se ligará especificamente ao BoHV-1. Posteriormente, ao ser exposto à radiação eletromagnética ultravioleta, haverá emissão de luz (amarelo-esverdeada) que poderá ser observada ao microscópio. As vantagens da IF são: alta especificidade e rapidez na obtenção dos resultados, uma vez que o procedimento pode ser concluído em menos de duas horas<sup>72</sup>.

### 2.1.7. Epidemiologia

Embora a infecção por BoHV- 1 ocorra em todo o mundo, existem diferenças na prevalência e incidência. O vírus foi erradicado na Áustria, Dinamarca, Finlândia, Suécia, Suíça e Noruega<sup>73</sup>, assim como no Estado Federal da Baviera, na Alemanha e da província de Bolzano, na Itália<sup>74</sup>. Na Austrália, Bélgica, Canadá, Índia, Polônia, Turquia e EUA existem programas de controle que estão em vigor<sup>75</sup>.

A soroprevalência do BoHV-1 foi relatada na África entre 14 e 60% e entre 36 e 48% na América Central e América do Sul<sup>76</sup>; 36% na China<sup>77</sup>, 43% na Inglaterra<sup>78</sup> e entre 63 e 86% no Egito<sup>79</sup>. Na América do Norte a infecção possui um caráter endêmico, não existem políticas nacionais de erradicação, mas existem programas imunoproliféricos, onde a doença é controlada por meio de vacinas com vírus atenuado e/ou inativado<sup>80</sup>.

No Brasil estudos mostram uma alta frequência do BoHV-1 nos rebanhos bovinos e a soroprevalência varia entre 25,4 e 85%. Entre os estados estudados, o que apresentou maior soroprevalência foi Minas Gerais. Vale ressaltar que, as diferenças percentuais entre os resultados podem ser justificadas pelas diferenças entre o tipo de exploração, faixa etária dos animais, manejo sanitário do rebanho e fatores geográficos e climáticos<sup>67, 81</sup>.

Estudos realizados em Goiás, detectaram índice de soroprevalência entre 51,9<sup>82</sup> e 84,5%. Em 2010, colheram 660 amostras de soro bovino em frigoríficos no Estado de Goiás e investigou-se a presença do BoHV-1 por meio de SN, sendo que 84,5% das amostras estudadas eram positivas. A região do entorno do Distrito Federal apresentou a maior porcentagem de animais com títulos elevados (65,8%) e a região do Sudoeste Goiano a menor (13,6%)<sup>83</sup>.

O aumento da idade é um fator de risco para soropositividade com BoHV- 1<sup>78, 84</sup>. Os bezerros possuem uma menor prevalência de infecção, embora a incidência de soroconversão seja maior entre os animais com menos de 24 meses de idade. O declínio da imunidade materna está associada com o aumento do risco de infecção e de soroconversão; isto leva a uma maior prevalência de anticorpos contra o BoHV -1 em bovinos adultos, onde a taxa de soroconversão é menor devido à “imunidade de rebanho”<sup>75, 78, 85</sup>.

Os machos são soropositivos com mais frequência, indicando que o sexo é também um fator de risco, isto ocorre devido ao fato dos touros terem mais contato com outros bovinos do que as fêmeas<sup>75, 86</sup>.

O BoHV-1 pode ser transmitido através do sêmen importado, devido à contaminação do sêmen por vírus ou transmissão indireta por profissionais. Entretanto, o uso

de monta natural ao invés de inseminação artificial é um fator de risco para a soropositividade no rebanho brasileiro<sup>84, 87</sup>.

Na maioria dos estudos, há uma associação entre o tamanho do rebanho e soropositividade de BoHV-1. Rebanhos maiores ficam mais expostos a contatos de transmissão, já em rebanhos menores, existem menos animais sensíveis ao longo do ano, de modo que a infecção pelo BoHV- 1 permanece abaixo de um “limiar de epidemia”. Enquanto isso, em rebanhos maiores, o fluxo contínuo de animais sensíveis gera uma maior circulação do vírus<sup>78, 84, 85, 88</sup>. Além disso, a maior densidade do rebanho aumenta o potencial de transmissão inter-rebanho através de aerossóis, contato direto entre rebanhos vizinhos no pasto, ou contato indireto através de seres humanos ou fômites contaminados<sup>89, 90</sup>.

#### 2.1.8. Prevenção e controle

A vacinação é uma das estratégias com melhor custo/benefício para a prevenção e controle dos sinais clínicos e transmissão desses vírus. Vacinas de vírus vivo atenuado ou vírus inativado foram desenvolvidas contra BoHV- 1; no entanto, existem algumas desvantagens em relação à segurança e eficácia<sup>12</sup>. Vale ressaltar também que, vacinas clássicas complicam o diagnóstico sorológico e determinação da verdadeira prevalência da infecção<sup>13</sup>.

Vacinas com vírus inativado não são tão eficazes, porque normalmente produzem apenas imunidade humoral. Além disso, são necessárias mais de uma dose para alcançar os níveis de anticorpos neutralizantes aceitáveis. No caso da inativação com formaldeído, os antígenos podem também ser desnaturados, afetando assim a imunogenicidade da vacina<sup>91</sup>.

Vacinas atenuadas são produzidas geralmente através de passagens em série em cultura de tecidos e são capazes de gerar resposta imune humoral e celular. As estirpes destas vacinas podem estabelecer latência e ao serem reativadas, transmitidas para vacas prenhas, podendo causar aborto. Além disso, podem ser patogênicas para bezerros uma vez que seus sistemas imunitários não estão totalmente desenvolvidos e elas podem ser imunossupressoras<sup>91</sup>.

Embora a maioria das vacinas ainda consista de organismos inteiros atenuados ou inativados, nova deleção do gene e vacinas de subunidade começaram a ser licenciadas e usadas a campo. A utilização de vacinas marcadas, as quais diferenciam animais vacinados de infectados (também chamadas de vacinas DIVA), é importante para proteger rebanhos nacionais, porque permitem o monitoramento do rebanho e atendem os objetivos da vacinação, que é a erradicação<sup>92</sup>.

Vale ressaltar que, vacinas marcadas e convencionais podem prevenir a doença, mas não a infecção latente. Em países com alta prevalência de infecção, incluindo os Estados Unidos, o controle do BoHV está associado com a vacinação do rebanho com vacinas marcadas. Neste contexto, a capacidade de diferenciar animais infectados de vacinados tornou-se assunto crítico<sup>93</sup>.

Vacinas marcadas com deleção de gene oferecem a vantagem da eliminação dos genes virais específicos que não são essenciais para a replicação viral, enquanto gera a indução de uma resposta imunitária específica através de um proteína substancial. Atualmente, na Europa as vacinas usadas nos programas de controle do Herpesvírus bovino tipo 1 são altamente atenuadas devido à utilização de estirpes marcadas por deleção do gene da gE, cujo produto é considerado um fator de virulência presente em todos os membros conhecidos da subfamília *Alphaherpesvirinae*<sup>13, 46, 93-96</sup>.

Em alguns países europeus (Áustria, Dinamarca, Finlândia, Noruega, Suécia, Suíça), a IBR tem presumivelmente sido erradicada pelo uso de vacinas marcadas com deleção do gene gE. Nestes países, até recentemente, o rebanho não era vacinado contra esta doença. Porém, estes países livres do BoHV-1 estão ameaçados, uma vez que a erradicação da IBR não é um objetivo comum dentro dos países que estão envolvidos no comércio de bovinos e produção de sêmen para inseminação artificial. Sendo assim, a vacinação está sendo permitida novamente nestes países europeus. Além disso, faz-se necessária a regulamentação estrita da importação e vigilância imunológica regular<sup>73, 91</sup>.

## **2.2. Inativação Fotodinâmica**

### **2.2.1. Processo fotoquímico da inativação fotodinâmica**

A inativação fotodinâmica (PDI) consiste em uma terapia capaz de matar microrganismos por meio da ação tóxica de espécies reativas de oxigênio (ROS) diretamente sobre qualquer biomolécula próxima<sup>97</sup>. A PDI consiste basicamente na combinação de um composto fotossensibilizador (composto orgânico), luz visível e oxigênio molecular. Após ser irradiado, o fotossensibilizador (PS) absorve o fóton e sofre uma série de processos fotofísicos que levam à formação de íons radicais e/ou transferência de energia para outros compostos presentes no organismo. Quando moléculas como o oxigênio molecular recebem essa energia podem desencadear uma série de reações químicas e bioquímicas levando à morte celular<sup>14</sup>.

Estes radicais são formados quando um fotossensibilizador não tóxico é submetido a uma fonte de luz em um comprimento de onda específico<sup>14</sup>. ROS são

subprodutos do metabolismo normal do oxigênio e desempenham importante função nos processos de sinalização e homeostase celular. Por outro lado, altos níveis das espécies reativas de oxigênio provocam danos oxidativos a proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, causando, assim, morte celular por necrose e/ou apoptose, demonstrando ser efetivo contra uma vasta gama de patógeno como fungos, vírus e bactérias<sup>98-101</sup>.

Dois possíveis mecanismos oxidativos podem ser observados com a irradiação de um fotossensibilizador. O primeiro tipo está relacionado com os danos por meio de radicais livres ou peróxido de hidrogênio em biomoléculas. No segundo tipo, considerado a principal causa de morte celular, observa-se uma transferência de energia do fotossensibilizador excitado para o oxigênio molecular tripleto ( $^3\text{O}_2$ ), produzindo oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ), espécie altamente reativa e de elevada toxicidade<sup>97, 102, 103</sup>.

### 2.2.2. Fontes de luz para a inativação fotodinâmica

A fonte de luz é necessária para ativar o PS e dar início a reação fotoquímica, sendo assim, a inativação fotodinâmica é utilizada apenas para o tratamento de lesões que podem ser irradiadas pela luz<sup>104</sup>.

As duas classes principais de fontes de luz que foram aplicadas na PDI incluem as fontes de luz coerentes e não coerentes<sup>104</sup>. As fontes de luz não coerentes foram as primeiras fontes empregadas na Inativação Fotodinâmica, tais como as lâmpadas convencionais, que liberam um amplo espectro de comprimentos de onda, portanto devem ser utilizadas em combinação com filtros ópticos para obter uma saída de luz de comprimento de onda desejado<sup>105</sup>. Apesar de serem mais seguras, fáceis de usar e mais baratas, elas possuem algumas desvantagens como significativos efeitos térmicos, baixa intensidade de luz e dificuldade no controle da intensidade da luz<sup>106</sup>.

No entanto, desde a introdução das luzes coerentes, o uso das luzes não coerentes na PDI diminuiu, devido ao fato das fontes de luz coerentes produzirem um comprimento de onda monocromático que permite o fácil cálculo da dosimetria e irradiação em um comprimento de onda específico para cada PS<sup>107</sup>. Dentre as luzes coerentes, se destacam os diodos emissores de luz (LEDs) e os lasers<sup>106</sup>.

Os LEDs podem gerar luz de alta energia com comprimentos de onda específicos e podem ser montados em uma variedade de geometrias e tamanhos, permitindo o uso tanto para o tratamento de tumores cerebrais quanto em superfícies planas com ampla lesão superficial<sup>108, 109</sup>. No entanto, as fontes de luz mais utilizadas na PDI são lasers, que produzem luz monocromática de alta energia em um comprimento de onda específico com a largura de

banda estreita para um fotossensibilizador específico. Além disso, podem ser focados, transmitidos por uma fibra óptica ou diretamente entregues ao local alvo<sup>105</sup>.

Apesar das diferenças entre os tipos de fontes de luz, foi demonstrado que ambas as fontes, coerentes e não coerentes, apresentam eficácias semelhantes<sup>110</sup>. Com isso, a seleção da fonte de luz depende da localização do patógeno ou das lesões (profundidade, tamanho, e acessibilidade); tipos de PS (espectros de absorção e modo de administração); custo e a disponibilidade de sistemas de entrega de luz<sup>111</sup>.

As luzes que possuem comprimento de onda na faixa de 600 a 800 nm são consideradas ideais para a PDI, sendo chamada de “janela terapêutica”, isso se deve ao fato da maioria dos fótons com comprimentos de ondas mais curtos do que 600 nm não penetrarem nas profundidades desejadas e aqueles que possuem comprimentos de ondas maiores do que 800 nm não possuem energia suficiente para gerar oxigênio singlete e iniciar uma reação fotodinâmica. Vale ressaltar que a luz azul possui um poder de penetração baixo devido ao seu menor comprimento de onda, enquanto que as radiações com luz vermelha e infravermelho conseguem penetrar mais profundamente nos tecidos, porque possuem um maior comprimento de onda<sup>112</sup> (Figura 3).

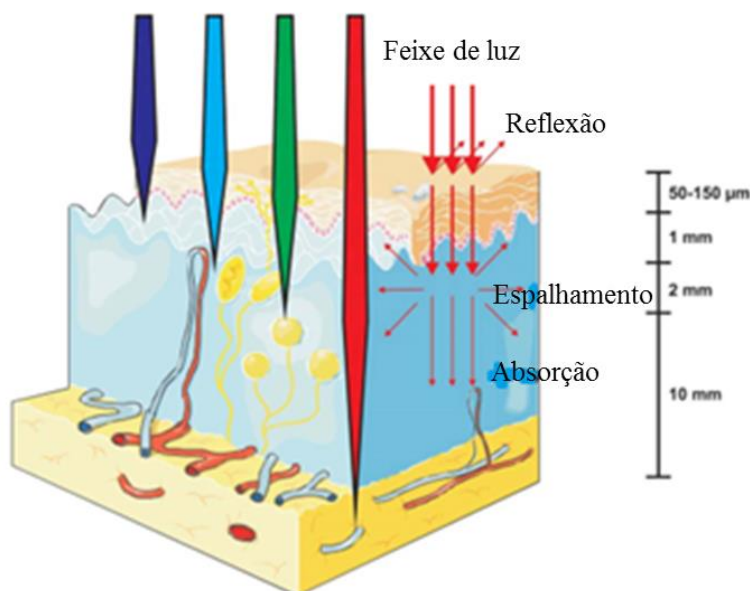


FIGURA 3 – Propagação de luz através dos tecidos. A profundidade que a luz irá penetrar no tecido está relacionada com o comprimento de onda. Com isso, a luz azul penetra menos eficientemente através do tecido, enquanto as radiações vermelho e infravermelho penetram mais profundamente  
Fonte: Adaptado de Agostinis et al.<sup>14</sup>

### 2.2.3. Fotossensibilizadores

A fotossensibilização é o processo de transferência de energia da luz absorvida para os reagentes desejados através da utilização de substâncias capazes de absorver a luz, no caso os fotossensibilizadores (PS). Os fotossensibilizadores podem ser categorizados pelas suas estruturas e origens químicas. Em geral, eles podem ser divididos em três grandes famílias: fotossensibilizadores à base de porfirina, fotossensibilizadores à base de clorofila e corantes. A maioria dos fotossensibilizantes clínicos atualmente aprovados pertencem à família da porfirina<sup>113</sup>.

O primeiro PS a ser clinicamente utilizado para terapia fotodinâmica era uma mistura de porfirinas solúveis em água, chamado de derivado de hematoporfirina (HpD). Embora ainda seja amplamente utilizado, o produto tem algumas desvantagens, incluindo uma fotossensibilidade prolongada da pele e uma absorção relativamente baixa, em torno de 630 nm. Apesar desta substância produzir um efeito fotodinâmico, a eficácia pode ser melhorada deslocando a banda de absorbância para o vermelho e conseqüentemente, aumentando a absorção em comprimentos de onda maior<sup>114</sup>.

Devido estas desvantagens, a segunda geração de PS foi desenvolvida. As vantagens relativas da segunda geração de fotossensibilizadores em comparação com o primeira geração são a sua pureza química, rendimentos mais elevados de oxigênio singleto, maior especificidade com células tumorais e aumento da profundidade de penetração nos tecidos<sup>115</sup>.

A terceira geração se refere aqueles fotossensibilizadores que estão associados a vários modificadores, tais como anticorpos monoclonais, nanopartículas, lipossomos e polímeros, que têm como alvo receptores específicos expressos em certos tecidos, aumentando assim sua afinidade. No entanto, atualmente, estes não estão disponíveis comercialmente<sup>116</sup>.

As características ideais de um fotossensibilizador incluem ter baixos níveis de toxicidade no escuro para os seres humanos e animais experimentais e baixa incidência de toxicidade de administração, isto é, hipotensão ou de reação alérgica. Além disso, devem ter as bandas de absorção relativamente elevadas ( $> 20.000-30.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) para minimizar a dose de PS necessários para alcançar o efeito desejado, a síntese do PS deve ser relativamente fácil, deve ser um composto puro, com uma composição constante e uma vida de prateleira estável, e idealmente ser solúvel em água ou solúvel em uma mistura de solventes aquosos

inócuos. Não deve agregar indevidamente em ambientes biológicos, já que neste caso reduziria sua eficiência fotoquímica<sup>117, 118</sup>.

A eliminação do paciente deve acontecer em menos de um dia para evitar que haja a necessidade de proteção pós-tratamento à exposição à luz. Um curto intervalo de tempo entre a aplicação do PS e a iluminação é desejável para facilitar o tratamento ambulatorial, tornando-o eficaz e com um melhor custo-benefício<sup>117, 118</sup>.

#### 2.2.4. Porfirinas

A palavra porfirina é originada da palavra grega *porphura*, a qual era usada para designar a cor púrpura, uma vez que as porfirinas são pigmentos fortemente corados e que apresentam a cor púrpura<sup>119</sup>.

As porfirinas são consideradas como “pigmentos da vida”, pois conferem a cor vermelha característica nos animais (devido ao grupo heme) e cor verde nas plantas (devido a clorofila), devido ao fato delas apresentarem bandas de absorção características na região do visível. Elas são compostos orgânicos nitrogenados que podem atuar também como fotossensibilizadores uma vez que apresentam alta eficiência na formação de oxigênio singlete, e são organizadas na forma cíclica por quatro anéis pirrólicos fundidos, como mostrado na Figura 4<sup>114</sup>. Apresentam, portanto, um macrociclo central formado por 20 átomos de carbonos e quatro átomos de nitrogênio<sup>119</sup>.

A propriedade de fotossensibilização das porfirinas, foi reconhecida pela primeira vez na década de 1900 quando utilizaram a hematoporfirina (Hp) e desde a década de 1970 elas são estudadas usando soluções de Hp parcialmente purificadas<sup>114</sup>.

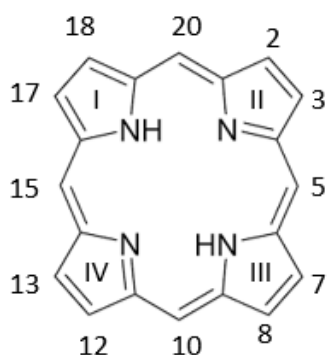


FIGURA 4 - Etrutura química da porfirina  
Fonte: Adaptado de Perussi<sup>120</sup>

Os anéis pirrólicos são numerados com algarismos romanos de I a IV, os carbonos 5, 10, 15 e 20 são denominados de posições *meso*, os carbonos 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 e 18 são denominados de posições  $\beta$ -pirrólicas e os carbonos 1, 4, 6, 9, 11, 14, 16 e 19 são as posições  $\alpha$  (Figura 4)<sup>119</sup>.

O uso de *meso*-porfirinas tem se mostrado bastante eficiente na inativação fotodinâmica de vários patógenos, fazendo com que haja um maior interesse por parte dos pesquisadores a fim de estudá-las e sintetizar novas moléculas de *meso*-porfirinas que sejam mais eficientes que as porfirinas de base livre<sup>121, 122</sup>. Quando as porfirinas de base livre são comparadas com as *meso*-porfirinas, estas apresentam melhores resultados uma vez que passam a ter cargas e a ter um caráter mais lipofílico devido à substituição de carbonos na posição *meso*, fazendo com que haja uma maior interação entre o PS e as membranas das células e dos patógenos, melhorando a eficácia da fotoinativação<sup>123, 124</sup>.

Tipicamente as porfirinas apresentam cinco principais bandas de absorção frente às radiações eletromagnéticas. A banda de Soret, é a principal e mais intensa destas, possui pico máximo de absorção por volta de 380nm e quando irradiadas com luz deste comprimento de onda, apresentam uma intensa fluorescência no vermelho. As outras quatro bandas são conhecidas como bandas-Q, possuem menor intensidade e estão localizadas em comprimentos de onda na região visível do espectro eletromagnético, o que do ponto de vista clínico é uma grande vantagem quando comparado ao ultravioleta<sup>114</sup>.

As porfirinas são amplamente aplicadas como tratamento de infecções virais. Alguns estudos mostraram que tais moléculas são eficientes na inativação fotodinâmica *in vitro* de vírus não envelopados em componentes sanguíneos e outros meios aquosos, e na inativação de vírus envelopados como o *Herpes simplex* e HIV, quando utilizaram o HpD, o qual é gerado a partir de uma porfirina fisiológica<sup>125</sup>.

O macrociclo da porfirina possui dois átomos de nitrogênios imínicos capazes de aceitar prótons e dois nitrogênios amínicos capazes de ceder prótons. A substituição dos dois átomos de hidrogênio centrais ligados ao nitrogênio do anel na molécula da porfirina na forma de base livre por um cátion metálico leva à formação de uma porfirina metalada<sup>126</sup>.

As porfirinas metaladas apresentam melhores resultados quando comparadas com as porfirinas de base livre, isso se deve ao fato do metal no anel central da porfirina diminuir a ligação com a mitocôndria celular e aumentar as interações com a membrana, melhorando assim a sua eficiência fotodinâmica<sup>127</sup>.

#### 2.4.5. Dosimetria

Para permitir uma máxima ação nas células-alvo com mínima toxicidade aos tecidos normais é necessário controlar a reação fotodinâmica<sup>128</sup>. A chave para maximizar o resultado do tratamento é por um sistema de dosimetria confiável que permite uma distribuição da dose sobre a região que será tratada avaliando, de forma quantitativa, a dosagem do fotossensibilizador que não causará danos aos tecidos saudáveis, o que permite uma orientação e aperfeiçoamento do tratamento<sup>129, 130</sup>.

Ao contrário da radioterapia, em que a dose absorvida por unidade de massa de tecido é bem definida e se correlaciona com o efeito biológico resultante, na PDT existe a falta de definição do cálculo da dose de PS<sup>129</sup>. Além disso, ainda não existe sistema de dosimetria em tempo real e os profissionais da saúde utilizam os indícios sobre os parâmetros de tratamento com base na dose da droga e fluência de luz administrada no tecido, porém esses não são parâmetros precisos para prever a distribuição de luz realmente necessária em pacientes<sup>130</sup>.

Tratamento excessivo faz com que hajam inúmeros efeitos colaterais em tecidos normais, enquanto subtratamento leva ao fracasso do tratamento<sup>130</sup>, por isso é importante garantir que o produto da irradiação e tempo de exposição seja superior a um certo limiar de dose que é necessária para iniciar a morte celular<sup>131</sup>. Os fatores que têm impacto sobre a estimativa da dosimetria são: dose do fármaco administrado, infusão de fármacos para um intervalo de iluminação, influência da luz (em um cálculo aproximado), concentração de PS nos tecidos, distribuição e oxigenação dos tecidos<sup>132</sup>.

## REFERÊNCIAS

1. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. Pecuária Brasileira. [acesso 15 jul 2015]. Disponível em: [http://www.abiec.com.br/3\\_pecuaria.asp](http://www.abiec.com.br/3_pecuaria.asp)
2. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária Municipal 2013. [acesso 15 jul 2015]. Disponível em: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Pecuaria/Producao\\_da\\_Pecuaria\\_Municipal/2013/ppm2013.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2013/ppm2013.pdf). 2013 [
3. Bowland SL, Shewen PE. Bovine respiratory disease: commercial vaccines currently available in Canada. *Can Vet J*. 2000;41(1):33-48.
4. Snowden GD, Van Vleck LD, Cundiff LV, Bennett GL. Bovine respiratory disease in feedlot cattle: environmental, genetic, and economic factors. *J Anim Sci*. 2006;84(8):1999-2008.
5. Kahrs RF. Infectious bovine rhinotracheitis: a review and update. *J Am Vet Med Assoc*. 1977;171(10):1055-64.
6. Raaperi K, Bougeard S, Alekseev A, Orro T, Viltrop A. Association of herd BRSV and BHV-1 seroprevalence with respiratory disease and reproductive performance in adult dairy cattle. *Acta Vet Scand*. 2012;54:4.
7. van Drunen Littel-van den Hurk S, Parker MD, Massie B, van den Hurk JV, Harland R, Babiuk LA, et al. Protection of cattle from BHV-1 infection by immunization with recombinant glycoprotein gIV. *Vaccine*. 1993;11(1):25-35.
8. Organização Mundial para a Saúde Animal e Oficina Internacional de Epizootias, OIE. OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2015. [acesso 18 mar 2015]. Disponível em: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2015/>.
9. Junqueira JRC, Alfieri AA. Falhas da reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas. *Semina: Ci Agrárias*. 2006;27(2):289-29.
10. Rufino FAL, Seneda MM, Alfieri AA. Impacto do herpesvírus bovino 1 e do vírus da diarreia viral bovina na transferência de embriões. *Arch vet sci*. 2006;11(1):78-84.
11. Kirkbride CA. Etiologic agents detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths. *J Vet Diagn Invest*. 1992;4(2):175-80.
12. van Drunen Littel-van den Hurk S. Cell-mediated immune responses induced by BHV-1: rational vaccine design. *Expert Rev Vaccines*. 2007;6(3):369-80.
13. Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S, Tikoo SK, Lewis PJ, Liang X. Novel viral vaccines for livestock. *Vet Immunol Immunopathol*. 1996;54(1-4):355-63.
14. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(4):250-81.
15. Engels M, Ackermann M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Vet Microbiol*. 1996;53(1-2):3-15.
16. Roizmann B, Desrosiers RC, Fleckenstein B, Lopez C, Minson AC, Studdert MJ. The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol*. 1992;123(3-4):425-49.

17. Muylkens B, Thiry J, Kirten P, Schynts F, Thiry E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet Res.* 2007;38(2):181-209.
18. Metzler AE, Matile H, Gassmann U, Engels M, Wyler R. European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. *Arch Virol.* 1985;85(1-2):57-69.
19. D'Arce RC, Almeida RS, Silva TC, Franco AC, Spilki F, Roehe PM, et al. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. *Vet Microbiol.* 2002;88(4):315-24.
20. Schudel AA, Carrillo BJ, Wyler R, Metzler AE. Infections of calves with antigenic variants of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurological disease. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1986;33(4):303-10.
21. van Oirschot JT. Bovine herpesvirus 1 in semen of bulls and the risk of transmission: a brief review. *Vet Q.* 1995;17(1):29-33.
22. Baranowski E, Keil G, Lyaku J, Rijsewijk FA, van Oirschot JT, Pastoret PP, et al. Structural and functional analysis of bovine herpesvirus 1 minor glycoproteins. *Vet Microbiol.* 1996;53(1-2):91-101.
23. van Drunen Littel-van den Hurk S, Hughes G, Babiuk LA. The role of carbohydrate in the antigenic and immunogenic structure of bovine herpesvirus type 1 glycoproteins gI and gIV. *J Gen Virol.* 1990;71 ( Pt 9):2053-63.
24. Okazaki K, Honda E, Minetoma T, Kumagai T. Bovine herpesvirus type 1 gp87 mediates both attachment of virions to susceptible cells and hemagglutination. *Arch Virol.* 1987;97(3-4):297-307.
25. Fehler F, Herrmann JM, Saalmuller A, Mettenleiter TC, Keil GM. Glycoprotein IV of bovine herpesvirus 1-expressing cell line complements and rescues a conditionally lethal viral mutant. *J Virol.* 1992;66(2):831-9.
26. Kelly BJ, Fraefel C, Cunningham AL, Diefenbach RJ. Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Virus Res.* 2009;145(2):173-86.
27. Mettenleiter TC, Klupp BG, Granzow H. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr Opin Microbiol.* 2006;9(4):423-9.
28. Roizman B, Taddeo B. The strategy of herpes simplex virus replication and takeover of the host cell. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, et al., editors. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis.* Cambridge: Cambridge University Press Copyright (c) Cambridge University Press 2007; 2007.
29. Franco AC, Roehe PM. *Herpesviridae.* In: Flores EF, editor. *Virologia Veterinária.* 1 ed. Santa Maria: Editora UFSM; 2007. p. 433-88.
30. Mars MH, de Jong MC, van Maanen C, Hage JJ, van Oirschot JT. Airborne transmission of bovine herpesvirus 1 infections in calves under field conditions. *Vet Microbiol.* 2000;76(1):1-13.
31. Pastoret PP, Thiry E, Brochier B, Derboven G. Bovine herpesvirus 1 infection of cattle: pathogenesis, latency, consequences of latency. *Ann Rech Vet.* 1982;13(3):221-35.
32. Hinkley S, Ambagala AP, Jones CJ, Srikumaran S. A vhs-like activity of bovine herpesvirus-1. *Arch Virol.* 2000;145(10):2027-46.

33. Nandi S, Kumar M, Manohar M, Chauhan RS. Bovine herpes virus infections in cattle. *Anim Health Res Rev.* 2009;10(1):85-98.
34. Mettenleiter TC. Initiation and spread of alpha-herpesvirus infections. *Trends Microbiol.* 1994;2(1):2-4.
35. Mettenleiter TC. Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res.* 2004;106(2):167-80.
36. Karger A, Saalmuller A, Tufaro F, Banfield BW, Mettenleiter TC. Cell surface proteoglycans are not essential for infection by pseudorabies virus. *J Virol.* 1995;69(6):3482-9.
37. Liang X, Chow B, Raggo C, Babiuk LA. Bovine herpesvirus 1 UL49.5 homolog gene encodes a novel viral envelope protein that forms a disulfide-linked complex with a second virion structural protein. *J Virol.* 1996;70(3):1448-54.
38. Liang X, Chow B, Babiuk LA. Study of immunogenicity and virulence of bovine herpesvirus 1 mutants deficient in the UL49 homolog, UL49.5 homolog and dUTPase genes in cattle. *Vaccine.* 1997;15(10):1057-64.
39. Gerds V, Beyer J, Lomniczi B, Mettenleiter TC. Pseudorabies virus expressing bovine herpesvirus 1 glycoprotein B exhibits altered neurotropism and increased neurovirulence. *J Virol.* 2000;74(2):817-27.
40. Meyer G, Hanon E, Georlette D, Pastoret PP, Thiry E. Bovine herpesvirus type 1 glycoprotein H is essential for penetration and propagation in cell culture. *J Gen Virol.* 1998;79 ( Pt 8):1983-7.
41. Dohner K, Wolfstein A, Prank U, Echeverri C, Dujardin D, Vallee R, et al. Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. *Mol Biol Cell.* 2002;13(8):2795-809.
42. Wirth UV, Gunkel K, Engels M, Schwyzer M. Spatial and temporal distribution of bovine herpesvirus 1 transcripts. *J Virol.* 1989;63(11):4882-9.
43. Leuzinger H, Ziegler U, Schraner EM, Fraefel C, Glauser DL, Heid I, et al. Herpes simplex virus 1 envelopment follows two diverse pathways. *J Virol.* 2005;79(20):13047-59.
44. Wild P, Engels M, Senn C, Tobler K, Ziegler U, Schraner EM, et al. Impairment of nuclear pores in bovine herpesvirus 1-infected MDBK cells. *J Virol.* 2005;79(2):1071-83.
45. Bennett R, Ijpelaar J. *Economic Assessment of Livestock Diseases in Great Britain.* The University of Reading; 2003
46. Kaashoek MJ, Rijsewijk FA, Ruuls RC, Keil GM, Thiry E, Pastoret PP, et al. Virulence, immunogenicity and reactivation of bovine herpesvirus 1 mutants with a deletion in the gC, gG, gI, gE, or in both the gI and gE gene. *Vaccine.* 1998;16(8):802-9.
47. Ackermann M, Muller HK, Bruckner L, Kihm U. Eradication of infectious bovine rhinotracheitis in Switzerland: review and prospects. *Vet Microbiol.* 1990;23(1-4):365-70.
48. van Oirschot JT, Straver PJ, van Lieshout JA, Quak J, Westenbrink F, van Exsel AC. A subclinical infection of bulls with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination centre. *Vet Rec.* 1993;132(2):32-5.
49. Wentink GH, van Oirschot JT, Verhoeff J. Risk of infection with bovine herpes virus 1 (BHV1): a review. *Vet Q.* 1993;15(1):30-3.
50. Meyer G, Lemaire M, Ros C, Belak K, Gabriel A, Cassart D, et al. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. *Arch Virol.* 2001;146(4):633-52.

51. Tikoo SK, Campos M, Babiuk LA. Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis, and control. *Adv Virus Res.* 1995;45:191-223.
52. Turin L, Russo S. BHV-1 infection in cattle: an update. *Vet Bull.* 2003;73:16-21.
53. Miller JM, van der Maaten MJ. Reproductive tract lesions in heifers after intrauterine inoculation with infectious bovine rhinotracheitis virus. *Am J Vet Res.* 1984;45(4):790-4.
54. Miller JM, Whetstone CA, Van der Maaten MJ. Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA. *Am J Vet Res.* 1991;52(3):458-61.
55. Enquist LW, Husak PJ, Banfield BW, Smith GA. Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system. *Adv Virus Res.* 1998;51:237-347.
56. Jones C. Alphaherpesvirus latency: its role in disease and survival of the virus in nature. *Adv Virus Res.* 1998;51:81-133.
57. Wagner EK, Bloom DC. Experimental investigation of herpes simplex virus latency. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(3):419-43.
58. Rock D, Lokensgard J, Lewis T, Kutish G. Characterization of dexamethasone-induced reactivation of latent bovine herpesvirus 1. *J Virol.* 1992;66(4):2484-90.
59. Jones C. Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(1):79-95.
60. Dennett DP, Barasa JO, Johnson RH. Infectious bovine rhinotracheitis virus: studies on the venereal carrier status in range cattle. *Res Vet Sci.* 1976;20(1):77-83.
61. Ruiz J, Jaime J, Vera V. Latencia del Herpesvirus bovino-1: el papel de los transcritos relacionados con latencia (RL). *Acta bio Colomb.* 2008;13(1):3-22.
62. Takiuchi E, Fernandes A, Alfieri AA. Herpesvírus Bovino tipo 1: Tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. *Semina: Ci Agrárias.* 2001;22(2):203.
63. Weiblen R, Kreutz LC, Canabarro TF, Schuch LF, Rebelatto MC. Isolation of bovine herpesvirus 1 from preputial swabs and semen of bulls with balanoposthitis. *J Vet Diagn Invest.* 1992;4(3):341-3.
64. F FE. *Virologia Veterinária.* BRUM M C S WR, editor: UFSM; 2007.
65. Fuchs M, Hubert P, Detterer J, Rziha HJ. Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild-type virus and virus lacking glycoprotein E. *J Clin Microbiol.* 1999;37(8):2498-507.
66. Xia JQ, Yason CV, Kibenge FS. Comparison of dot blot hybridization, polymerase chain reaction, and virus isolation for detection of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in artificially infected bovine semen. *Can J Vet Res.* 1995;59(2):102-9.
67. Takiuchi E, Medici KC, Alfieri AF, Alfieri AA. Bovine herpesvirus type 1 abortions detected by a semi-nested PCR in Brazilian cattle herds. *Res Vet Sci.* 2005;79(1):85-8.
68. Turin L, Russo S, Poli G. BHV-1: new molecular approaches to control a common and widespread infection. *Mol Med.* 1999;5(5):261-84.
69. Jorge A. *Microbiologia e Imunologia Oral: Elsevier Health Sciences Brazil;* 2012.

70. Fino T C, Ramos A F, Leite R C. Infecções por herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e suas implicações na reprodução bovina. *Rev bras reprod anim.* 2012;36(2).
71. Nandi S. Sensitive detection of genomic DNA of BHV-1 in semen samples of bulls by polymerase chain reaction. In: Manohar M, Pandley AB, Chauhan RS, editors.: *J Immunol Immunopathol*; 2008. p. 132–6.
72. Kunrath CF, Vogel FSF, Oldoni I, Flores EF, Weiblen R, Dezengrini R, et al. Soroneutralização e imunofluorescência utilizando anticorpos monoclonais no diagnóstico rápido de infecções pelo herpesvírus bovino tipos 1 e 5 (BHV-1 e BHV-5). *Cienc Rural.* 2004;34:1877-83.
73. Ackermann M, Engels M. Pro and contra IBR-eradication. *Vet Microbiol.* 2006;113(3–4):293-302.
74. Comissão Europeia. Decisão de execução da comissão (2011 /674 / UE). [acesso em 10 out de 2015]. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX:32011D06742011> [
75. Boelaert F, Speybroeck N, de Kruif A, Aerts M, Burzykowski T, Molenberghs G, et al. Risk factors for bovine herpesvirus-1 seropositivity. *Prev Vet Med.* 2005;69(3-4):285-95.
76. OC S. Infectious bovine rhinotracheitis virus. Dinter Z MB, editor. Oxford: Elsevier Science Publishers BV 1990.
77. Yan BF, Chao YJ, Chen Z, Tian KG, Wang CB, Lin XM, et al. Serological survey of bovine herpesvirus type 1 infection in China. *Vet Microbiol.* 2008;127(1-2):136-41.
78. Woodbine KA, Medley GF, Moore SJ, Ramirez-Villaescusa AM, Mason S, Green LE. A four year longitudinal sero-epidemiological study of bovine herpesvirus type-1 (BHV-1) in adult cattle in 107 unvaccinated herds in south west England. *BMC Vet Res.* 2009;5:5.
79. Mahmoud MA NA, Allam AM. Investigations on Infectious Bovine Rhinotracheitis in Egyptian Cattle and Buffaloes. *Global Veterinaria.* 2009;4:335-40.
80. Deregt D, Jordan LT, van Drunen Littel-van den Hurk S, Masri SA, Tessaro SV, Gilbert SA. Antigenic and molecular characterization of a herpesvirus isolated from a North American elk. *Am J Vet Res.* 2000;61(12):1614-8.
81. de Melo CB, Leite RC, Lobato ZI. Infection by *Neospora caninum* associated with bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea virus in cattle from Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol.* 2004;119(2-3):97-105.
82. Barbosa A C, Alfaia B T. Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) no Estado de Goiás, Brasil. *Cienc Rural.* 2005;35(6):1368-73.
83. Affonso IB, Amoril JG, Alexandrino B, Buzinaro MdG, Medeiros ASRd, Samara SI. Anticorpos contra o Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) nas dez regiões de planejamento do estado de Goiás, Brasil. *Ci Anim Bras.* 2010; 35(4).
84. Raaperi K, Nurmoja I, Orro T, Viltrop A. Seroepidemiology of bovine herpesvirus 1 (BHV1) infection among Estonian dairy herds and risk factors for the spread within herds. *Prev Vet Med.* 2010;96(1-2):74-81.
85. Segura-Correa JC, Solorio-Rivera JL, Sanchez-Gil LG. Seroconversion to bovine viral diarrhoea virus and infectious bovine rhinotracheitis virus in dairy herds of Michoacan, Mexico. *Trop Anim Health Prod.* 2010;42(2):233-8.

86. Guarino H, Nunez A, Repiso MV, Gil A, Dargatz DA. Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhoea virus in beef cattle in Uruguay. *Prev Vet Med.* 2008;85(1-2):34-40.
87. Dias JA, Alfieri AA, Ferreira-Neto JS, Goncalves VS, Muller EE. Seroprevalence and risk factors of bovine herpesvirus 1 infection in cattle herds in the state of Parana, Brazil. *Transbound Emerg Dis.* 2013;60(1):39-47.
88. Nardelli S, Farina G, Lucchini R, Valorz C, Moresco A, Dal Zotto R, et al. Dynamics of infection and immunity in a dairy cattle population undergoing an eradication programme for Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR). *Prev Vet Med.* 2008;85(1-2):68-80.
89. Van Wuijckhuise L, Bosch J, Franken P, Frankena K, Elbers AR. Epidemiological characteristics of bovine herpesvirus 1 infections determined by bulk milk testing of all Dutch dairy herds. *Vet Rec.* 1998;142(8):181-4.
90. Gonzalez-Garcia MA, Arenas-Casas A, Carbonero-Martinez A, Borge-Rodriguez C, Garcia-Bocanegra I, Maldonado JL, et al. Seroprevalence and risk factors associated with bovine herpesvirus type 1 (BHV1) infection in non-vaccinated cattle herds in Andalusia (South of Spain). *Span J Agric Res.* 2009;7(3):550-4.
91. Jones C, Chowdhury S. Bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) is an important cofactor in the bovine respiratory disease complex. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2010;26(2):303-21.
92. van Drunen Littel-van den Hurk S. Rationale and perspectives on the success of vaccination against bovine herpesvirus-1. *Vet Microbiol.* 2006;113(3-4):275-82.
93. van Oirschot JT, Kaashoek MJ, Rijsewijk FA. Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. *Vet Microbiol.* 1996;53(1-2):43-54.
94. Muylkens B, Meurens F, Schynts F, Farnir F, Pourchet A, Bardiau M, et al. Intraspecific bovine herpesvirus 1 recombinants carrying glycoprotein E deletion as a vaccine marker are virulent in cattle. *J Gen Virol.* 2006;87(Pt 8):2149-54.
95. van Engelenburg FA, Kaashoek MJ, Rijsewijk FA, van den Burg L, Moerman A, Gielkens AL, et al. A glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1 is avirulent in calves. *J Gen Virol.* 1994;75 ( Pt 9):2311-8.
96. Rebordosa X, Pinol J, Perez-Pons JA, Lloberas J, Naval J, Serra-Hartmann X, et al. Glycoprotein E of bovine herpesvirus type 1 is involved in virus transmission by direct cell-to-cell spread. *Virus Res.* 1996;45(1):59-68.
97. Almeida LM, Zanoelo FF, Castro KP, Borissevitch IE, Soares CM, Goncalves PJ. Cell survival and altered gene expression following photodynamic inactivation of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Photochem Photobiol.* 2012;88(4):992-1000.
98. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B.* 1997;39(1):1-18.
99. Hu Y, Huang X, Lu S, Hamblin MR, Mylonakis E, Zhang J, et al. Photodynamic therapy combined with terbinafine against chromoblastomycosis and the effect of PDT on *Fonsecaea monophora* in vitro. *Mycopathologia.* 2015;179(1-2):103-9.
100. Hillemanns P, Einstein MH, Iversen OE. Topical hexaminolevulinate photodynamic therapy for the treatment of persistent human papilloma virus infections and cervical intraepithelial neoplasia. *Expert Opin Investig Drugs.* 2015;24(2):273-81.

101. De Sordi L, Butt MA, Pye H, Kohoutova D, Mosse CA, Yahioglu G, et al. Development of Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT) for *Clostridium difficile*. *PLoS One*. 2015;10(8):e0135039.
102. Weishaupt KR, Gomer CJ, Dougherty TJ. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. *Cancer Res*. 1976;36(7 pt 1):2326-9.
103. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2004;1(4):279-93.
104. Brancalion L, Moseley H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers Med Sci*. 2002;17(3):173-86.
105. Huang Z. A review of progress in clinical photodynamic therapy. *Technol Cancer Res Treat*. 2005;4(3):283-93.
106. Schmidt MH, Bajic DM, Reichert KW, 2nd, Martin TS, Meyer GA, Whelan HT. Light-emitting diodes as a light source for intraoperative photodynamic therapy. *Neurosurgery*. 1996;38(3):552-6; discussion 6-7.
107. Calin MA, Parasca SV. Light sources for photodynamic inactivation of bacteria. *Lasers Med Sci*. 2009;24(3):453-60.
108. Lustig RA, Vogl TJ, Fromm D, Cuenca R, Alex Hsi R, D'Cruz AK, et al. A multicenter Phase I safety study of intratumoral photoactivation of talaporfin sodium in patients with refractory solid tumors. *Cancer*. 2003;98(8):1767-71.
109. Chen J, Keltner L, Christophersen J, Zheng F, Krouse M, Singhal A, et al. New technology for deep light distribution in tissue for phototherapy. *Cancer J*. 2002;8(2):154-63.
110. Soler AM, Angell-Petersen E, Warloe T, Tausjo J, Steen HB, Moan J, et al. Photodynamic therapy of superficial basal cell carcinoma with 5-aminolevulinic acid with dimethylsulfoxide and ethylenediaminetetraacetic acid: a comparison of two light sources. *Photochem Photobiol*. 2000;71(6):724-9.
111. Plaetzer K, Krammer B, Berlanda J, Berr F, Kiesslich T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med Sci*. 2009;24(2):259-68.
112. Juzeniene A, Nielsen KP, Moan J. Biophysical aspects of photodynamic therapy. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2006;25(1-2):7-28.
113. Allison RR, Downie GH, Cuenca R, Hu XH, Childs CJ, Sibata CH. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2004;1(1):27-42.
114. O'Connor AE, Gallagher WM, Byrne AT. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 2009;85(5):1053-74.
115. Gomer CJ. Preclinical examination of first and second generation photosensitizers used in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 1991;54(6):1093-107.
116. Josefsen LB, Boyle RW. Photodynamic therapy: novel third-generation photosensitizers one step closer? *Br J Pharmacol*. 154. England2008. p. 1-3.

117. Detty MR, Gibson SL, Wagner SJ. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *J Med Chem.* 2004;47(16):3897-915.
118. Allison RR, Sibata CH. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2010;7(2):61-75.
119. Milgrom LR. *The Colours of Life: An introduction to the chemistry of porphyrins and related compounds.* Oxford: Oxford University Press; 1997.
120. Carvalho VCM, Melo CAS, Bagnato VS, Perussi JR. Comparison of the Effects of Cationic and Anionic Porphyrins in Tumor Cells under Illumination of Argon Ion Laser. *Laser Phys.* 2002; 12(10):1314-9.
121. Galkin M, Ivanitsia V, Ishkov Y, Galkin B, Filipova T. Characteristics of the *Pseudomonas aeruginosa* PA01 Intercellular Signaling Pathway (Quorum Sensing) Functioning in Presence of Porphyrins Bismuth Complexes. *Pol J Microbiol.* 2015;64(2):101-6.
122. Fidalgo-Marijuan A, Amayuelas E, Barandika G, Bazan B, Urtiaga MK, Arriortua MI. Coordination and crystallization molecules: their interactions affecting the dimensionality of metalloporphyrinic SCFs. *Molecules.* 2015;20(4):6683-99.
123. Alves E, Costa L, Carvalho CM, Tome JP, Faustino MA, Neves MG, et al. Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins. *BMC Microbiol.* 2009;9:70.
124. Trannoy L, Roelen D, Koekkoek K, Brand A. Impact of photodynamic treatment with meso-substituted porphyrin on the immunomodulatory capacity of white blood cell-containing red blood cell products. *Photochem Photobiol.* 2010;86(1):223-30.
125. Casteel MJ, Jayaraj K, Gold A, Ball LM, Sobsey MD. Photoinactivation of hepatitis A virus by synthetic porphyrins. *Photochem Photobiol.* 2004;80(2):294-300.
126. Kain W, Schwederski B. *Chemistry of Life: an introduction and guide* New York: John Wiley & Sons 1994
127. Pavani C, Uchoa AF, Oliveira CS, Iamamoto Y, Baptista MS. Effect of zinc insertion and hydrophobicity on the membrane interactions and PDT activity of porphyrin photosensitizers. *Photochem Photobiol Sci.* 2009;8(2):233-40.
128. Sibata CH, Colussi VC, Oleinick NL, Kinsella TJ. Photodynamic therapy in oncology. *Expert Opin Pharmacother.* 2001;2(6):917-27.
129. Patterson MS, Wilson BC, Graff R. In vivo tests of the concept of photodynamic threshold dose in normal rat liver photosensitized by aluminum chlorosulphonated phthalocyanine. *Photochem Photobiol.* 1990;51(3):343-9.
130. Tsujino I, Anderson GS, Sieber F. Postirradiation hyperthermia selectively potentiates the merocyanine 540-sensitized photoinactivation of small cell lung cancer cells. *Photochem Photobiol.* 2001;73(2):191-8.
131. Wilson BC, Patterson MS, Lilje L. Implicit and explicit dosimetry in photodynamic therapy: a New paradigm. *Lasers Med Sci.* 1997;12(3):182-99.
132. Huang Z, Xu H, Meyers AD, Musani AI, Wang L, Tagg R, et al. Photodynamic therapy for treatment of solid tumors--potential and technical challenges. *Technol Cancer Res Treat.* 2008;7(4):309-20.

## CAPÍTULO 2 – UTILIZAÇÃO DE PORFIRINAS NA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DO HERPESVÍRUS BOVINO 1 E NA FOTODEGRADAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

**\*Redigido de acordo com as normas da Revista Ciência Animal Brasileira.**

### Resumo

Uma série de fotossensibilizadores (PS), como porfirinas catiônicas e aniônicas *meso*-substituídas, são sintetizadas fim de se estudar o papel de anfifilicidade e da inserção de zinco na eficácia da inativação fotodinâmica (PDI). Neste estudo utilizamos duas porfirinas com cargas negativas: TPPS<sub>4</sub> e ZnTPPS<sub>4</sub>; e duas com cargas positivas: TMPyP e ZnTMPyP com intuito de avaliar a eficiência antiviral destas moléculas. Todos os PSs, em concentração não citotóxica (5 µM), apresentaram uma significativa inativação do Herpesvirus bovino 1 (BoHV-1) após a irradiação com um sistema de lâmpada halógena com uma intensidade de 130 W/cm<sup>2</sup>. As porfirinas catiônicas apresentaram melhores resultados quando comparadas com as aniônicas, além disso as porfirinas com zinco no anel central (porfirinas metaladas) apresentaram melhores resultados quando comparadas com as porfirinas não metaladas. Sendo assim, a ZnTMPyP foi a que apresentou o melhor resultado, conseguindo inativar totalmente o vírus após 30 minutos de irradiação, seguida pela TMPyP, ZnTPPS<sub>4</sub> e TPPS<sub>4</sub>. Além disso, analisamos a fotodegradação de um DNA plasmidial utilizando estes mesmos quatro fotossensibilizadores. A porfirina ZnTMPyP apresentou neste caso também o melhor resultado, conseguindo degradar o DNA após 30 minutos de irradiação.

**PALAVRAS-CHAVE:** BOHV-1, FOTOINATIVAÇÃO, MESO-PORFIRINAS, PORFIRINAS METALADAS

### USE OF PORPHYRINS IN THE PHOTODYNAMIC INACTIVATION OF BOVINE HEPESVIRUS 1 AND PHOTODEGRADATION OF PLASMIDIAL DNA

### Abstract

A series of photosensitizers (PS), which are cationic and anionic *meso*-substituted porphyrin, synthesized in order to study the role of amphiphilicity and zinc insertion in photodynamic inactivation (PDI) efficacy. In this study, we used two porphyrins with negative charges: TPPS<sub>4</sub>, and ZnTPPS<sub>4</sub>; and two with positive charges: TMPyP, and ZnTMPyP designed to evaluate the antiviral effectiveness of these molecules. At non-cytotoxic concentrations (5 µM), the studied compounds show significant antiviral activity of Bovine Herpesvirus 1 after irradiation with a halogen lamp system with an intensity of 130 W/cm<sup>2</sup>. The cationic porphyrins showed better results when compared with the anionic, furthermore porphyrins with zinc in the central ring (metallated porphyrins) showed better results when compared to the non- metallated porphyrins. Thus, ZnTMPyP showed the best results, fully inactivating the virus after 30 minutes of irradiation, followed by TMPyP, ZnTPPS<sub>4</sub> and TPPS<sub>4</sub>. In addition, we analyzed the photodegradation of a plasmid DNA using these same four photosensitizers. The porphyrin ZnTMPyP showed the best results, obtaining the degradation of DNA after 30 minutes of irradiation.

KEYWORDS: BOHV-1, PHOTOINACTIVATION, MESO- PORPHYRINS, METALLATED PORPHYRINS

## Introdução

A inativação fotodinâmica (PDI) é uma modalidade promissora para o tratamento de alguns tumores e doenças não malignas<sup>1-3</sup>. Este tratamento baseia-se na administração de fotossensibilizadores (PS), seguido pela irradiação com luz de comprimentos de onda específico, produzindo espécies reativas, tais como o oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ) e radicais que conduzem à destruição de tecidos e de patógenos<sup>4</sup>.

Como o  $^1\text{O}_2$  possui curta duração ( $10^{-6}$  a  $10^{-9}$  segundos), as estruturas celulares danificadas e os patógenos atingidos na PDI são aquelas que estão perto do local de formação do oxigênio singleto<sup>5-8</sup>. A seletividade da PDI baseia-se nas diferenças entre as concentrações do fotossensibilizador em tecidos normais e doentes e a na iluminação seletiva do local que está sendo tratado<sup>5,9</sup>.

Diferentes tipos de PS foram sintetizados e estudados como agentes da PDI: Pro- fármacos e derivados de porfirinas, clorinas, ftalocianinas e fenotiazinas<sup>10-12</sup>. Vale ressaltar que, a eficiência da fotoinativação depende da estrutura do fotossensibilizador, uma vez que diferentes PSs acumulam em diferentes partes da célula<sup>7,13</sup>.

Modificações na estrutura molecular da porfirina, como adição de zinco no anel, parece melhorar a eficiência da PDI. Esta substituição tem sido frequentemente utilizada para estabilizar o anel de porfirina, mantendo as propriedades fotofísicas necessárias para a PDI<sup>5,14</sup>.

Um bom fotossensibilizador é preferencialmente um composto puro com bandas de absorção relativamente elevadas e formação eficiente de oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ). Além disso, não deve possuir toxicidade na ausência de luz e ser eliminado do corpo de forma eficiente e rápida para evitar fotossensibilização de biomoléculas não consideradas como alvos<sup>15</sup>.

A inativação fotodinâmica já foi utilizada no tratamento de infecções virais, bacterianas, fúngicas e por protozoários, podendo ser utilizada também no controle de Herpesvírus bovino 1 (BoHV-1).

O BoHV-1 é um importante patógeno de bovinos e está associado a uma variedade de manifestações clínicas, incluindo doença respiratória (rinotraqueíte infecciosa bovina), doenças genitais (vulvovaginite pustular infecciosa ou balanopostite pustular infecciosa), infertilidade temporária e abortos em bovinos<sup>16</sup>. Este patógeno pertencente à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*<sup>17</sup>. Como outros alphaherpesvirus, o BoHV - 1 estabelece uma infecção latente nos gânglios do nervo sensorial

após infecção aguda, o qual pode ser periodicamente reativado e transmitido. Assim, a latência e reativação proporcionam meios adequados para a perpetuação do vírus na natureza<sup>18</sup>.

Desta forma, propõe-se a avaliação isolada de quatro fotossensibilizadores diferentes para a inativação fotodinâmica *in vitro* do Herpesvirus bovino 1. Para isso serão utilizadas a porfirina *meso*-tetrasulfonatofenil (TPPS<sub>4</sub>), porfirina *meso*-tetrametilpiridil (TMPyP) e suas formas metaladas com átomo de zinco em seu anel central.

## Material e Métodos

### Cepa viral e Titulação

O BoHV-1 (Vírus de referência Los Angeles - L.A.) foi multiplicado em células “Madin-Darby bovine kidney” (MDBK) cultivadas em meio mínimo essencial de Eagle (MEM-Sigma<sup>®</sup>) suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 6% e antibióticos usuais (penicilina e estreptomicina) em estufa com ambiente de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

O vírus foi titulado através de diluições na razão de 10 (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-10</sup>), sendo que cada diluição foi colocada em quatro orifícios de uma placa de microtitulação (*Maxisorp – Nunc – Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>), onde foi adicionada a suspensão de células. O título viral (Dose Capaz de Infectar 50% dos cultivos celulares - TCID<sub>50</sub>) foi estabelecido pela mais alta diluição que apresentou efeito citopático (ECP) em pelo menos 50% dos orifícios após 72 horas de incubação a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, sendo este acrescido de 0,25 correspondente a cada orifício a mais em que houve ECP, de acordo com o método de Spearman-Kärber<sup>19</sup>.

### Fotossensibilizadores

Foram utilizados quatro fotossensibilizadores diferentes, sendo dois aniônicos: porfirina *meso*-tetrasulfonatofenil (TPPS<sub>4</sub>) e porfirina *meso*-tetrasulfonatofenil de zinco (ZnTPPS<sub>4</sub>); e dois catiônicos: porfirina *meso*-tetrametilpiridil (TMPyP) e porfirina *meso*-tetrametilpiridil de zinco (ZnTMPyP).

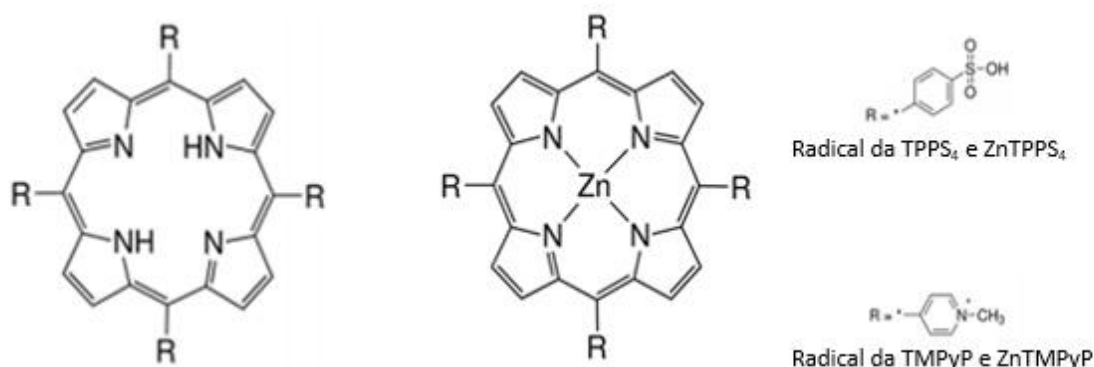


FIGURA 1 – Estrutura química da *meso*-porfirina e *meso*-porfirina metalada com zinco em seu anel central

Os quatro fotossensibilizadores foram adquiridos comercialmente (Porphyrin Inc.) e diluídos em Tampão fosfato-salino (PBS) autoclavado com pH 7,4 e a concentração das amostras foram verificadas através do espectrofotômetro LAMBDA 1050 UV/Vis/NIR spectrophotometer - PerkinElmer Inc. (Waltham, Massachusetts 02451, USA). A concentração de fotossensibilizador desejável para a realização de tal experimento foi de 5  $\mu$ M.

### Inativação fotodinâmica

O vírus utilizado apresentou titulação viral inicial de  $10^{5,75}$  TCID<sub>50</sub>/mL e foi incubado, separadamente, com os quatro fotossensibilizadores a uma temperatura de 37°C durante uma hora. Posteriormente, foram irradiados durante duas horas, empregando um sistema de irradiação constituído por uma lâmpada halógena (500 W), de baixo custo, emitindo em toda a região do visível do espectro eletromagnético, de 470 a 750 nm, com uma intensidade de 130 W/cm<sup>2</sup>. Para evitar o aquecimento das amostras, foi utilizado um filtro de água acoplado à saída da fonte e a temperatura foi monitorada durante todo o processo para dispensar a possibilidade da inativação viral ter acontecido pelo calor gerado pela fonte e não pela inativação fotodinâmica.

Durante as duas horas de irradiação, foram retiradas amostras a cada 15 minutos. Após a irradiação, todas as amostras foram novamente tituladas para verificar o título viral final.

Os experimentos foram realizados em quintuplicata em quatro ocasiões distintas em microplacas de 96 poços.

Como controle utilizamos o vírus sem qualquer tratamento (L-PS-), vírus com os diferentes fotossensibilizadores no escuro: L-PS+TPPS<sub>4</sub>, L-PS+ZnTPPS<sub>4</sub>, L-PS+TMPyP, L-

PS+ZnTMPyP; e vírus irradiado sem contato com nenhum dos fotossensibilizadores (L+PS-) para avaliar se ocorrerá a inativação do patógeno pela luz.

Para simular as mesmas condições, o grupo controle L-PS-, também foi colocado nos poços da placa de microtitulação em temperatura ambiente pelo mesmo tempo utilizado para a incubação e irradiação dos outros grupos. O experimento foi realizado à temperatura ambiente e no escuro a menos que indicado de outra maneira nos protocolos.

### **Avaliação do DNA após a fotoativação**

Primeiramente, as amostras de DNA plasmidial (aproximadamente 200 ng) foram incubadas com ZnTPPS<sub>4</sub>, TPPS<sub>4</sub>, ZnTMPyP ou TMPyP no escuro a 37°C durante 1 h. Na sequência, elas foram irradiadas durante três horas pelo mesmo sistema de irradiação constituído por uma lâmpada halógena, retirando alíquotas a cada 30 minutos. Posteriormente, a degradação do DNA foi monitorada pela eletroforese em gel de agarose. O princípio deste protocolo é baseado no fato da molécula de DNA possuir carga negativa em valores de pH neutro ou alcalino e conseqüentemente, quando aplicado ou imerso em uma matriz de gel submetida a um campo elétrico, migra em direção ao pólo positivo (ânodo) da cuba de eletroforese. A eletroforese foi feita durante duas horas a 100 V em gel de agarose a 1% em tampão TAE (Tris 0,04 M; 0,02 M de acetato de sódio; 0,001 M de EDTA; pH 7,2). Em seguida, o gel foi corado usando 1 mg/mL de brometo de etídio (*Sigma-Aldrich Co.*) e fotografado sob luz ultravioleta. Este experimento foi realizado à temperatura ambiente e na ausência de luz a menos que indicado de outra maneira.

### **Análise estatística**

Todos os dados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (SD). A análise da variação entre os grupos foi realizada utilizando o teste de Análise de variância (ANOVA) two-way, seguido de teste de Tukey. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## **Resultados**

Os resultados da inativação fotodinâmica do Herpesvirus Bovino 1 utilizando os fotossensibilizadores TPPS<sub>4</sub> e ZnTPPS<sub>4</sub> estão representados nas figura 2.

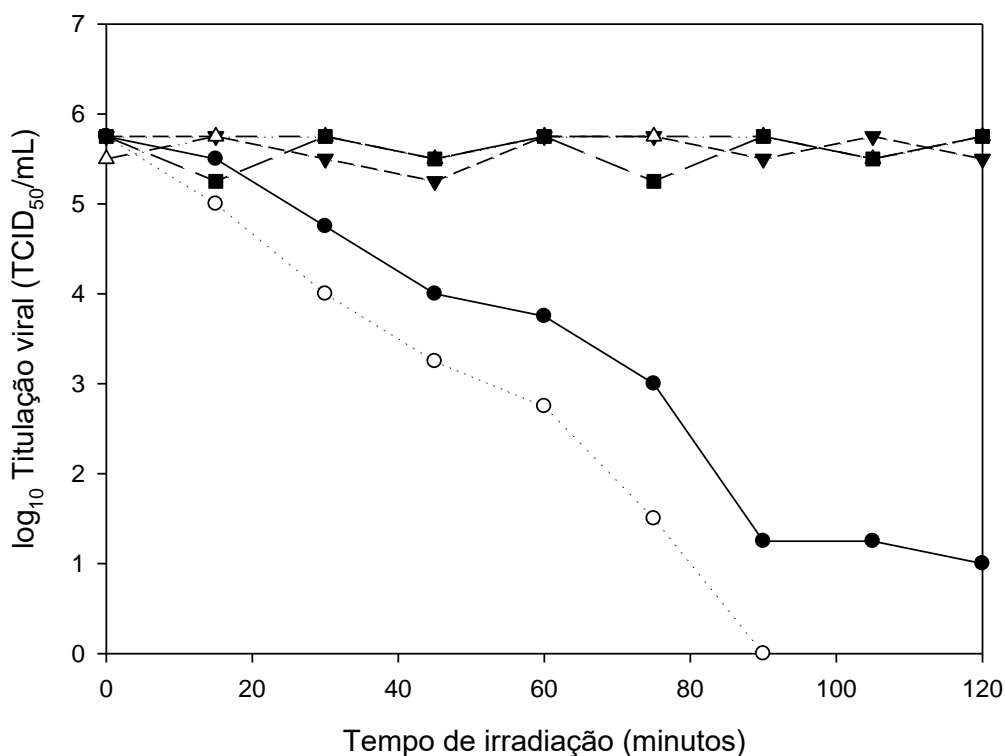


FIGURA 2 – Avaliação do título viral após a fotoinativação do BoHV-1 utilizando as duas porfirinas aniônicas durante 120 minutos de irradiação e seus respectivos controles (● TPPS<sub>4</sub>, ○ ZnTPPS<sub>4</sub>, ■ L-PS-, ▼ L-PS+TPPS<sub>4</sub>, ◇ L-PS+ZnTPPS<sub>4</sub>)

Pode-se considerar, que o vírus foi totalmente inativado pela ZnTPPS<sub>4</sub> com 90 minutos de irradiação. Apesar da TPPS não conseguir inativar totalmente o BoHV-1, ela se mostrou efetiva também no tratamento fotodinâmico de tal patógeno, uma vez que durante o tratamento, houve a redução de aproximadamente 5 logs na titulação viral.

Vale ressaltar que, nos grupos controles não houve redução da titulação viral durante todo o processo. Sendo assim, o emprego da luz na ausência dos fotossensibilizadores não possuiu efeito fototóxico. Além disso, os fotossensibilizadores sem contato com a luz não possuem efeito citotóxico.

As análises estatísticas mostraram que os fotossensibilizadores aniônicos apresentam diferenças significativas durante a inativação fotodinâmica. Indicando que a inserção do metal zinco no anel da porfirina garantiu melhores resultados na fotoinativação do BoHV-1.

Avaliamos também o desempenho das porfirinas catiônicas utilizando a mesma concentração e os mesmos tempos de irradiação das porfirinas aniônicas e obtivemos os seguintes resultados apresentados na figura 2.

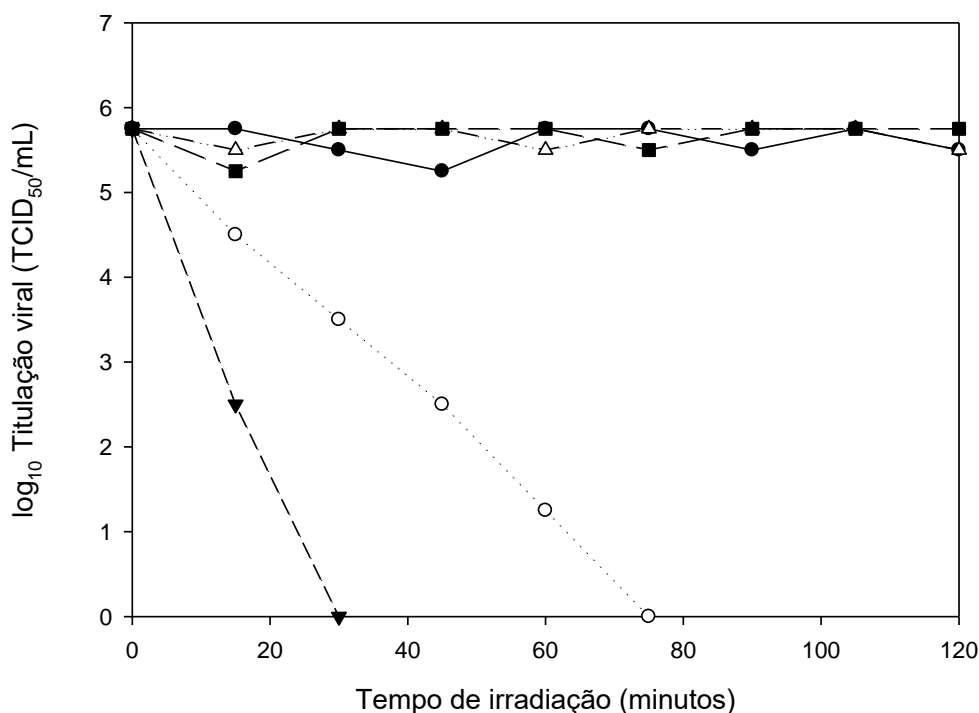


FIGURA 3 – Avaliação do título viral após a fotoinativação do BoHV-1 utilizando as duas porfirinas catiônicas durante 120 minutos de irradiação e seus respectivos controles (○ TMPyP, ▼ ZnTMPyP, ■ L-PS-, ● L-PS+TMPyP, △ L-PS+ZnTMPyP)

Quando utilizamos a ZnTMPyP obtivemos melhores resultados em um menor tempo de irradiação quando comparadas com a TMPP<sub>4</sub>. Ambas as porfirinas conseguiram inativar totalmente o vírus, porém a ZnTMPyP conseguiu com 30 minutos de irradiação, enquanto a TMPP apresentou o mesmo resultado com 75 minutos de irradiação. Neste caso também, os controles não apresentaram redução significativa na titulação viral.

As análises estatísticas realizadas, mostraram que houve diferença significativa entre os tratamentos com a TMPyP e a ZnTMPyP, assim como nas análises das porfirinas aniônicas, indicando novamente que a presença do zinco no anel central da porfirina garante melhores resultados na inativação fotodinâmica deste patógeno.

Quando comparamos os resultados e analisamos os dados entre as porfirinas aniônicas e catiônicas (TPPS<sub>4</sub> com TMPyP e ZnTPPS<sub>4</sub> com ZnTMPyP), observamos que as porfirinas catiônicas em ambos os casos, apresentaram melhores resultados quando comparadas com as aniônicas. Sendo assim, podemos afirmar que a carga das porfirinas interfere na inativação fotodinâmica do BoHV-1.

Feitas as análises estatísticas, percebemos que houve diferença significativa entre todas as porfirinas utilizadas. Ao analisarmos em conjunto as quatro porfirinas (Figura 4), percebemos

que o tratamento com a ZnTMPyP apresentou o melhor resultado e o tratamento com a TPPS<sub>4</sub> apresentou o pior resultado entre as quatro porfirinas utilizadas, apesar de ser também eficiente na fotoinativação do Herpesvirus bovino 1.

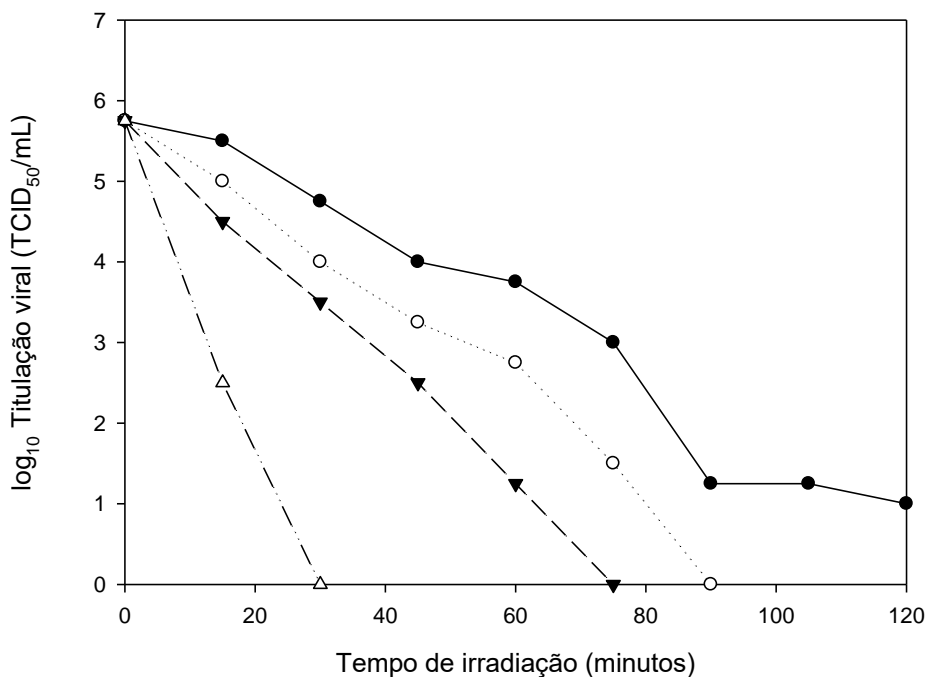


FIGURA 4 – Avaliação do título viral após a fotoinativação do BoHV-1 utilizando as quatro porfirinas durante 120 minutos de irradiação e seus respectivos controles (● TPPS<sub>4</sub>, ○ ZnTPPS<sub>4</sub>, ▼ TMPyP, ◇ ZnTMPyP)

A fotodegradação do DNA devido a utilização das quatro porfirinas na inativação fotodinâmica pode ser observada através da Figura 5. Podemos perceber que as amostras incubadas com TPPS<sub>4</sub> e ZnTPPS<sub>4</sub>, que foram irradiadas com a lâmpada halógena durante 3 horas, não apresentaram degradação no seu DNA. A amostra com TMPyP apresentou degradação total após 1 hora e 30 minutos de irradiação, enquanto a amostra incubada com ZnTMPyP apresentou o melhor resultado, após 30 minutos de irradiação o DNA foi totalmente degradado. Neste caso também, a ZnTMPyP apresentou melhores resultados quando comparadas com as outras três porfirinas.

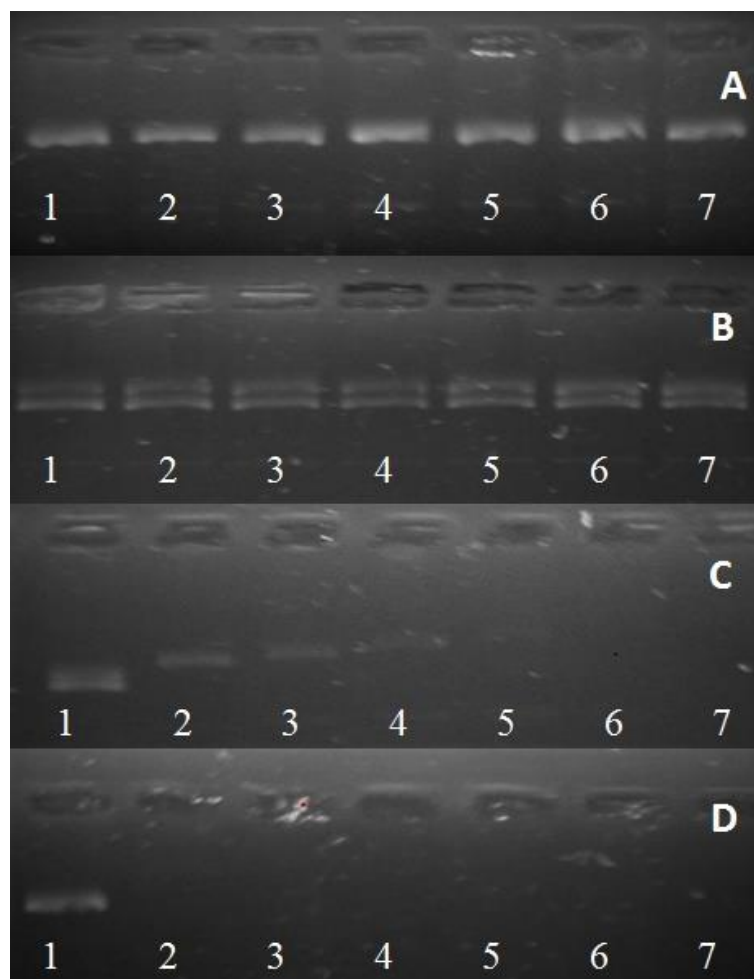


FIGURA 5- Efeito da fotodegradação do DNA plasmidial avaliado em gel de agarose. (A) DNA incubado com TPPS<sub>4</sub>. (B) DNA incubado com ZnTPPS<sub>4</sub>. (C) DNA incubado com TMPyP. (D) DNA incubado com ZnTMPyP. Tempo de irradiação da direita para a esquerda (1 ao 7), 0, 30, 60, 90, 120,150, 180 minutos, respectivamente.

### Discussão

A terapia fotodinâmica (PDT) tem se mostrado eficaz sendo aplicada com sucesso para o tratamento de degeneração macular, lesões de pele, câncer<sup>20</sup> e leishmaniose cutânea<sup>21</sup>. Além disso, estudos apresentaram resultados positivos contra fungos<sup>22</sup>, protozoários<sup>23</sup>, bactérias<sup>24</sup> e vírus<sup>25</sup> quando utilizaram a inativação fotodinâmica como tratamento. Através deste estudo comprovamos que a fotoinativação usando TPPS<sub>4</sub>, ZnTPPS<sub>4</sub>, TMPyP e ZnTMPyP, na concentração de 5 µM irradiados com lâmpada halógena com uma intensidade de 130 W/cm<sup>2</sup>, se mostrou eficiente contra o BoHV-1.

Atualmente, o controle visando diminuir a incidência da infecção por BoHV-1 nos animais susceptíveis dentro do rebanho é a forma utilizada para combater o BoHV-1, uma vez que não

há tratamento e a infecção é persistente nos rebanhos devido à presença de animais com infecção latente<sup>26</sup>. Com isso, estes resultados positivos sugerem uma possibilidade eficaz no tratamento deste patógeno utilizando a fotoinativação. Estudos utilizando aplicações intravenosas de PS estão sendo realizados apresentando resultados positivos, tornando a inativação fotodinâmica uma técnica promissora no tratamento de doenças sistêmicas<sup>27, 28</sup>.

Rocha et al. avaliaram a tolerância e segurança da utilização intravenosa do fotossensibilizador redaporfirin em camundongos com tumores de cólon implantados. Os animais toleraram o fotossensibilizador sem quaisquer danos até uma dose de 75 mg/Kg do fotossensibilizador. Além disso, não foram observadas anormalidades, incluindo reações no local da injeção ou fototoxicidade da pele mesmo quando os animais foram mantidos em condições de iluminação normal. Quando utilizaram este fotossensibilizador na dose de 1,5 mg/Kg irradiando com 74J/cm<sup>2</sup>, 83% dos animais apresentaram regressão completa do tumor<sup>29</sup>.

Zhou et al. trataram pacientes com papilomatose laringea, doença causada pelo *Papilloma virus* humano, utilizando aplicações intravenosas de cloridrato de ácido aminolevulínico (ALA) e irradiando com laser com comprimento de onda de 635 nm. O tratamento se mostrou totalmente eficiente, reduzindo o edema laríngeo pós-operatório e metástases intra-operatória<sup>30</sup>.

Para direcionar a ação danosa durante o tratamento, vários trabalhos demonstraram a viabilidade do acoplamento de fotossensibilizadores com anticorpos ou fragmentos de anticorpos monoclonais específicos contra determinado alvo<sup>31-36</sup>. Sendo assim, o fotossensibilizador interagiria mais facilmente com o BoHV-1 e facilitaria o seu tratamento.

Os resultados positivos do nosso trabalho possibilita também o tratamento de subprodutos animais, como sêmen, embriões e produtos de biotecnologia.

As porfirinas possuem uma forma cíclica fundida por quatro anéis pirrólicos, ligados por ligações metínicas (-CH-), e possui no seu centro um espaço apropriado para acomodar um íon metálico, que se ligam a quatro átomos de nitrogênio presentes no centro, formando assim as porfirinas metaladas<sup>37</sup>.

Pavani et al. estudaram fotossensibilizadores que tinham propriedades fotofísicas semelhantes e avaliaram a eficiência fotodinâmica das porfirinas metaladas com zinco em relação às não metaladas. Várias propriedades do PS foram avaliadas e comparadas, incluindo propriedades fotofísicas (espectros de absorção, rendimento quântico de fluorescência e de oxigênio singleto), captação por vesículas, mitocôndrias e células HeLa. Neste caso, perceberam que a presença do zinco no anel das porfirinas diminuiu a sua ligação com as mitocôndrias e aumentou a interação com as membranas celulares, gerando uma melhor eficiência de PDT.

Foi demonstrado que a fototoxicidade aumenta proporcionalmente com a eficiência da ligação à membrana, sendo assim, quanto maior a interação porfirina-membrana mais eficiente será a inativação fotodinâmica<sup>38</sup>. Tais resultados são concordantes com os nossos, uma vez que a ZnTMPyP e a ZnTPPS<sub>4</sub> apresentaram melhores resultados do que as suas porfirinas não metaladas.

Outro estudo analisando as diferenças nos valores dos rendimentos quânticos de oxigênio singleto e tripleto da TPPS<sub>4</sub> e ZnTPPS<sub>4</sub> mostrou que a ZnTPPS<sub>4</sub> apresentou um maior rendimento quântico de oxigênio singleto, sendo assim, mais eficazes do que a TPPS<sub>4</sub>(39). Mostrando mais uma vez que a inserção de zinco nas porfirinas melhoram a eficiência da fotoativação.

Um dos critérios para a utilização segura do PS é que ele não apresente nenhuma toxicidade no escuro<sup>40</sup>. Através deste estudo, percebemos que as quatro porfirinas utilizadas na concentração de 5 µM não apresentaram citotoxicidade quando incubadas com células em cultura (MDBK) na ausência de luz. Outro estudo realizado anteriormente utilizando TPPS<sub>4</sub> e TMPyP em cultivo de células humanas de tumor de laringe apresentou resultados semelhantes ao nosso utilizando a mesma concentração e o mesmo período de incubação (1 hora)<sup>41</sup>.

Esse mesmo estudo mostrou que ambas porfirinas não apresentaram diferenças significativas na sobrevivência de células quando irradiadas com luz visível com baixa intensidade (5 mW/cm<sup>2</sup>). Porém, quando aumentaram a intensidade (75 mW/cm<sup>2</sup>) a TPPS<sub>4</sub> apresentou uma eficácia maior 60% do que a TMPyP<sup>41</sup>. Tais resultados são discrepantes ao nosso, uma vez que a TMPyP apresentou melhores resultados do que a TPPS<sub>4</sub> na inativação do BoHV-1, evidenciando que diferenças na composição das biomoléculas do alvo desejado interfere na maior ou menor interação química com os fotossensibilizadores, o que reflete uma maior ou menor eficiência da PDI. Outro fator que pode ter interferido nesta diferença é a intensidade da luz utilizada, uma vez que usamos uma intensidade muito maior (130 W/cm<sup>2</sup>).

Merchat et al. e Nitzan et al. mostraram que a porfirina aniônica TPPS<sub>4</sub> é menos eficaz quando comparado com as porfirinas aniônicas no tratamento de células bacterianas. Os autores concluíram que este resultado se deve as interação eletrostática entre as cargas positivas das porfirinas catiônicas e as cargas negativas das paredes bacterianas<sup>42, 43</sup>.

Casteel et al. também avaliaram a eficácia das porfirinas TPPS<sub>4</sub> e TMPyP, só que diferente do estudo anterior, tratou o vírus da Hepatite A (RNA, fita simples, não envelopado), utilizou uma concentração de 0.01 mM e intensidade da luz de 2,2 mW/m<sup>2</sup>. Neste caso, o tratamento com a TMPyP apresentou melhor eficácia do que a TPPS<sub>4</sub>. Os autores também atribuíram este resultado a atração eletrostática entre as porfirinas catiônicas e os capsídeos virais carregados negativamente<sup>44</sup>.

No presente estudo, esse comportamento também aparece quando inativamos o BoHV-1, porém este vírus possui uma fita dupla de DNA e possui envelope viral que, diferente do vírus da Hepatite A, não apresentam cargas mostrando que podem existir outros fatores que favorecem a interação entre as porfirinas catiônicas e o vírus. Nossos achados reitera o fato de que estes fotossensibilizadores atuam de formas diferentes de acordo com o patógeno a ser tratado, concentração do fotossensibilizador e a intensidade da luz utilizada na irradiação.

A escolha de um DNA plasmidial para a avaliação dos efeitos fotodegradantes se deu pela semelhança estrutural da molécula fita dupla com o DNA viral também fita dupla de DNA. Inicialmente tentativas de extração do DNA de BoHV-1 foram feitas sem sucesso em termos de concentração suficiente para visualização em gel de agarose (dados não demonstrados).

Analisando o resultado da degradação do DNA, percebemos que a eficácia dos dois PS aniônicos (TPPS<sub>4</sub> e ZnTPyPS) foram menores comparados aos catiônicos (nenhuma degradação observada até 3 horas de irradiação). Atribuímos os resultados aos grupos fosfatos carregados negativamente presentes nos nucleotídeos componentes do DNA. Interações eletrostáticas de repulsão poderiam estar associadas a baixa interação entre PS e DNA prejudicando a ação das ROS sobre a biomolécula.

O TMPyP e ZnTMPyP são fotossensibilizadores catiônicos, o que provavelmente facilitou a interação eletrostática com o DNA plasmidial. A amostra de DNA incubada com TMPyP apresentou degradação total após 90 minutos de irradiação, enquanto a ZnTMPyP apresentou a fotodegradação após 30 minutos de irradiação, sugerindo que a inserção do zinco no anel central das porfirinas tem também um papel importante para a eficácia da fotodegradação do DNA.

No gel é perceptível também que quanto maior o tempo de contato entre a TMPyP e o DNA, mais moléculas aderem a este. Com isso, mais cargas positivas atuam no DNA, fazendo com que haja um menor arraste no gel devido as cargas positivas da porfirina se repelirem do polo positivo da cuba de eletroforese, como mostra na Figura 5-C.

Analisando os resultados tanto da inativação fotodinâmica do BoHV-1 quanto a fotodegradação do DNA, percebemos que nestes casos as cargas das porfirinas são mais relevantes do que a inserção de zinco no anel das porfirinas, visto que as porfirinas catiônicas apresentaram melhores resultados do que as porfirinas aniônicas mesmo quando estas eram metaladas com zinco.

A simples degradação das biomoléculas constituintes de envelope ou capsídeos virais não garante a eliminação completa do vírus. O genoma liberado dentro da célula poderia, por meio da integração ao genoma ou expressão independente da integração no caso específico para os BoHV1, ser ativado para expressão de genes virais e formação de novas partículas

virais infectantes. Desta forma a inativação viral utilizando os fotossensibilizadores descritos neste trabalho fazem uma “limpeza” completa nas amostras tratadas, na medida que tanto o vírus quanto seu DNA estariam sendo degradados e inviabilizados, impossibilitando permanentemente a reprodução do vírus na célula.

## Conclusão

A inativação fotodinâmica do Herpesvirus bovino 1 se apresentou eficiente para as quatro porfirinas utilizadas neste estudo: TPPS<sub>4</sub>, ZnTPPS<sub>4</sub>, TMP<sub>γ</sub>P e ZnTMP<sub>γ</sub>P, porém devido a presença do zinco no anel central de duas destas porfirinas (ZnTPPS<sub>4</sub> e ZnTMP<sub>γ</sub>P) fez com que elas apresentassem melhores resultados quando comparadas com as suas respectivas porfirinas não metaladas.

Além disso, as cargas das porfirinas são um importante parâmetro na inativação de um patógeno, o melhor fotossensibilizador a ser utilizado deve ser estudado para cada agente patogênico, ajustando a dose, o tempo de irradiação, fonte de luz e intensidade da luz utilizada em cada protocolo. Concluímos também, que as porfirinas catiônicas apresentaram melhores resultados quando comparadas com as aniônicas na inativação fotodinâmica do Herpesvirus bovino 1.

Estas conclusões foram baseadas unicamente em testes *in vitro* e, portanto, devem ser confirmadas em estudos com animais e/ou em protocolos clínicos.

## Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudos e pelo apoio financeiro a esse projeto.

## Referências

1. Chu CK, Tu YC, Hsiao JH, Yu JH, Yu CK, Chen SY, et al. Combination of photothermal and photodynamic inactivation of cancer cells through surface plasmon resonance of a gold nanoring. *Nanotechnology*. 2016;27(11):115102.
2. Al-Qahtani A, Alkahtani S, Kolli B, Tripathi P, Dutta S, Al-Kahtane AA, et al. Aminophthalocyanine-mediated photodynamic inactivation of *Leishmania tropica*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016.

3. Carpenter BL, Situ X, Scholle F, Bartelmess J, Weare WW, Ghiladi RA. Antiviral, Antifungal and Antibacterial Activities of a BODIPY-Based Photosensitizer. *Molecules*. 2015;20(6):10604-21.
4. Grimm S, Mvondo D, Grune T, Breusing N. The outcome of 5-ALA-mediated photodynamic treatment in melanoma cells is influenced by vitamin C and heme oxygenase-1. *Biofactors*. 2011;37(1):17-24.
5. Calzavara-Pinton PG, Venturini M, Sala R. Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: Photochemistry and photobiology. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2007;21(3):293-302.
6. Kochevar IE, Lynch MC, Zhuang S, Lambert CR. Singlet oxygen, but not oxidizing radicals, induces apoptosis in HL-60 cells. *Photochem Photobiol*. 2000;72(4):548-53.
7. Kessel D, Luo Y, Deng Y, Chang CK. The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 1997;65(3):422-6.
8. Cernay T, Zimmermann HW. Selective photosensitization of mitochondria by the lipophilic cationic porphyrin POR10. *J Photochem Photobiol B*. 1996;34(2-3):191-6.
9. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbek M, et al. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90(12):889-905.
10. Vena FC, Turchiello RF, Laville I, Pigaglio S, Blais J, Tedesco AC. 5-aminolevulinic acid ester-induced protoporphyrin IX in a murine melanoma cell line. *Lasers Med Sci*. 2004;19(2):119-26.
11. Shamsudin N, Tan AL, Wimmer FL, Young DJ, Tiekink ER. Crystal structure of bis-[(phenyl-methanamine-kappaN)(phthalocyaninato-kappa(4) N)zinc] phenyl-methan-amine tris-olate. *Acta Crystallogr E Crystallogr Commun*. 2015;71(Pt 9):1026-31.
12. Gabrielli D, Belisle E, Severino D, Kowaltowski AJ, Baptista MS. Binding, aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions. *Photochem Photobiol*. 2004;79(3):227-32.
13. Ricchelli F, Franchi L, Miotto G, Borsetto L, Gobbo S, Nikolov P, et al. Meso-substituted tetra-cationic porphyrins photosensitize the death of human fibrosarcoma cells via lysosomal targeting. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37(2):306-19.
14. He X, Zhou Y, Wang L, Li T, Zhang M, Shen T. Photophysical properties of amphiphilic porphyrins in different media. *Dyes and Pigments*. 1998;39(3):173-82.
15. Nyman ES, Hynninen PH. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 2004;73(1-2):1-28.
16. R.F. K. Infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis. *Viral diseases of cattle*. 2 ed. p. 159-70.
17. Muylkens B, Thiry J, Kirten P, Schynts F, Thiry E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet Res*. 2007;38(2):181-209.
18. Roizmann B, Desrosiers RC, Fleckenstein B, Lopez C, Minson AC, Studdert MJ. The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol*. 1992;123(3-4):425-49.
19. Thrusfield M. *Veterinary epidemiology*. 2.ed. ed. Oxford: Blackwell Science; 1999 p. 483p.
20. Gollnick SO, Evans SS, Baumann H, Owczarczak B, Maier P, Vaughan L, et al. Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation. *Br J Cancer*. 2003;88(11):1772-9.

21. Akilov OE, Kosaka S, O'Riordan K, Song X, Sherwood M, Flotte TJ, et al. The role of photosensitizer molecular charge and structure on the efficacy of photodynamic therapy against *Leishmania* parasites. *Chem Biol*. 2006;13(8):839-47.
22. Cormick MP, Alvarez MG, Rovera M, Durantini EN. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* sensitized by tri- and tetra-cationic porphyrin derivatives. *Eur J Med Chem*. 2009;44(4):1592-9.
23. Smith TG, Kain KC. Inactivation of *Plasmodium falciparum* by photodynamic excitation of heme-cycle intermediates derived from delta-aminolevulinic acid. *J Infect Dis*. 2004;190(1):184-91.
24. Mai B, Wang X, Liu Q, Leung AW, Xu C, Wang P. The antibacterial effect of sinoporphyrin sodium photodynamic therapy on *Staphylococcus aureus* planktonic and biofilm cultures. *Lasers Surg Med*. 2016.
25. Latief MA, Chikama T, Ko JA, Kiuchi Y, Sakaguchi T, Obana A. Inactivation of acyclovir-sensitive and -resistant strains of herpes simplex virus type 1 in vitro by photodynamic antimicrobial chemotherapy. *Mol Vis*. 2015;21:532-7.
26. Franco AC, Roehe PM. *Herpesviridae*. In: Flores EF, editor. *Virologia Veterinária*. 1 ed. Santa Maria: Editora UFSM; 2007. p. 433-88.
27. Jiang D, Gao X, Kang T, Feng X, Yao J, Yang M, et al. Actively targeting d-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate-poly(lactic acid) nanoparticles as vesicles for chemo-photodynamic combination therapy of doxorubicin-resistant breast cancer. *Nanoscale*. 2016;8(5):3100-18.
28. Azzouzi AR, Lebdaï S, Benzaghrou F, Stief C. Vascular-targeted photodynamic therapy with TOOKAD(R) Soluble in localized prostate cancer: standardization of the procedure. *World J Urol*. 2015;33(7):937-44.
29. Rocha LB, Schaberle F, Dabrowski JM, Simoes S, Arnaut LG. Intravenous Single-Dose Toxicity of Redaporfin-Based Photodynamic Therapy in Rodents. *Int J Mol Sci*. 2015;16(12):29236-49.
30. Zhou C, Sun B, Wang F, Dai Z, Han Z, Han J, et al. Coblation plus photodynamic therapy (PDT) for the treatment of juvenile onset laryngeal papillomatosis: case reports. *World J Surg Oncol*. 2014;12:275.
31. Bhatti M, MacRobert A, Henderson B, Shepherd P, Cridland J, Wilson M. Antibody-targeted lethal photosensitization of *Porphyromonas gingivalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(10):2615-8.
32. Jin I, Yuji M, Yoshinori N, Makoto K, Mikio M. Anti-tumor effect of PDT using Photofrin in a mouse angiosarcoma model. *Arch Dermatol Res*. 2008;300(4):161-6.
33. Smith K, Malatesti N, Cauchon N, Hunting D, Lecomte R, van Lier JE, et al. Mono- and tri-cationic porphyrin-mono-clonal antibody conjugates: photodynamic activity and mechanism of action. *Immunology*. 2011;132(2):256-65.
34. Bullous AJ, Alonso CM, Boyle RW. Photosensitizer-antibody conjugates for photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci*. 2011;10(5):721-50.
35. Jankun J. Protein-based nanotechnology: antibody conjugated with photosensitizer in targeted anticancer photoimmunotherapy. *Int J Oncol*. 2011;39(4):949-53.

36. Alonso CM, Palumbo A, Bullous AJ, Pretto F, Neri D, Boyle RW. Site-specific and stoichiometric conjugation of cationic porphyrins to antiangiogenic monoclonal antibodies. *Bioconjug Chem.* 2010;21(2):302-13.
37. D D. *Physical Chemistry*. New York, NY, USA: Academic Press; 1978.
38. Pavani C, Uchoa AF, Oliveira CS, Iamamoto Y, Baptista MS. Effect of zinc insertion and hydrophobicity on the membrane interactions and PDT activity of porphyrin photosensitizers. *Photochem Photobiol Sci.* 2009;8(2):233-40.
39. Mosinger J ZM. Quantum yields of singlet oxygen of metal complexes of meso-tetraalds (sulphonatophenyl) porphine *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry.* 1997;107:77-82.
40. Nowis D, Makowski M, Stoklosa T, Legat M, Issat T, Golab J. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochim Pol.* 2005;52(2):339-52.
41. Carvalho VCM, Melo CAS, Bagnato VS, R PJ. Comparison of the Effects of Cationic and Anionic Porphyrins in Tumor Cells under Illumination of Argon Ion Laser. 2002. p. 1314–9.
42. Merchat M, Bertolini G, Giacomini P, Villanueva A, Jori G. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria. *J Photochem Photobiol B.* 1996;32(3):153-7.
43. Nitzan Y, Balzam-Sudakevitz A, Ashkenazi H. Eradication of *Acinetobacter baumannii* by photosensitized agents in vitro. *J Photochem Photobiol B.* 1998;42(3):211-8.
44. Casteel MJ, Jayaraj K, Gold A, Ball LM, Sobsey MD. Photoinactivation of hepatitis A virus by synthetic porphyrins. *Photochem Photobiol.* 2004;80(2):294-300.

### **CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A inativação fotodinâmica *in vitro* do Herpesvirus bovino 1 se mostrou eficiente quando utilizamos as porfirinas TPPS<sub>4</sub>, ZnTPPS<sub>4</sub>, TMP<sub>γ</sub>P e ZnTMP<sub>γ</sub>P na concentração de 5 μM e irradiadas com lâmpada halógena com uma intensidade de 130 W/cm<sup>2</sup>.

Percebemos que as cargas dos fotossensibilizadores e a inserção de zinco no anel central alteram significativamente os resultados. Além disso, concluímos que cada patógeno se comporta de forma diferente perante a um fotossensibilizador. Então, a escolha da molécula orgânica para cada tipo de tratamento e microrganismos se torna de extrema importância para que a eficiência da fotoinativação seja maior.

Outro fator que interfere na eficiência da inativação é a luz utilizada e a sua intensidade, visto que os fotossensibilizadores reagem de forma diferente em cada tratamento. Sendo assim, faz-se necessário mais estudos para analisar os componentes que geram um melhor resultado contra determinado patógeno.

Futuramente, estas porfirinas poderão ser aprovadas e utilizadas no tratamento de animais infectados com Herpesvirus bovino 1 e as suas utilizações podem ser estendidas à materiais biológicos como sêmen, embriões e produtos de biotecnologia.

Para uma maior eficiência da utilização destes fotossensibilizadores na inativação do BoHV-1 também em subprodutos, nosso grupo de pesquisa está atualmente trabalhando na conjugação entre anticorpos e fotossensibilizadores (Ac-PS) para a fotoinativação do BoHV-1 em sêmen.