

**SUZANA MARIA GIANCOLI**

**PESQUISA DOS VÍRUS HERPES SIMPLES TIPO I E VÍRUS INFLUENZA  
EM NERVO FACIAL APÓS A INOCULAÇÃO DESTES VÍRUS NAS  
ORELHAS DE COELHOS**

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São  
Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina.

Área de concentração: Otorrinolaringologia  
Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Lazarini

São Paulo  
2006

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

*Aos meus pais, pelo amor e princípios preciosos para  
minha conquista.*

*Aos meus filhos, as melhores partes de mim, pelo amor  
e entendimento durante as fases mais difíceis.*

*Ao meu marido pelo incentivo e compreensão desde o  
primeiro momento.*

*À minha família, o bem maior da minha vida.*

“Não podeis percorrer duas vezes o mesmo rio.  
O rio muda de segundo a segundo,  
assim como a vida do homem que o percorre.  
A vida é transformação incessante.  
O que é, enquanto é não é, porque muda”.

Heráclito

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

c-DNA – DNA complementar de fita simples

CTAB – brometo de cetiltrimelamônio

DNA – ácido desoxirribonucléico

dNTP - -deoxiribonucleotídeo trifosfato

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

HSV – herpes simples virus

ICB – Instituto de Ciências Biomédicas

mg – miligrama

mL – mililitro

ng – nanograma

µl – microlitro

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAP – peroxidase anti-peroxidase

PB – Paralisia de Bell

PBS – solução salina tamponada (Phosphate buffer solution)

PCR – reação em cadeia pela polimerase (Polimerase Chain Reaction)

PFP – Paralisia Facial Periférica

RNA – ácido ribonucléico

rpm – rotações por minuto

RT – transcrição reversa (reverse transcription)

SDS – sodecil sulfato

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

URF – unidade reativa de fluorescência

USP – Universidade de São Paulo

VAS – via aérea superior

VI – vírus influenza

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>05</b>
<b>2.1. sobre o Vírus Herpes Simples tipo I .....</b>	<b>05</b>
<b>2.2. sobre o Vírus Influenza.....</b>	<b>15</b>
<b>3. OBJETIVO.....</b>	<b>20</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODO .....</b>	<b>21</b>
<b>4.1 Material .....</b>	<b>21</b>
4.1.1. Local .....	21
4.1.2. Animais .....	21
4.1.3. Vírus empregados.....	22
4.1.4. Medicamentos utilizados .....	22
4.1.5. Material cirúrgico .....	22
<b>4.2. Método .....</b>	<b>23</b>
4.2.1. Distribuição dos grupos .....	23
4.2.2. Conservação dos vírus .....	23
4.2.3. Técnica anestésico-cirúrgica empregada .....	24
4.2.4. Etapas do estudo .....	26
4.2.5. Técnica do PCR e GeneScan .....	28
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>29</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>6.1. Quanto ao animal escolhido.....</b>	<b>33</b>
<b>6.2. Quanto ao vírus estudado .....</b>	<b>34</b>
<b>6.3. Quanto à técnica cirúrgica e a do PCR empregadas .....</b>	<b>35</b>
<b>6.4. Quanto ao método aplicado .....</b>	<b>36</b>

<b>6.5. Quanto aos resultados obtidos.....</b>	<b>38</b>
6.5.1. Em relação ao VHS I.....	38
6.5.2. Em relação ao VI.....	40
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>45</b>
8.1. Anexo 1.....	45
8.2. Anexo 2.....	46
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>52</b>
<b><i>FONTES CONSULTADAS.....</i></b>	<b>56</b>
<b><i>RESUMO.....</i></b>	<b>57</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>58</b>

# 1. INTRODUÇÃO

A paralisia de Bell (PB) é uma doença que acomete o par craniano VII, tem instalação súbita e é considerada a forma clínica mais comum de paralisia facial periférica (PFP) (Takahashi et al, 2001). Sua incidência é de 20-30 casos em cada 100.000 pessoas (Davis, 1981).

A história natural desta afecção foi estudada por Peitersen (1982), com 1101 pacientes acompanhados por um período de 15 anos. O autor observou que 84% destes pacientes tiveram recuperação satisfatória (71% sem nenhuma seqüela e 13% com discreta assimetria facial) e 16% apresentaram recuperação incompleta da função motora facial, sendo que 4% ficaram com seqüelas incapacitantes, responsáveis por forte impacto e importante repercussão na saúde e na vida social do indivíduo.

Embora seja a causa mais freqüente de PFP, a etiologia da paralisia de Bell ainda é objeto de inúmeras teorias e questionamentos. Teoria mais aceita na literatura atual, a possibilidade desta paralisia ser decorrente de uma infecção viral fortemente fundamentada em estudos clínicos e experimentais (Kristensson,1970; Hill et al,1978; Ishi et al, 1988; Furuta et al,1998; Lazarini et al, 2006). Alguns vírus podem estar implicados na etiologia desta doença como o vírus do sarampo, da rubéola, o citomegalovírus, o Epstein-Baar e o vírus herpes simples tipo I (HSV-1) (Davis, 1981).

Considerando que as seqüelas motoras faciais decorrentes da PB podem ser temporária ou permanentemente incapacitante, é de grande interesse o desenvolvimento de estudos que possam investigar uma relação de causa-efeito entre infecção viral e a PB.

Em 1972, Kumagami sugeriu que o vírus HSV-1 poderia causar paralisia de Bell e, desde então, diversas pesquisas clínicas, sorológicas, imunológicas e morfológicas indicam que o HSV-1 seja o principal vírus envolvido, de forma direta ou indireta, como promotor de mecanismos de agressão ao nervo facial, nos casos de PB (Davis, 1981; Murakami et al, 1996b; Takahashi et al, 2001; Lazarini et al, 2006). Do mesmo modo, experimentos em animais foram capazes de demonstrar que a infecção pelo HSV-1 pode causar paralisia facial (Kristensson et al, 1978; Ishii et al, 1988; Murakami, 1996a; Wakisaka et al, 2002).

Este vírus, cujo genoma é formado por DNA de fita dupla, é considerado um patógeno neurotrópico do Sistema Nervoso Periférico (SNP) nos seus hospedeiros naturais, entre eles o ser humano (Tomishima et al, 2001). Sua porta de entrada no



organismo é a mucosa das vias aéreas superiores (VAS), conjuntiva ou pele, quando existe solução de continuidade (Trabulsi, 1986). Depois de multiplicar-se no local de entrada, dando origem ao quadro de infecção primária, o vírus pode disseminar-se por via hematogênica ou neurogênica, quando, por via retrógrada, caminhará ao longo dos nervos sensoriais até um gânglio sensorial, onde permanecerá em sua forma latente (inativo) e, numa eventual reativação, causaria uma neurite (Tomishima et al, 2002).

Os mecanismos básicos da infecção latente e recorrente do HSV-1, estudados em animais bem como sua observação em gânglios sensitivos no ser humano, estão mais bem estabelecidos (Tomishima et al, 2001). O vírus latente nestes gânglios pode se reativar e iniciar uma infecção nos neurônios do SNP ou nervos cranianos, quando o hospedeiro é submetido a uma situação de stress ou imunossupressão ou alteração metabólica (Tomishima et al, 2001), como se acredita que aconteça no gânglio geniculado e no nervo facial durante um quadro de PB (Sugita et al, 1995; Takahashi et al, 2001).

Corroborando com esta possibilidade, o HSV-1 foi detectado em amostras de fluido endoneural do nervo facial, na lágrima e na saliva de pacientes com PB (Murakami et al, 1996b; Furuta et al, 1998; Lazarini et al, 2006), bem como no gânglio geniculado de cadáveres em sua forma latente por Sugita et al (1995).

Enquanto a maioria dos estudos caminha em direção a uma afecção viral pelo HSV-1 como causa da PB, trabalhos científicos mais recentemente apresentados na literatura (Mutsch et al, 2004; Sendi et al, 2004; Zhou et al, 2004), relatam uma possível associação entre a PB e o vírus Influenza (VI), a partir da observação do aumento no número de casos da paralisia facial na população submetida à campanha de imunização contra a gripe.

Lu et al (1999), chamaram a atenção ao fato de que, ao desenvolverem uma vacina com uma cepa de vírus Influenza tipo A (H5N1) em ratos, detectaram a disseminação deste vírus para múltiplos órgãos, incluindo o tecido cerebral.

Mutsch et al (2004), ao realizarem um estudo sobre a eficácia de uma vacina intranasal inativada de VI, em uma população de uma cidade suíça, relataram que o número de casos de PB aumentou 19 vezes em comparação com a incidência desta doença na população não vacinada. O aumento da incidência de PB após vacinação para Influenza também foi observado por Sendi et al (2004), em torno de 0,7%, em estudo numa população de trabalhadores suíços que receberam uma dose de vacina intranasal.

Neste mesmo ano, Zhou et al revisaram os dados do Sistema de Registro de Efeitos Adversos por Vacinas (EUA), do período de 1991 a 2001, a fim de pesquisar se o uso de vacina parenteral inativada contra Influenza poderia aumentar o risco de PB.

Estes autores referiram que dos 197 casos de paralisia de Bell registrados, 78,2% foram confirmados e destes, 94,2% haviam recebido a vacina.

A facilidade de transmissão do VI, que se replica nas células epiteliais colunares ciliadas do sistema respiratório e, mistura-se às secreções respiratórias e se espalha em pequenas partículas de aerossol, confere a este vírus um caráter altamente infectante para o ser humano. Como responsável pelas grandes epidemias anuais de gripe e com o risco de pandemias, o desenvolvimento e o estudo de vacinas contra o VI tem sido amplamente difundido (Durigon, 2004).

Na prática clínica, observa-se que alguns pacientes com infecção pelo VI podem apresentar envolvimento do sistema nervoso, mas a sua relação com a PB é incerta. O transporte neural deste vírus de um tecido periférico, como a mucosa respiratória, para o SNC tem sido estudado em modelos animais, entretanto, embora haja evidências de uma associação entre o VI e o SNC (Davis, 1981; Matsuda et al, 2004; Matsuda et al 2005), o mecanismo de transmissão neural do VI ainda não está bem estabelecido (Matsuda et al, 2005).

A presença do VI no cérebro de ratos, após a sua inoculação intranasal, sugere que o mesmo se propague ao longo da célula nervosa, da mucosa nasal ao cérebro e gânglios sensitivos (Renaicher et al, 1983). Apesar destas evidências, não há na literatura referência quanto a uma possível associação direta do VI com o nervo facial, como amplamente demonstrado com o VHS I.

Sendo assim, baseados na premissa de que a infecção viral pode ter participação na etiopatogenia da lesão do nervo facial na PB, um ou mais vírus podem estar ali envolvidos, dentre eles o vírus Herpes Simples tipo I e o vírus Influenza.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Sobre o Vírus Herpes Simples tipo I

Teague, Goodpasture (1923) demonstraram que o HSV pode percorrer nervos de forma retrógrada e anterógrada. Estes autores provocaram uma escarificação na pele das orelhas de coelhos e porcos da Índia e inocularam o vírus em locais adjacentes. As áreas afetadas tornaram-se infectadas indicando que o vírus progrediu da área inoculada até o gânglio sensorial e então, por outras fibras sensoriais eferentes, o vírus poderia ter causado a inflamação.

Rabin et al (1968) demonstraram, em estudo com 300 ratos, que o HSV-1 tem capacidade de infectar rapidamente o nervo trigêmeo, após 1 a 2 dias de sua inoculação intranasal, realizada com uma agulha de ponta romba colocada na cavidade nasal e 0,02 cm<sup>3</sup> da solução injetada até ser observada sua presença na boca. A maioria dos animais morreu e do restante, dois ou três animais foram sacrificados entre 1 e 4 dias após a inoculação. A propagação neural retrógrada foi sugerida pelas evidências histológicas de encefalite na área de junção do nervo trigêmeo com o SNC. Também a microscopia eletrônica revelou a replicação do vírus, primariamente nas células de Schwann do nervo trigêmeo e nos neurônios do gânglio trigeminal.

Kristensson (1970) inoculou o HSV-1 em 71 ratos, via intradérmica (na pata traseira) e via intramuscular (no músculo gastrocnêmio) e fez análise histológica do nervo isquiático em diferentes níveis da medula espinhal e gânglios espinhais dorsais, por meio de microscopia eletrônica. Inoculou a pata traseira esquerda dos animais colocando uma gota de solução concentrada do vírus sobre a área escarificada com agulha. No 2º dia após inoculação e depois nos 4 dias seguintes, 2 ratos foram submetidos ao exame histológico. Alguns ratos apresentaram paresia da pata traseira esquerda no 4º dia; nos 5º e 6º dias alguns ratos morreram, alguns tiveram paresia de ambos os lados e cauda. A inoculação intramuscular foi realizada pela injeção de 0,03 mL da solução concentrada do vírus no músculo gastrocnêmio. Também dois ratos foram usados para análise histológica a cada três dias após inoculação. A maioria dos ratos apresentou sinais de paresia da pata esquerda no 2º dia; no 3º dia todos apresentaram paresia da pata traseira esquerda e no 4º dia, os animais morreram após desenvolverem paresia de ambas as patas traseiras e cauda. Após a inoculação intradérmica, as lesões seguiram as fibras sensitivas, enquanto que na inoculação intramuscular as lesões nas fibras motoras já

apresentavam um aspecto proeminente. Ultra-estruturalmente, as partículas do HSV-1 foram vistas nas células de Schwann destes tratos. O autor concluiu que o principal mecanismo pelo qual o vírus propaga-se é o transporte axonal.

Stevens & Cook (1972) demonstraram que o HSV-1 inoculado na pata de ratos propaga-se do sítio primário da infecção para o gânglio sensitivo, sendo que o título máximo de vírus é ali encontrado no 4º dia após, via nervos periféricos. Este título diminuiu no 7º dia após a infecção. Após um período inicial de infecção ativa nas células ganglionares, o vírus estabeleceu uma infecção latente neste local, observada por microscopia eletrônica, em gânglios de ambos os lados. Ele reapareceria após uma reativação e migraria, de forma anterógrada, ao longo do nervo para a pele. Cerca de 80% dos ratos tiveram paralisia em uma ou ambas patas nos 7º e 9º dias, a qual se restabeleceu, completamente 2 a 3 semanas após; o restante morreu de encefalite ou permaneceram paralisados. Encontraram o vírus no gânglio contra-lateral em aproximadamente metade dos animais, mas não o encontraram em outros tecidos como a medula oblonga e o tronco dos nervos isquiático direito e esquerdo. Os autores sugeriram que, nestes sistemas, a infecção latente está limitada ao gânglio espinhal.

Kumagami (1972) inoculou em coelhos diferentes vírus no forame mastóideo (dentro do canal do nervo facial), no espaço subaracnóideo, na artéria carótida comum e na cavidade timpânica, através da membrana timpânica. Durante o período de observação de 1 a 2 meses não encontrou alterações em animais inoculados com o VZV, vírus da parotidite, Influenza e adenovírus. Apenas os animais inoculados com o HSV-1 pelo forame mastóideo (16 dos 19 animais) desenvolveram PFP, entre o 3º e 6º dias após a inoculação. A paralisia manteve-se por um período de 223 dias. No exame histológico foi observado edema do nervo facial do lado inoculado, entre o 4º e 22º dias; partículas virais do HSV-1 foram visualizadas em várias partes do tecido destruído. Alguns animais desenvolveram crise labiríntica, a qual pode ser atribuída à passagem do vírus, ao longo do nervo facial e infiltração nos vasos sanguíneos da orelha interna, causando dano neste órgão. O autor não discute sobre os resultados encontrados pela inoculação realizada na orelha média, através da membrana timpânica.

Hill et al (1978) usaram a técnica de escarificação na pele da região retroauricular de ratos com infecção latente por VHS I para demonstrar a reativação da doença. Após observarem o estabelecimento da primoinfecção induzida pelo HSV-1 nas orelhas dos animais (vesículas), eles escarificaram a pele da região retro-auricular com agulha e notaram o reaparecimento das lesões.

Davis em 1981, a fim de determinar se viroses humanas poderiam infectar,

experimentalmente o nervo facial ou gânglio geniculado, usou seis diferentes tipos de vírus (HSV-1, rubéola, sarampo, reovírus e VI), inoculados em hamsters recém-nascidos pelas vias intracerebral, intralabiríntica (percutânea) ou intra-peritoneal. O nervo facial, o osso temporal e o gânglio geniculado foram analisados pela técnica de imunofluorescência e microscopia eletrônica para presença de infecção viral. Nenhuma diferença foi observada à imunofluorescência quando os animais foram inoculados pelas vias intra-cerebral ou intra-labiríntica. Entretanto, somente o reovírus infectou o gânglio geniculado após inoculação intra-peritoneal. O HSV-1 infectou o gânglio geniculado em 57% dos hamsters. Os antígenos virais foram primeiro detectados dois dias após inoculação e alcançou o máximo de intensidade no quinto dia. Os vírus da rubéola, o vírus do sarampo e reovirus infectaram os neurônios do gânglio geniculado, enquanto que a vacina infectou o estroma do nervo facial e do gânglio. O vírus Influenza não infectou nenhuma das duas estruturas.

Kristensson et al (1982) inocularam o HSV-1 em um dos lados do focinho de ratos e, após 3 ou 4 dias da inoculação, 6 ratos foram sacrificados e o local da inoculação do focinho, o gânglio trigêmeo e tronco cerebral foram dissecados. Observaram, pela técnica da peroxidase-antiperoxidase (PAP) o aparecimento deste antígeno viral em neurônios do gânglio trigeminal, núcleo trigeminal e formação reticular de ambos os lados. Estes achados indicaram que o vírus propagar-se-ia pelos axônios, passando por uma série de neurônios e neste percurso poderia alcançar núcleos vitais no tronco encefálico.

Itoyama et al (1984) inocularam o HSV-1 na córnea de ratos com uma gota de solução contendo o vírus e escarificaram o epitélio com agulha. Os animais foram sacrificados 2, 4, 6, 8, 10 e 14 dias após a inoculação e, utilizando a técnica da PAP, observaram a presença da imunoperoxidase em alguns neurônios isolados do gânglio trigeminal e em algumas células satélites. Esta técnica foi usada para estudar a distribuição dos antígenos do HSV-1 No gânglio do rato no período entre a infecção aguda e a transição para infecção latente, oito dias após a inoculação. Neste estudo, as células infectadas com antígenos virais encontravam-se confinadas à porção medial do gânglio, o que era compatível com o transporte retrógrado do vírus por axônios, uma vez que esta porção do gânglio contém os neurônios cujos prolongamentos periféricos correspondiam às terminações nervosas na córnea.

Nomura et al (1985) analisaram histologicamente o osso temporal de um porco após a inoculação do HSV-1 e do HSV-2 (pela janela redonda) e, depois de três dias, ciclofosfamida, via peritoneal, para induzir uma imunossupressão. Os autores encontraram os canais semicirculares e as rampas vestibulares preservados; inúmeros

linfócitos e monócitos dispersos; comprometimento da espira basal da cóclea; degeneração do órgão de Corti, com maior acometimento das células ciliadas externas, alterações das membranas tectórias e de Reissner; espessamento da estria vascular e diminuição das células ganglionares. Encontraram, ainda, a presença de anticorpos anti-HSV na orelha contra-lateral do porco, sem qualquer alteração morfológica da mesma, sugerindo uma possível labirintite viral latente devido à disseminação deste agente pela via hematogênica e/ou espaço perineural.

Ugolini et al (1987) usaram o HSV-1 como marcador transneuronal retrógrado por sua capacidade de ser transportado pelos axônios, em ambas as direções (anterógrada e retrógrada). Eles inocularam o vírus no tronco principal do nervo hipoglosso de 34 ratos, na altura do músculo digástrico e observaram sua distribuição no sistema nervoso, após os animais serem sacrificados, entre 3 e 6 dias após a inoculação. Escolheram este nervo por ser um nervo puramente motor e seus motoneurônios não possuírem axônios colaterais. Nenhum dos animais apresentou alteração neurológica. O estudo mostrou, por meio de microscopia eletrônica, uma extensa transferência transneuronal retrógrada do HSV, por meio dos axônios, dos motoneurônios do XII par craniano (neurônios de primeira ordem) para seus interneurônios pré-motores (neurônios de segunda ordem), e que a replicação deste vírus nos neurônios de segunda ordem produzia maior labilidade de muitas destas células.

Ishi et al (1988) investigaram as alterações do nervo facial pela inoculação do HSV-1 pelas vias naturais de infecção nas áreas periféricas inervadas pelo nervo facial (mucosa nasal, língua, músculos da mímica facial) em porcos da Índia (n=100), com métodos imunohistoquímicos e histopatológicos. Quando inocularam na mucosa nasal, língua e musculatura oral, os animais foram sacrificados entre 4 e 11 dias após a inoculação e não houve aparecimento de paralisia facial, mas o antígeno viral foi encontrado nestes tecidos, no nervo e gânglio trigeminal, no nervo facial e nervo petroso maior (próximo ao gânglio geniculado). Quando inocularam, na mucosa nasal (grupo I) e na língua (grupo II), sem uso de imunossupressor, encontraram o antígeno no nervo facial em 20-39% e na ponte em 40-72%. Nos grupos III (mucosa nasal) e IV (língua) com uso de imunossupressor, o número de casos positivos aumentou. Ao inocularem o HSV-1 nas orelhas, os autores não observaram paralisia facial, apesar da presença de lesões como erosões nas partes infectadas pelo vírus. Eles encontraram o HSV-1 com maior frequência no gânglio trigeminal do que no gânglio geniculado e, dentro do SNC, na ponte mais do que no nervo facial. Estes fatos sugeriram que a infecção pelo HSV-1 propagar-se-ia, facilmente, do SNP para o SNC.

Furuta et al (1992) avaliaram 15 gânglios geniculados e 16 gânglios trigeminais de oito adultos, sem história de PFP ou infecção por HSV, a fim de detectar o HSV-1 latente, pelas técnicas de imunohistoquímica e hibridização "in situ". Eles utilizaram como controle negativo o gânglio geniculado de um recém-nascido, e o positivo, amostra de tecido cerebral de um paciente com encefalite herpética. Os autores encontraram o HSV-1 em 71% dos gânglios geniculados e em 81% dos gânglios trigeminais, pela técnica de hibridização "in situ". Pela técnica de imunohistoquímica, os autores detectaram o antígeno do VHS I apenas no caso controle positivo. Eles sugeriram que o HSV-1 infecta o gânglio geniculado, sob as mesmas condições que acomete os demais gânglios sensoriais, mas os neurônios deste gânglio são mais suscetíveis, e a transcrição deste vírus latente deve ter um importante papel no seu processo de reativação.

Sugita et al (1995) detectaram antígenos do HSV-1 no nervo facial, gânglio geniculado e núcleo do nervo facial de 134 ratos submetidos à inoculação deste vírus na região retroauricular direita (n=104) e nos 2/3 anteriores da língua (n=30) com este vírus. Os animais inoculados desenvolveram paralisia facial transitória, simulando paralisia de Bell entre o 6º e o 9º dia, após a inoculação do vírus, a qual se manteve por um período de 3 a 7 dias quando então houve remissão espontânea. Os animais foram sacrificados entre o 6º e 20º dias após a inoculação do quadro. De acordo com o estudo histopatológico, o nervo facial do lado inoculado (direito) apresentou-se edemaciado em relação ao lado não afetado; não havia espaço entre o nervo facial e seu canal, e, nos animais que desenvolveram paralisia facial, observaram infiltração e degeneração vacuolar no núcleo motor do facial, gânglio geniculado e nervo facial. Pela técnica de imunofluorescência, a incidência do HSV-1 em 19 animais com paralisia facial foi 31,6% no núcleo motor do facial, 29,4% no gânglio geniculado e 26,3% no nervo facial.

Murakami et al (1996a) inocularam o HSV-1 na orelha direita de ratos e encontraram o genoma viral, pela técnica do PCR, no nervo facial do lado inoculado, no 3º dia após a inoculação; no 10º dia, encontraram o genoma em nervos faciais de ambos os lados e cérebro somente nos animais que desenvolveram paralisia facial. Naqueles que não desenvolveram paralisia, nenhum DNA viral foi encontrado nestes tecidos. Apesar de a paralisia ter se desenvolvido somente do lado inoculado, o DNA viral estava presente também no nervo facial contralateral.

Murakami et al (1996b) analisaram o fluido endoneural e amostras do músculo auricular posterior de 14 pacientes com PFP de Bell e 9 com Síndrome de Ramsay Hunt, todos submetidos à descompressão do nervo facial, 12 a 87 dias após a instalação da paralisia facial. Utilizaram a técnica do PCR para identificar a presença do HSV-1, do VVZ

(vírus da Varicela Zoster) e do EBV (Vírus Epstein Baar), no fluido endoneural do nervo facial e do tecido do músculo auricular posterior. A amostra de músculo do grupo controle foi coletada em cirurgias de timpanoplastias e de tumor de parótida na qual o nervo facial estava comprometido. Pela técnica do PCR, o HSV-1 foi detectado em 79% das PFP de Bell e em 89% dos pacientes com a síndrome de Ramsay Hunt. Nenhum dos vírus estudados pode ser amplificado nos pacientes do grupo controle. Estes autores concluíram que estes agentes mantêm-se provavelmente latentes nos gânglios, não podendo ser identificados no fluido endoneural ou no músculo, exceto se reativados.

Llorente et al (1997) inocularam o HSV-1 em 48 coelhos por três diferentes vias: 1) pela boca (n=10); 2) injetado na língua (n=18) e; 3) injetado no perineuro do nervo facial na sua entrada no forame mastóideo (n=14). Seis animais foram usados como controles. Alguns animais foram sacrificados após uma semana (técnica breve – TB) e outros após três semanas (técnica longa – TL). Nenhum dos animais apresentou paralisia facial, apesar dos animais inoculados apresentarem 100% de positividade de soroconversão. As culturas de macerado de nervo facial, gânglio geniculado e medula ipsilateral, foram negativas. Os autores encontraram o DNA do HSV-1, pela técnica de hibridização, em 40% do macerado de gânglio geniculado e de nervo facial para os animais do grupo inoculado na boca e da TB; todas as amostras do grupo TL foram negativas. Por outro lado, nos animais inoculados na língua e do grupo TB, as amostras de nervo facial e gânglio geniculado foram positivas em 45%; da medula, 89% das amostras do grupo TB foram positivas. As amostras do grupo TL foram negativas. Do grupo inoculado pelo forame mastóideo e pela TB, todas as amostras de nervo facial e gânglio geniculado foram negativas, enquanto 33% das amostras da medula foram positivas. Todas do grupo TL foram negativas. Concluíram que o fato do HSV ser encontrado no gânglio geniculado do nervo facial continua a suportar a possibilidade deste vírus como agente causal para paralisia facial, como uma doença única ou associada a outros sintomas.

Furuta et al (1998) utilizaram a técnica do PCR para avaliar a saliva de pacientes com paralisia facial de Bell, a fim de detectar a presença do HSV-1. O estudo envolveu 47 pacientes com paralisia, sendo 24 com Síndrome de Ramsay Hunt e 16 voluntários saudáveis soropositivos para o vírus HSV. O HSV-1 não foi detectado nas amostras de saliva dos pacientes soronegativos. A prevalência do vírus nos pacientes com paralisia de Bell (50%) foi significativamente maior do que a dos voluntários (19%). Quando as amostras de saliva foram testadas após 7 dias de instalada a paralisia, a prevalência do vírus nos pacientes com PB (40%) foi maior do que aqueles com Síndrome de Ramsay Hunt (7%). O antígeno torna-se indetectável a partir da segunda semana após a



instalação da paralisia de Bell. Estes achados sugeriram aos autores que a reativação do HSV-1 está envolvida na patogênese da PB e indica que o PCR é uma técnica útil no diagnóstico da reativação do vírus na paralisia de Bell.

Takahashi et al (2001) referem terem sido os primeiros a relatar o desenvolvimento de um modelo animal de paralisia facial induzida pela reativação do HSV-1. Estes autores inocularam o HSV-1 na superfície retroauricular direita de ratos pela escarificação desta região e observaram o aparecimento de PFP. Somente os ratos que desenvolveram a PFP, oito semanas após sua recuperação, foram utilizados para os seguintes procedimentos: 1) a região retroauricular previamente inoculada foi escarificada com agulha; 2) um anticorpo monoclonal foi inoculado intraperitonealmente ou; 3) ambos os procedimentos foram realizados juntos. Nenhum rato desenvolveu paralisia facial nos procedimentos 1 e 2. Em contraste, 20% dos animais do grupo 3 desenvolveram a paralisia sugerindo que o sinergismo entre a imunossupressão e a estimulação física (irritação da pele da região retroauricular de ratos) são requisitos para indução de paralisia de Bell por reativação do vírus.

Tomishima et al (2001) discutiram os mecanismos celulares desenvolvidos pelos alfa herpesvírus no seu ciclo dinâmico de vida. Os alfa herpes vírus, uma sub-família das herpesvírus são patógenos neurotrópicos hospedeiros da maioria dos mamíferos. Esses autores descreveram que após infecção dos tecidos o vírus entra no SNP próximo às terminações nervosas e o genoma viral é movido aos corpos celulares por um transporte axonal. Uma vez nos núcleos dos neurônios do SNP, o genoma viral pode ainda participar da infecção viral aguda ou infecção latente (pouca ou nenhuma expressão viral). Esta última é a regra durante a infecção do hospedeiro imunocompetente. Quando este encontra-se em estado de stress, o genoma latente pode reativar-se e iniciar uma infecção nos neurônios do SNP. Inferem ainda que este vírus pode se propagar de forma anterógrada e retrógrada pelos axônios

Abico et al (2002) colheram 244 amostras de saliva das glândulas submandibular (72 amostras) e parótida (96 amostras) de ambos os lados, além de lágrima (76 amostras), em várias fases da evolução clínica, de 16 pacientes com PFP de Bell, ainda não tratados, a fim de examinar quantitativamente a presença do genoma do HSV, pelas técnicas de PCR e de hibridização *in situ*. Eles compararam os resultados com 36 amostras de um grupo controle de seis pacientes saudáveis. Todos os pacientes apresentaram positividade para anticorpos anti-HSV no teste sorológico (teste de imunoensaio enzimático), mas nenhuma amostra dos indivíduos saudáveis evidenciou a presença do DNA do HSV. A presença do DNA do HSV identificado em cinco dos 16

pacientes com PFP (31%), correspondendo a 15,6% das amostras, principalmente no lado afetado (16,7% na lágrima; 18,4% na saliva da glândula parótida; 11,1% da submandibular). A presença do DNA foi confirmada pela técnica de hibridização. Os autores não encontraram diferenças significativas quanto à clínica do paciente entre os grupos que apresentaram positividade para o teste e os que não, mas observaram que, com a evolução clínica, a positividade do DNA do HSV diminuiu, significativamente, nos três tipos de material colhido. Concluíram que o DNA do HSV era secretado em associação direta com a PFP e que a reativação deste vírus estava relacionada à patogênese da doença, geralmente maior do lado afetado pela afecção, porém nem todos os casos foram causados por esta reativação, visto que em 11 dos 16 pacientes com PFP não se identificou a presença do HSV.

Wakisaka et al (2002), usaram a técnica da imunofluorescência com anticorpo anti-HSV-1, observaram o tempo de propagação e os sítios de replicação do vírus HSV-1 no nervo facial. Após a inoculação deste vírus em região retroauricular direita de 120 ratos pela técnica de escarificação, a cada dia seis ratos eram sacrificados para análise de seus nervos faciais e gânglio geniculado, pela técnica de microscopia eletrônica. Estes autores concluíram que a paralisia facial, que apareceu no 7º dia após a inoculação em mais de 60% dos animais neste modelo, era causada, principalmente, pela desmielinização das fibras nervosas do nervo facial e que o transporte do vírus seria intra-axonal, não somente nos nervos sensoriais, como também no nervo motor.

Lazarini et al (2006) estudaram 38 portadores de PFP de Bell durante a primeira semana de evolução e compararam-nos a um grupo controle de 10 indivíduos eutróficos. Supondo ser o HSV-1 um dos possíveis agentes etiológicos desta doença, os autores tiveram como objetivo observar a prevalência deste vírus na saliva destes pacientes pela técnica do PCR, relacionando-a, inclusive, com a evolução clínica dos casos (eletroencefalografia e grau de paralisia). Em nenhum caso do grupo controle o HSV-1 foi detectado, mas no grupo afetado, 29% mostraram-se positivos numa amostra de saliva coletada nesta primeira semana de evolução. Os autores concluíram que a presença do HSV-1 na saliva dos portadores de PFP indicaria uma reativação viral e, assim, possível causa da afecção, mas este achado não influenciaria na recuperação da doença. Quanto ao acometimento axonal, embora não houvesse diferenças estatisticamente significativas nos resultados da eletroencefalografia entre os grupos com PCR positivo e negativo, a evolução clínica mostrou-se pior nos pacientes em que o HSV-1 foi detectado na saliva.

## 2.2. Sobre o Vírus Influenza

Reinacher et al (1983) realizaram um estudo comparativo da patogênese da infecção do SNC pelo VI A humano neurovirulento, com uma cepa variante recombinante de vírus humano e aviário, e também a capacidade destes em se replicarem nas células nervosas, após inoculação intranasal, intraperitoneal e intracerebral. Títulos altos dos vírus aviário e recombinante foram encontrados nos tecidos entre os dias 8 e 10 e dia 4, respectivamente, após a inoculação intranasal. O vírus humano não se replicou no cérebro mesmo após inoculação intra-cerebral. Em contraste, o vírus recombinante replicou-se com títulos altos no pulmão e cérebro com viremia após inoculação, pelas três vias utilizadas. Diferentes tipos de células no cérebro foram infectadas como os neurônios do bulbo olfatório, do gânglio trigeminal e do tronco cerebral. A inoculação intranasal sugere que a via de entrada do vírus para o cérebro foi pela propagação ao longo das células nervosas da mucosa nasal para o cérebro e gânglio trigeminal, e subsequente propagação perivenosa após viremia seguida da replicação no pulmão. Os autores acreditam que o VI mutante (recombinante) foi capaz de propagar-se ao longo das células nervosas, a partir da mucosa nasal (via natural de infecção) para o cérebro e o gânglio trigeminal.

Shinya et al (1998) inocularam em ratos dois tipos de VI A, um mais (24<sup>a</sup>5b) e outro menos (4e) virulento, via intranasal. Os ratos do grupo 4e não apresentaram nenhum sinal clínico ou lesão cerebral. Quatro ratos do grupo 25<sup>a</sup>5b foram submetidos à necrópsia entre os dias 5 e 7 após inoculação e observou-se intenso processo inflamatório no tronco encefálico e cerebelo. O antígeno do VI foi detectado em neurônios, células gliais e endotélio vascular nas lesões. A distribuição destas lesões parece indicar invasão transneuronal do vírus, via fibras nervosas dentro do encéfalo.

Lu et al (1999) estudaram a patogênese do VI A, a partir de um modelo animal e com utilização de método imunohistoquímico. Inocularam ratos com o vírus, via intranasal, e observaram, 4 a 6 dias após a inoculação, a grande presença destes vírus nas células gliais e neurônios. Este modelo animal também foi usado para avaliar uma estratégia de vacinação contra uma virose altamente patogênica do vírus H5N1, usando vacina de vírus atenuado. Os animais foram inoculados, via intramuscular e 70% deles apresentaram proteção contra a infecção.

Buchman e Frigien (2000) investigaram o efeito do VI A e como ele se relaciona com a patogênese da otite média. Estes autores coletaram mucosa da orelha média em cirurgias de pacientes submetidos à implante coclear ou cirurgia de base de crânio (2 mm<sup>2</sup>

de mucosa do promontório). Esta mucosa foi imediatamente colocada em meio de cultura próprio. As características das células foram analisadas antes e depois da exposição ao VI tipo A, pelas técnicas da imunofluorescência e transcrição reversa – PCR. Os resultados positivos dos testes demonstraram que vírus foi capaz de infectar as células epiteliais da mucosa da orelha média.

No ano seguinte, Nishimura et al (2000) encontraram antígenos do VI A (H5N1) em neurônios e células endodimais de cortes de cérebro e medula espinhal de ratos, após a inoculação dos mesmos, via intranasal, com solução contendo este vírus. Todos os animais desenvolveram encefalite e broncopneumonia. Os órgãos dos animais foram submetidos às análises histopatológica e imunohistoquímica para o vírus no 1º, 4º e 7º dias. Os resultados dos testes imunohistoquímicos foram positivos para os antígenos virais em fibras do músculo cardíaco, fígado, baço e tecido adiposo.

Shinya et al (2000) inocularam o VI A (H5N3) em 60 ratos por duas vias distintas (via intranasal e via endovenosa) a fim de definirem a rota de invasão do vírus para o SNC. Quatro animais de cada grupo foram sacrificados entre o 1º e 7º dias após inoculação. Para o estudo imunohistoquímico foram coletados fígado, baço, rins, pulmões, pâncreas cérebro, mucosa nasal e gânglios trigeminal, geniculado e vagal do grupo inoculado via intranasal. Os animais do grupo inoculado via intranasal deprimiram no 5º dia, enquanto os animais do grupo inoculado via intravenosa não apresentaram alteração. Somente o grupo inoculado via intranasal mostrou o aparecimento de encefalite não supurativa restrita ao tronco, entre o 4º e 7º dias pós-inoculação. Os cérebros dos ratos tinham altos títulos de vírus neste mesmo período. Antes do desenvolvimento das lesões no SNC, o antígeno viral foi detectado no gânglio trigeminal e vagal. Estes resultados sugeriram que o vírus replicou, primeiramente, na mucosa respiratória e ascendeu para o SNC, via nervos sensoriais.

O VI (HK 483) isolado de um paciente durante o surto de Influenza em Hong Kong mostrou-se ser neurovirulento em ratos segundo Park et al (2002). Ele foi inoculado em ratos, via intranasal, e as vias de invasão deste vírus para o SNC foram analisadas pelas técnicas de imunohistoquímica e hibridização “in situ”. Antígenos virais e ácido ribonucléico viral, tanto RNA quanto mRNA, foram encontrados nos gânglios pterigopalatino e trigeminal, simultaneamente com achados no SNC, bem como no bulbo olfatório. Estes achados indicaram que o vírus alcança o SNC pelas fibras aferentes dos nervos simpáticos, olfatório, vago e trigêmeo após a replicação na mucosa olfatória.

Joshua et al (2003) estudaram cultura de células de Schwann humana a fim de determinar se estas células poderiam ser infectadas pelo vírus Influenza A humano. Estes

autores expuseram a cultura de células de Schwann ao vírus e após 24, 48 e 72 horas após a exposição, submeteram a cultura aos testes imunocitoquímico e PCR para detecção do vírus. Encontraram uma taxa de 75-80% de células infectadas.

Tanaka et al (2003) estudaram o neurotropismo do VI Hong Kong (H5N1) e verificaram que as principais lesões encontradas nos animais eram pneumonia intersticial e encefalite não supurativa. Eles inocularam, via intranasal e parenteral, este vírus isolado de um ser humano infectado, em 75 ratos e analisaram amostras destes tecidos pelas técnicas histopatológica e imunohistoquímica. Infecção viral e/ou antígenos virais foram detectados no cérebro, bem como no gânglio trigêmeo e nervo vago 96-120 horas pós-inoculação. As principais lesões foram encontradas no trato respiratório e SNC. Na cavidade nasal, eles observaram moderada necrose das células epiteliais da mucosa e neutrófilos 24-48 horas após inoculação, bem como a presença de antígenos virais.

Matsuda et al (2004) inocularam o VI A em ambas as narinas de 25 ratos cujo nervo vago direito foi removido cinco dias antes da inoculação, e examinaram a distribuição da proteína viral e do genoma por método imunohistoquímico e teste de hibridização "in situ". Observaram uma distribuição assimétrica dos antígenos virais entre os gânglios vagais: o antígeno viral foi detectado no gânglio vagal do lado do nervo removido dois dias mais tarde do que o do lado intacto. O vírus, aparentemente, da mucosa respiratória alcançou o SNC diretamente e pela via de decussação das fibras do nervo vago, e centrifugamente para o gânglio vagal do lado do nervo removido. Os resultados deste estudo demonstraram que o VI neurotrópico percorre os nervos para o SNC, principalmente pelo nervo vago.

Mutsch et al (2004) observaram que, após o uso de vacina intranasal de VI vivo atenuado numa campanha em determinada população, o risco de PFP aumentou em 19 vezes entre os vacinados. Esta associação foi forte, temporal e específica. O risco foi maior durante o segundo mês após a vacinação intranasal; nenhum risco foi encontrado para a vacina de uso parenteral, segundo os autores.

No mesmo ano de 2004, Sendi et al avaliaram a incidência de efeitos adversos e sintomas da gripe em uma população de trabalhadores na Suíça que foi vacinada contra Influenza. A um total de 12.582 indivíduos com idade inferior a 65 anos foi oferecida a opção de vacina contra gripe por duas vias, injetável ou intranasal. Destes indivíduos, 1600 foram vacinados contra Influenza. Noventa e sete por cento optaram pela vacina intranasal e o restante 3% optou pela vacina injetável. A incidência de sintomas da gripe e efeitos adversos foi de 13% e 36%, respectivamente. Os indivíduos que receberam a vacina intranasal apresentaram mais efeitos adversos. A paralisia facial foi observada em

11 indivíduos, sendo o efeito adverso mais severo associado à vacina intranasal. Isto corresponde a uma incidência de 0,7%, a qual é maior do que a incidência espontânea de 0,02% -0,04% descrita na literatura.

Tomazelli, em 2004, a fim de detectar os vírus respiratórios mais comumente associados a infecções agudas do trato respiratório e traçar o seu perfil epidemiológico, utilizou um protocolo de GS RT-PCR (GeneScan Transcrição Reversa- Reação em Cadeia de Polimerase) para a rápida detecção simultânea do vírus Influenza A e B, para Influenza tipos 1, 2 e 3, picornavírus, metapneumovírus e o adenovírus. Esta técnica é de análise de fragmentos de DNA baseado na detecção automática de fluorescência durante a eletroforase em capilar, bastante utilizado em procedimentos que requerem muita precisão do tamanho e quantidade do produto de DNA. As amostras clínicas (aspirado de orofaringe) foram colhidas de crianças menores de cinco anos, apresentando sintomas respiratórios. O GeneScan RT-PCR se mostrou uma metodologia sensível e específica, capaz de detectar uma diversidade maior de agentes infecciosos do trato respiratório em relação à imunofluorescência indireta, reduzindo a porcentagem de amostras negativas de 69,9% (235 amostras) para 22% (74 amostras).

Zhou et al (2004) revisaram os registros do Sistema de Registro de Efeitos Adversos de Vacinas (órgão oficial dos Estados Unidos) para verificarem se a vacina de vírus Influenza tipo A atenuado, de uso parenteral, poderia aumentar o risco de paralisia de Bell, em 35 estados americanos. Os seus achados revelaram uma possível associação, uma vez que, dos 197 pacientes registrados com quadro de paralisia de Bell, 145 (94,2%) haviam recebido a vacina.

Matsuda et al (2005) usaram cultura de neurônios de ratos para comparar a transmissão transneuronal do VI A neurotrópico com o vírus da raiva humana, o qual apresenta neurotransmissão bem estabelecida. Ambos os vírus alcançaram os corpos celulares dos neurônios via axônio.

### **3. OBJETIVO**

O objetivo deste estudo é o de verificar a presença do vírus herpes simples tipo 1 e do vírus influenza nos nervos faciais, após a inoculação destes vírus nas orelhas média e externa direita de coelhos.

## 4. MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo foi submetido e aprovado pelas Comissões de Ética Médica para procedimentos em animais de experimentação da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (protocolo no.102) e do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (protocolo nº 69) (Anexo 1).

### 4.1 Material

#### 4.1.1. Local

Todo o trabalho experimental foi desenvolvido no Departamento de Virologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP).

#### 4.1.2. Animais

Foram utilizados quinze coelhos da raça Nova Zelândia, brancos, machos, sadios, pesando em média entre 1800 e 2000g. Estes animais foram mantidos em gaiolas especiais (com grade de metal) e alimentados com ração padrão (Primor) e água *ad libitum*, na temperatura ambiente de 22º C, com iluminação artificial produzida por lâmpada fluorescente (modelo luz do dia de 40 watts), sendo o fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, considerando o período de luz das 7:00 às 19:00 h, no Biotério do Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo.

Os animais foram mantidos por uma semana no biotério para adaptação, antes do início dos procedimentos. Todos os animais foram sacrificados ao término do estudo.

#### 4.1.3. Vírus empregados

**Vírus Influenza padrão:** A/SP/2/95 (H3N2) = (A/BEIJING/3353/89), de potência 1.000.000, diluído em solução PBS (solução salina tamponada), fornecido pelo Laboratório de Virologia da Divisão de Desenvolvimento Científico do Instituto Butantã.

**Vírus herpes simples tipo I** (amostra padrão McIntyre): cultivado em linhagem de



células Vero (linhagem de células de rim de macaco africano, obtidas do banco de células dos EUA e mantidas pela Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz), de potência 1.000.000 e colhido no 187<sup>o</sup> repique, fornecido pelo Departamento de Virologia do Instituto Adolfo Lutz.

#### **4.1.4. Medicamentos utilizados**

Anestésico: cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (0,5 mL / Kg de peso corporal) e cloridrato de Ketamina 10% (0,5 mL / Kg de peso corporal). A via utilizada para a administração destas drogas foi a via intramuscular.

Solução controle: PBS - solução salina tamponada estéril.

Medicamento para sacrifício dos animais: Cloreto de potássio 19,1% (1ampola/animal) para aplicação via intracardíaca.

#### **4.1.5. Material cirúrgico**

Todos os materiais cirúrgicos utilizados para os procedimentos eram descartáveis ou mantidos sob condições estéreis.

#### **4.1.6. Técnica do PCR e GeneScan**

O aparelho utilizado foi um Amplificador Automático de DNA ABI Prisma modelo 310 (APPLIED Biosystem).

## **4.2. Método**

### **4.2.1. Distribuição dos grupos**

Os quinze coelhos foram divididos em três grupos: grupo I (5), grupo II (5) e grupo III (5).

Os grupos foram organizados de acordo com o vírus inoculado nas orelhas média e externa direita e foram assim distribuídos:

- GRUPO I – Animais inoculados com o HSV-1
- GRUPO II – Animais inoculados com o VI
- GRUPO III – Animais controles, inoculados com PBS (solução salina tamponada).

### **4.2.2. Conservação dos vírus**

Os vírus foram mantidos em freezer -70 °C durante o período em que não estavam sendo utilizados. Os recipientes com o VI foram transportados do Instituto Butantã para o Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB-USP) sob refrigeração (gelo seco em isopor) num período inferior a 30 minutos. O mesmo procedimento foi realizado para o transporte do HSV-1, do Instituto Adolfo Lutz para o ICB-USP.

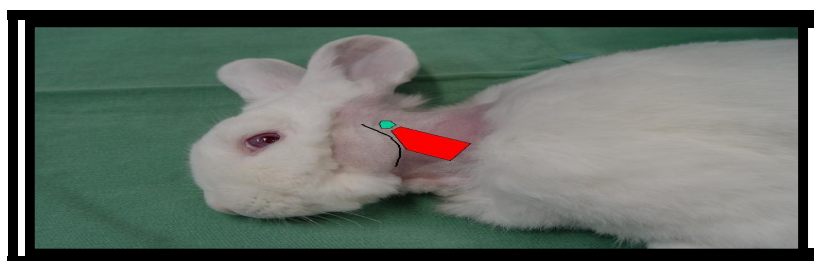
Os fragmentos do nervo facial colhidos nos procedimentos cirúrgicos realizados durante o experimento foram colocados imediatamente no meio de congelamento para vírus MEN (1mL de soro fetal bovino 10% e glicerol 1%) e neste meio mantidos em isopor contendo gelo seco (-70 graus) até o momento de serem colocados no freezer para posterior processamento.

### **4.2.3. Técnica anestésico-cirúrgica empregada**

A técnica cirúrgica empregada foi a mesma utilizada por Costa (2003). Empregou-se para os procedimentos cirúrgicos o microscópio de luz da marca DF Vasconcelos, com ocular de aumento de 10 vezes e objetivas cujos aumentos variam entre 50 e 1000X (lentes de 250mm). Todos animais foram operados pelo mesmo cirurgião, utilizando-se a técnica cirúrgica padronizada. Cada animal foi anestesiado com as drogas e doses

anteriormente definidas. Por vezes, no intra-operatório, requereu-se aplicação da metade da dose de indução dos anestésicos para manutenção do plano anestésico. Não foi necessária a intubação orotraqueal em nenhum dos animais, que respiraram espontaneamente durante todo procedimento cirúrgico.

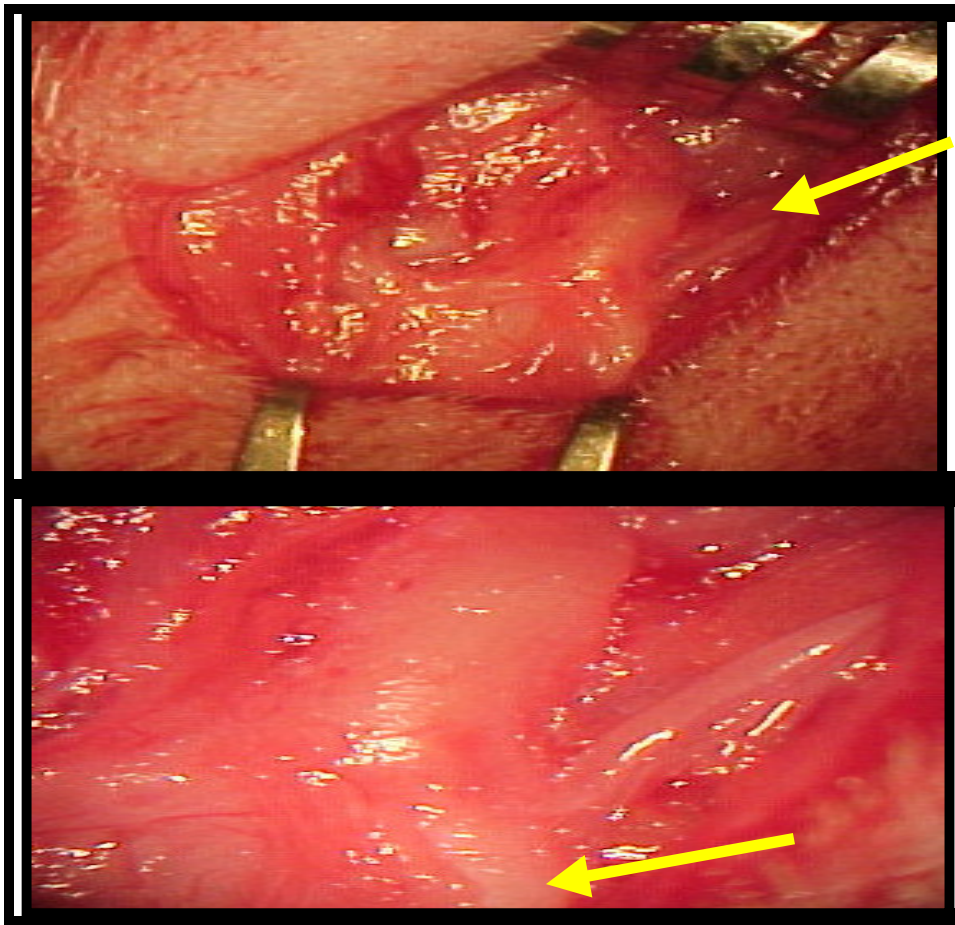
A técnica descrita foi realizada em ambos os lados de cada animal submetido ao experimento. No procedimento cirúrgico realizou-se tricotomia e assepsia da região cervicofacial, um lado de cada vez. Posicionado o animal na mesa cirúrgica, incisou-se a pele da região cervical de um dos lados, do processo mastóideo à metade do corpo mandibular, seguindo a curvatura do ângulo da mandíbula. Procedeu-se, então, a dissecação por planos (fáscia e músculos) e exploração do nervo facial no espaço anatômico compreendido entre o arco da mandíbula e o processo mastóide (figura 1).



**FIGURA 1:** Incisão arciforme na pele da região cérvico-facial do coelho para acesso ao espaço anatômico entre o ramo da mandíbula e o processo mastóide.

Em preto: incisão; em verde: mastóide; em vermelho: m. esternocleidomastoideo.

Após a exposição cirúrgica do tronco extra-temporal do nervo facial (figura 2), realizou-se exérese de fragmento de 1cm do nervo facial. Seguiu-se, então, ao fechamento da pele com fio mononylon 4.0 em pontos simples. Todos os animais foram sacrificados após os procedimentos.

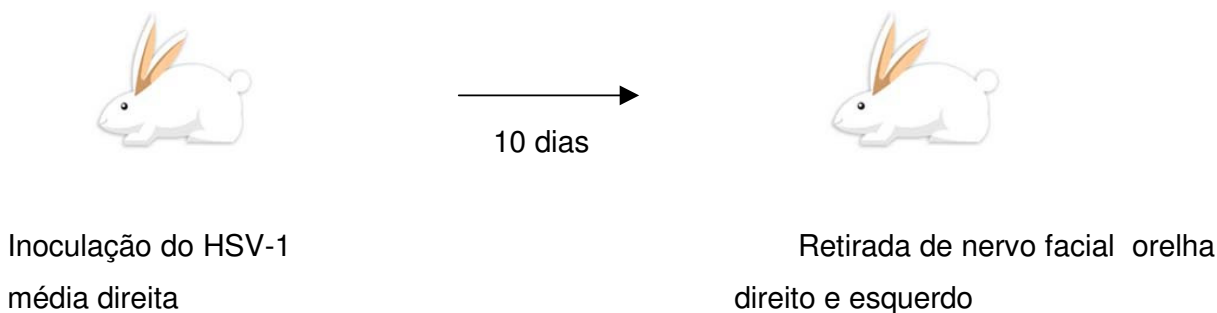


**FIGURA 2.** Acesso cirúrgico ao tronco extra-temporal do nervo facial de coelho (apontado pelas setas)

#### **4.2.4. Etapas do estudo**

##### **4.2.4.1. Procedimentos Grupo I:**

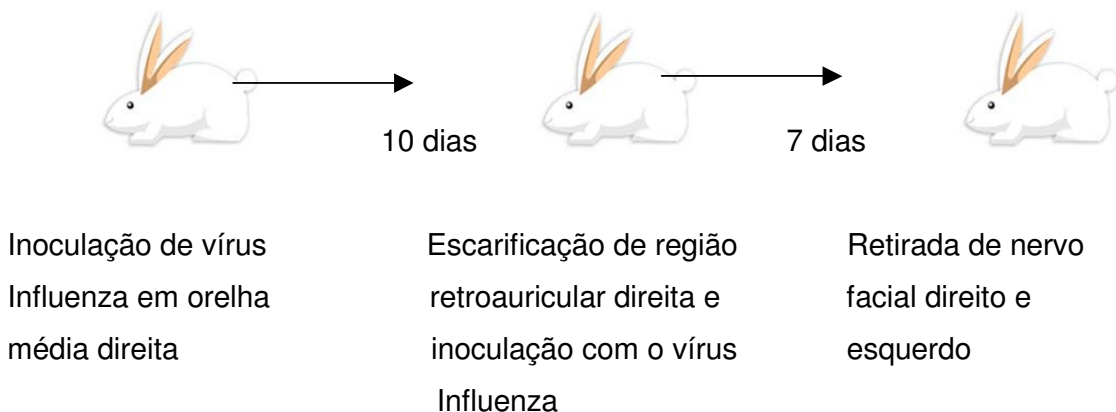
Os animais foram anestesiados e, a seguir, 25  $\mu$ l de solução contendo o HSV-1, foi inoculada na orelha média direita, utilizando-se o mesmo microscópio da técnica cirúrgica e uma seringa de insulina com um Jelco® número 16. Os animais foram recolocados em suas gaiolas e mantidos sob observação diariamente, avaliando-se possíveis alterações do estado geral e/ou aparecimento de PFP, avaliada pelo reflexo do piscar e movimento de vibrissas. Após um período de observação de dez dias, os animais foram anestesiados novamente e submetidos à técnica operatória descrita anteriormente para dissecação do nervo facial direito e esquerdo (Figura 3). Foram retirados fragmentos destes nervos para avaliar a presença ou não do HSV-1 por PCR. Em seguida, os animais foram sacrificados com injeção intracardíaca de uma ampola de cloreto de potássio 19,1%.



**FIGURA 3.**Esquema de procedimentos do Grupo I

#### 4.2.4.2. Procedimentos Grupo II

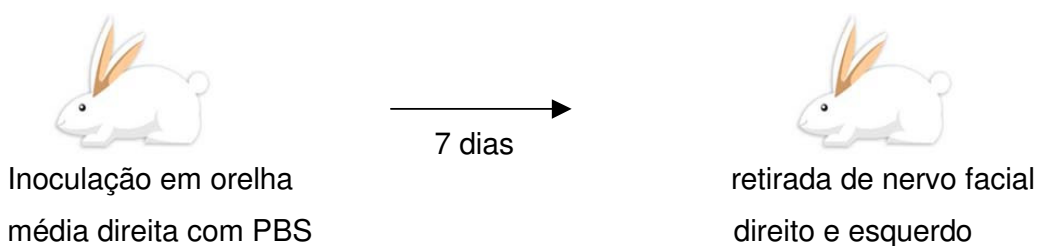
Nos animais deste grupo foi inoculada 25µl de solução contendo o VI em orelha média direita, após serem anestesiados. Os coelhos foram recolocados em suas gaiolas e mantidos sob observação diariamente, avaliando-se possíveis alterações do estado geral e/ou aparecimento de PFP, avaliada pelo reflexo do piscar e movimento de vibrissas. Os animais foram observados por um período de 10 dias, quando então foram realizadas escarificações na pele da região retroauricular direita com agulha 30X42 (cerca de 20 vezes) e sobre esta foi colocado 25µl da mesma solução. Os animais foram acompanhados por mais sete dias, quando então foram submetidos à técnica operatória para retirada de amostras do nervo facial de ambos os lados para avaliar a presença ou não do VI por PCR (Figura 4). Em seguida, os coelhos foram sacrificados.



**FIGURA 4.** Esquema de procedimentos do grupo II

#### 4.2.4.3. Procedimentos Grupo III:

Foi considerado como grupo controle. Nestes animais foi inoculada 25µl de PBS estéril na orelha média direita, após serem anestesiados. Os coelhos foram recolocados em suas gaiolas e mantidos sob observação diariamente, avaliando-se possíveis alterações do estado geral e/ou aparecimento de PFP, avaliada pelo reflexo do piscar e movimento de vibrissas. Os animais foram acompanhados por um período de sete dias, quando então foram anestesiados e operados para a retirada de amostras do nervo facial bilateralmente para avaliar a presença ou não do HSV-1 e do VI pela técnica de PCR (Figura 5). Em seguida, os coelhos foram sacrificados.



**FIGURA 5.** Esquema de procedimentos do grupo III

#### 4.2.5. Técnica do PCR e GeneScan

A técnica de PCR e a aplicação do GeneScan são apresentados no Anexo 2

#### 4.2.6. Análise estatística

O presente estudo não foi submetido à análise estatística em função do pequeno número de amostras.

## 5. RESULTADOS

No período de uma semana em que os animais ficaram em observação no biotério do Departamento de Virologia do ICB-USP para adaptação, antes dos procedimentos do experimento, três animais morreram, sendo um animal do grupo II e dois animais do grupo III, de causas não infecto-contagiosas, de acordo com o exame do veterinário que os avaliou.

Durante o período de observação de, no mínimo 7 e no máximo 17 dias, após a inoculação dos vírus HSV-1 ou VI ou ainda de PBS na orelha direita dos coelhos, nenhum dos animais apresentou alteração do estado geral ou mesmo paralisia facial.

Três coelhos, sendo um animal de cada grupo, apresentaram alteração do equilíbrio após a inoculação das soluções em suas orelhas médias. Estes animais não conseguiam manter-se em pé e apresentaram queda para o lado inoculado, após serem recolocados em suas gaiolas. Este quadro se manteve por um período entre 40 minutos a 1 hora, havendo remissão espontânea posteriormente.

Nos locais de inoculação não se observou o aparecimento de lesões em nenhum dos animais deste experimento.

As amostras de nervo facial direito e esquerdo de cada um dos coelhos foram processadas para análise do PCR de acordo com a metodologia descrita anteriormente.

Os resultados encontrados para as amostras de nervo facial direito e esquerdo dos coelhos inoculados com o HSV-1 e PBS foram todos negativos. No total de amostras do grupo inoculado apenas com o VI, encontramos uma amostra positiva identificada como INF F E 3 (amostra de nervo facial esquerdo de animal inoculado com o vírus Influenza).

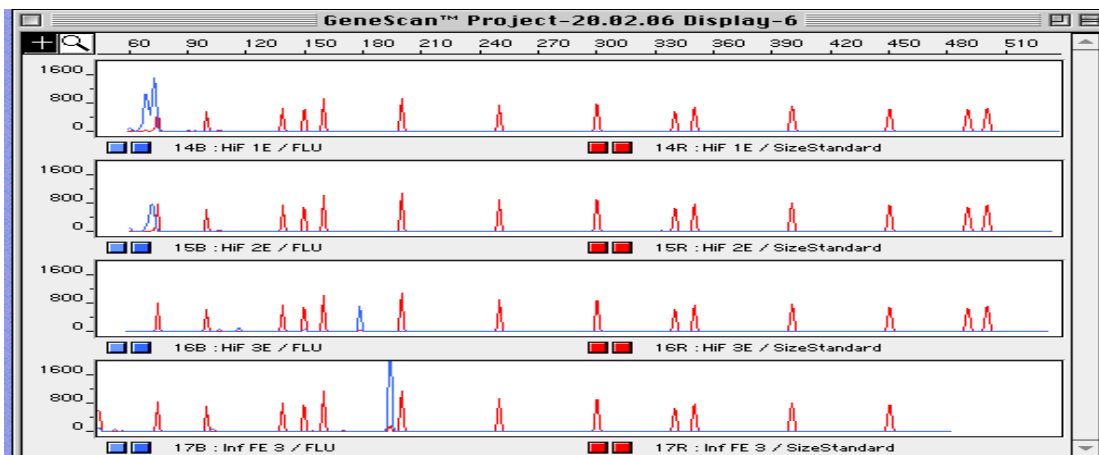
A tabela 2 mostra o total de amostras positiva e negativa dos três grupos.

**TABELA 2.** Distribuição da presença do HSV-1 I e VI no nervo facial dos coelhos inoculados com solução contendo um destes vírus ou solução salina tamponada estéril, pela técnica do PCR.

Grupo	Amostras Positivas		Amostras negativas	HSV-1: vírus herpes simples tipo 1 - VI: vírus Influenza
	Direito	Esquerdo		
I - HSV-1	0	0	10	
II - VI	0	1	7	
III - PBS	0	0	6	

PBS: solução salina tamponada estéril

O resultado das amostras positiva, negativa e dos controles padrão do VI podem ser vistas nas figuras 6, 7 e 8 abaixo, as quais representam o método GeneScan.

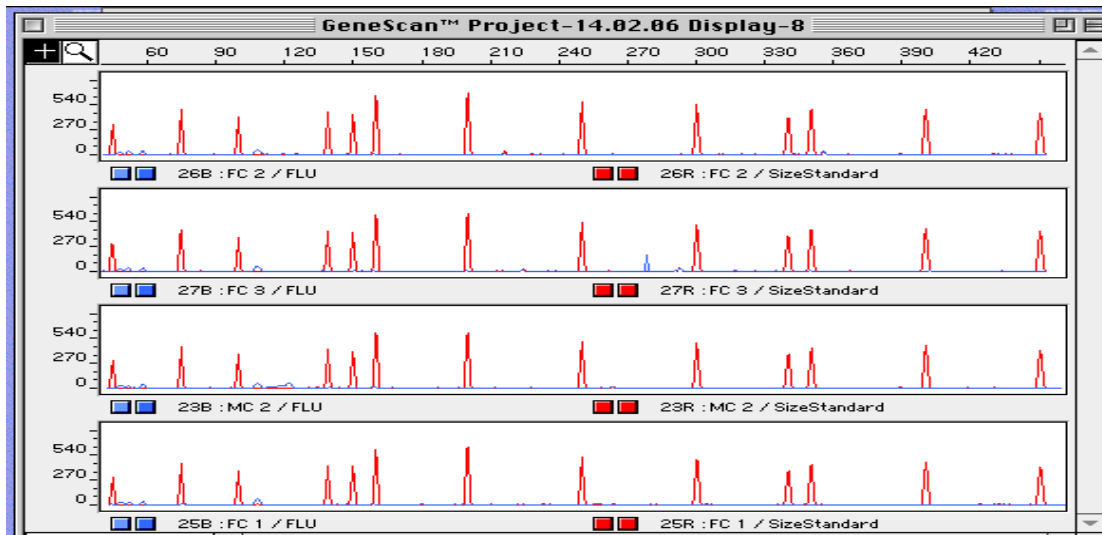


Fonte: Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

**FIGURA 6.** Eletroferograma obtido por GeneScan mostrando a positividade da amostra de nervo facial esquerdo do animal inoculado com o VI (Inf FE 3), pelo aparecimento de um pico azul entre as medidas de peso molecular viral 180 e 210 (eixo x). No eixo y está a URF (unidade relativa de fluorescência).

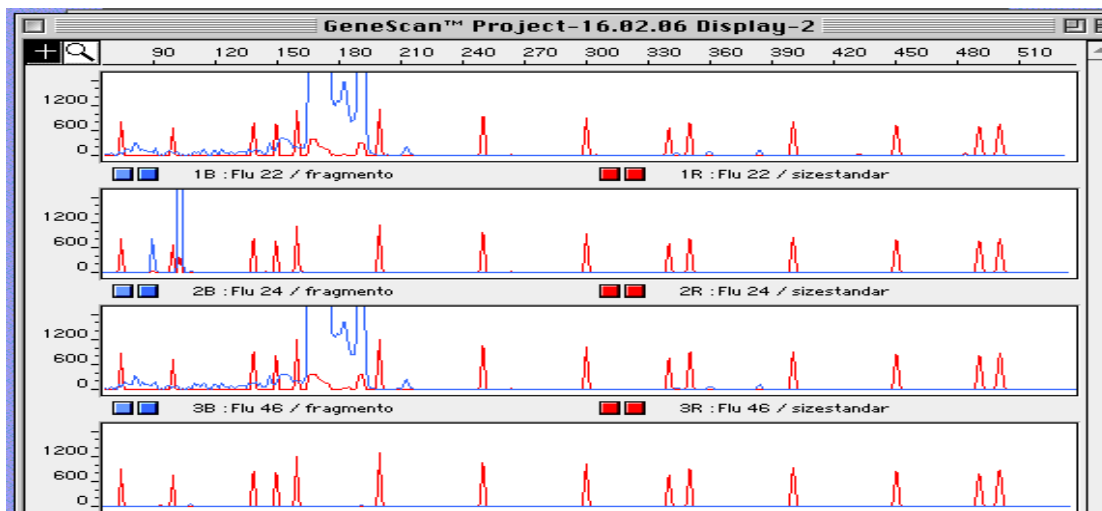


**FIGURA 7:** Eletroferograma obtido por GeneScan mostrando a ausência de picos azuis entre as medidas de peso molecular viral 180 e 210 que representam os resultados negativos das amostras de nervo facial dos animais inoculados com o HSV-1 .



Fonte: Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

**FIGURA 8.** Eletroferograma obtido por GeneScan mostrando a positividade dos controles internos (padrão) do PCR pelo aparecimento de um pico azul entre as medidas de peso molecular viral 180 e 210.



Fonte :  
Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

rsidade de São Paulo.

## 6. DISCUSSÃO

A Paralisia de Bell é responsável por um grande impacto na vida social e profissional de um indivíduo, tanto na fase aguda da doença quanto na fase crônica que pode evoluir com seqüelas (Peitersen, 1992). Os médicos otorrinolaringologistas têm uma participação cada vez mais expressiva no acompanhamento destes pacientes, em ambas as fases da doença, assumindo o pleno conhecimento da sua responsabilidade no tratamento desta afecção e as repercussões na qualidade de vida desses indivíduos. Assim, o envolvimento destes profissionais nas pesquisas clínicas e experimentais sobre a PFP vem se ampliando em nosso meio.

Os indícios da relação dos vírus, entre eles o VHS I e o VI, com a PB são relatados na literatura médica, mas a relação de causa-efeito entre agente e doença precisa ser melhor elucidada.

Os diversos aspectos envolvidos nesta pesquisa e os resultados obtidos são discutidos a seguir.

### **6.1. Quanto ao animal escolhido**

Apesar de a maioria dos trabalhos descritos na literatura ter sido desenvolvida com ratos, o animal escolhido para nosso estudo foi o coelho. Esta escolha se justifica por diversas razões ( Kozma et al, 1974; Shek et al, 1986):

a) a estrutura anatômica do nervo facial do coelho assemelha-se a do ser humano, sendo guardadas as diferenças de espécie.

b) o trajeto dele, desde a sua raiz intra-craniana até a sua porção extra-temporal, inclusive a distribuição de ramos, tem estreita relação com a forma anatômica deste nervo na espécie humana.

c) do mesmo modo, a caixa timpânica se assemelha, embora o processo mastóideo deste animal tenha conformação cônica. Ao dissecarmos a porção extra-temporal do nervo facial, pudemos confirmar a descrição feita por estes autores.

Com relação à estrutura histológica da orelha média (um dos locais de inoculação dos vírus estudados), não encontramos descrição sobre qual seria o seu epitélio de revestimento no coelho.

Devemos ainda considerar que as dimensões da orelha média e do nervo facial do coelho são maiores e mais fáceis de serem manipuladas cirurgicamente do que as do rato, tanto que Kumagami (1972) e Llorente et al (1997) estudaram a propagação do VHS I pelo SNP de coelhos, sem dificuldades, em função da escolha do animal.

## 6.2. Quanto ao vírus estudado

O VHS I, um patógeno neurotrópico, pode causar algumas doenças no sistema nervoso (Tomishima et al, 2001). É conhecida a sua propagação pelos axônios e sua capacidade para infectar neurônios sensoriais em gânglios do sistema nervoso (Kristensson, 1970; Kristensson et al, 1982; Itoyama et al, 1984).

Diversos estudos descrevem aplicação deste vírus em diferentes vias de inoculação em animais, com resultados positivos, tanto no desenvolvimento de paralisia facial como na identificação do vírus no nervo facial (Rabin et al, 1968; Kristensson, 1970; Itoyama et al, 1984; Ishi et al, 1988; Sugita et al, 1995; Takahashi et al, 2001). No presente estudo, a utilização do VHS I, o qual apresenta o mecanismo de neurotransmissão estabelecido, permitiu comparar os resultados aqui obtidos com os destes pesquisadores e se tornou um parâmetro comparativo para a pesquisa do VI.

O interesse em estudar o VI dentre outros vírus citados na literatura médica (Davis, 1981), surgiu a partir dos resultados encontrados nos trabalhos de Mutsch et al (2004), Sendi et al (2004) e Zhou et al (2004). Estes autores observaram que após vacinação contra o VI na Suíça e nos EUA, o risco de aparecimento de casos de paralisia de Bell nesta população aumentou e, assim, sugeriram que poderia haver uma associação causal entre a vacina de VI atenuado e de uso parenteral / nasal e o desenvolvimento de paralisia facial.

Devido à preocupação constante com cepas do VI, altamente virulentas para o homem, e sua repercussão na morbi-mortalidade, a cada ano o número de estudos relacionados ao neurotropismo do VI tem aumentado (Durigon, 2004; Sendi et al, 2004). Trabalhos experimentais com modelo animal, inoculando o VI, via intranasal, e observando o aparecimento deste vírus em tecidos cerebrais, foram descritos na literatura (Reinacher et al, 1983; Shinya et al, 1997; Lu et al, 1999; Nishimura et al, 2000; Park et al, 2002; Tanaka et al, 2003; Matsuda et al, 2004). Outros autores (Joshua et al, 2003; Matsuda et al, 2005) investigaram a capacidade das células de Schwann humanas, "in vitro", serem infectadas e se haveria a transmissão transneuronal deste vírus em uma cultura de neurônios de gânglio da raiz dorsal de ratos, com resultados positivos.

Mas, não há na literatura trabalhos experimentais que investigaram uma associação do VI diretamente com o nervo facial, como em nosso estudo. Deste modo, cabe aqui considerar que o achado do VI no nervo facial vem de encontro ao citado por

estes autores em relação ao tropismo deste vírus com o sistema nervoso.

### **6.3. Quanto à técnica cirúrgica e a do PCR empregadas**

A técnica cirúrgica utilizada foi a descrita por Costa (2003), que apresenta a relação anatômica do nervo facial extra-temporal em coelho, relatando a facilidade da manipulação deste animal, quanto ao acesso cirúrgico ao nervo e à obtenção de material para estudos histológicos, imunohistoquímicos e microscopia eletrônica. Estes aspectos também foram observados no presente estudo. Não optamos pela técnica da pesquisa de vírus na porção intratemporal do nervo facial e gânglio geniculado por requerer materiais especiais e pela técnica mais complexa.

Para a identificação do DNA viral utilizou-se a técnica do GS RT-PCR (GeneScan Transcrição Reversa - Reação em Cadeia de Polimerase), para a rápida detecção simultânea do VI e HSV-1, o qual é um método de biologia molecular. É considerado padrão ouro para o diagnóstico viral e com grande potencial tecnológico porque proporciona a análise de fragmentos de DNA de vírus, de forma rápida, sensível, específica (Tomazelli, 2004).

### **6.4. Quanto ao método aplicado**

Optamos pelo método de inoculação dos vírus VHS I e VI na cavidade timpânica, injetados através da membrana timpânica.

A orelha média relaciona-se por extensão com a nasofaringe e sua mucosa muito se assemelha à do epitélio respiratório, em função da origem embrionária comum destas estruturas. Assim considerando, a inoculação do vírus na orelha média dos coelhos possibilitaria a proliferação viral. Buchman & Fregien (2000) obtiveram fragmentos de mucosa de orelha média sadia de pacientes submetidos à cirurgia para implante coclear ou cirurgia de base de crânio, cultivaram esta mucosa “in vitro” e, posteriormente inocularam VI. Verificaram que as células foram capazes de ser infectadas pelo vírus. Também Kumagami (1972) inoculou diferentes vírus em orelha média de coelhos, entre eles o HSV e o VI. Estes trabalhos deram suporte para a idéia de que os vírus inoculados na orelha média dos coelhos estudados poderiam infectá-los.

O método desenvolvido na pesquisa com o VI, diante da falta de estudos que antecederesse o atual, foi formulado a partir de critérios já utilizados para o HSV-1. O VI foi inicialmente inoculado na orelha média dos coelhos, mas nenhum deles apresentou

paralisia facial até o décimo dia de evolução. Optamos, então por re-infectar os animais com o VI por outra técnica, como fez Takahashi et al (2001), Teague & Goodpasture (1923), Hill et al (1978) e Ishi et al (1978) com o VHS I. Realizamos a escarificação da região retroauricular e sobre esta região colocamos a solução contendo o vírus.

A adição de uma nova via de aplicação do vírus procurou a garantia da infecção viral do coelho pelo VI, independente de termos usado mais de uma via de inoculação. Mesmo sendo uma via não natural de infecção, ela se assemelha ao que também ocorre num caso de vacinação parenteral. Após esta escarificação e a aplicação do VI do mesmo lado da orelha inoculada, os animais foram acompanhados por mais sete dias.

O tempo de observação dos coelhos após inoculação dos vírus ou da solução PBS variou de 7 a 17 dias. Esta variação ocorreu porque ao inocularmos os coelhos com o HSV-1 (Grupo I), aguardamos um período de 10 dias para sacrificar os animais, baseados nos trabalhos de Kumagami et al (1972), Sugita et al (1995) e Wakisaka et al (2002) que observaram o aparecimento de paralisia facial neste período, a qual não aconteceu em nenhum dos nossos animais. Mesmo sem o aparecimento de PFP, amostras do nervo facial extra-temporal foram coletadas para pesquisa do VHS-1 pela técnica do PCR, uma vez que os coelhos do trabalho de Llorente et al (1997) também não apresentaram paralisia facial, mas tinham a presença de DNA viral no nervo facial dos animais inoculados na língua. Consideramos assim que o mesmo poderia ocorrer com nossos animais.

O tempo de 17 dias para os animais do grupo II, inoculados com o VI foi prolongado comparado ao do HSV-1 porque, após o período de observação de 10 dias a PFP não se desenvolveu e assim, optamos por usar a técnica da escarificação retroauricular usada por Teague, Goodpasture (1923), Sugita et al (1995), Takahashi et al (2001) e Wakisaka et al (2002), como uma segunda via de infectividade e aguardamos o tempo de 7 dias após a segunda técnica.

Baseados nestes estudos, podemos inferir que o tempo aguardado para a coleta dos fragmentos de nervo facial extra-temporal para pesquisa dos vírus HSV-1 e VI no presente trabalho ultrapassou aquele em que se teriam maiores chances para encontrar os vírus no nervo facial. Mas estudos de Murakami et al (1996 a), notaram que o HSV-1 leva três dias para chegar ao nervo facial homolateral a orelha inoculada e 10 dias para atingir o nervo contralateral, o que não impediria assim, a identificação do vírus nas amostras contralaterais pelo menos. Da mesma forma para o VI, Reinacher et al (1983) em seus estudos encontraram este vírus no tecido cerebral 8 a 10 dias após a inoculação intranasal. Shinya et al (1998) e Nishimura et al (2000) demonstraram resultados

semelhantes, mas com análises realizadas entre o 5º e 7º dias após inoculação. Podemos citar ainda o trabalho de Matsuda et al (2004) no qual encontraram antígenos virais nos gânglio vagais direito e esquerdo de ratos inoculados via intranasal, com diferença de dois dias após a inoculação.

Não ter encontrado o HSV-1 no nervo facial após a inoculação implica que o vírus ou não acometeu o nervo facial ou, embora não esteja no nervo, ele possa ter infectado-o e migrado para o gânglio geniculado e SNC.

Entretanto, é preciso lembrar que a infectividade e os mecanismos de infecção podem ter diferentes períodos de latência e velocidade de progressão tecidual entre os vírus analisados e o encontro do VI numa amostra de nervo facial que foi retirada após 17 dias de inoculação em uma orelha contralateral nos faz acreditar que este tempo pode variar.

## **6.5. Quanto aos resultados obtidos**

### **6.5.1. Em relação ao VHS I e o PCR**

Os resultados negativos do PCR para as amostras de nervo facial de coelhos inoculados com o VHS I encontrados neste estudo, não estão de acordo com a maior parte da literatura médica o que sugere que outros fatores, intrínsecos ou extrínsecos ao hospedeiro, possam estar associados com esta relação, como se discute a seguir:

1) A técnica de inoculação dos vírus na cavidade timpânica poderia não ser a ideal. Encontramos na literatura o trabalho experimental de Kumagami (1972) com referência à inoculação de vírus na cavidade timpânica de coelhos e o desenvolvimento de paralisia facial nos animais. Também Buchman & Friegen (2000) estudaram a capacidade da mucosa da orelha média de seres humanos ser infectada por vírus e observaram positividade nos seus resultados. Portanto, acreditamos que esta técnica seja viável;

2) A quantidade de vírus inoculada (25 µl), via transtimpânica poderia ser insuficiente para desencadear a infecção viral. A dose pré-estimada foi baseada em trabalhos como de Sugita et al (1995) e Takahashi et al (2001), os quais observaram não só a presença do vírus no nervo facial como também o desenvolvimento da PFP em ratos inoculados com o mesmo vírus e a mesma dose em seus trabalhos experimentais. Questionamos se o volume da cavidade timpânica do coelho em relação à do rato determinaria a necessidade de uma quantidade maior da solução com vírus aplicada;

3) A inoculação do vírus na cavidade timpânica e a retirada de fragmento de nervo

facial extra-temporal poderia ser uma técnica questionável. De acordo com os três trabalhos revisados, estes autores inocularam os ratos em região retroauricular (Sugita et al, 1995; Takahashi et al, 2001) ou no forame estilomastoídeo (Kumagami, 1972) e retiraram amostras de nervo intra-temporal, analisando a propagação retrógrada do vírus. Mas, se for correto deste questionamento, estaríamos contradizendo os trabalhos experimentais de Goodpasture e Teague (1923), Kristensson (1970); Kristensson (1971), Davis (1981), Ugolini et al (1987) e Wakisaka et al (2002) que demonstraram que o HSV-1 pode percorrer os nervos do SNP de forma retrógrada e anterógrada, como esta última foi avaliada neste estudo;

4) O tempo de dez dias para remoção das amostras, após a inoculação do VHS I na orelha média, poderia ter sido longo. Se comparado ao tempo de captura deste vírus de 1 a 7 dias nos trabalhos de Kristensson (1970) e Stevens & Cook (1971) sim, mas não se consideramos os trabalhos de Kumagami (1972) e Sugita et al (1995) que encontraram partículas do HSV-1 no nervo facial em amostras colhidas entre o 4º e 22º dias, após inoculação deste vírus no forame estilomastoídeo e região retroauricular, respectivamente. Paralelamente a estes experimentos animais podemos citar os trabalhos de Furuta et al (1998) e Lazarini et al (2006), que pesquisaram a saliva de pacientes com paralisia de Bell e encontraram positividade da análise do PCR até na segunda semana de paralisia (Furuta et al,1998). Também Murakami et al (1996b) pesquisaram a presença do HSV-1 em fluido endoneural do nervo facial e músculo auricular posterior de seres humanos e encontraram resultado positivo de PCR realizado nestas amostras, 12 a 87 dias após a instalação de paralisia facial.

O vírus não ter sido encontrado no fragmento do nervo facial extra-temporal não descarta a possibilidade de o mesmo estar latente no gânglio geniculado. De acordo com Tomishima et al (2002), quando o DNA viral alcança o núcleo dos neurônios, nos gânglios, uma infecção latente é estabelecida num período que pode variar de 5 a 10 dias. Desta forma, poderíamos justificar nossos resultados. Chama-nos a atenção, também, os achados de Murakami et al (1996 a) que no grupo de animais inoculados com HSV-1 e que não desenvolveram a PFP, não foi encontrado este vírus no nervo facial, fato este idêntico ao que se estabeleceu no presente estudo;

5) Haveria necessidade de imunossupressão do animal, como sugerido por Ishi et al (1988) e Takahashi et al (2001), para que se estabelecesse uma disseminação do vírus pelo nervo facial. A falta de um fator desencadeante poderia justificar este achado, mas é preciso considerar que outros trabalhos descreveram resultados positivos mesmo sem a imunossupressão (Sugita et al, 1995; Wakisaka et al, 2002).

### 6.5.2. Em relação ao VI e o PCR

Não há registro, na literatura mundial, de estudo experimental de inoculação do VI e uma possível ação no nervo facial.

O encontro do VI no nervo facial na nossa pesquisa não nos permite estabelecer uma clara relação de causa e efeito com a paralisia facial, mas pode ser um indício de um tropismo entre VI e nervo facial. Trabalhos como o de Reinacher et al (1983), Shinya et al (1998), Park et al (2002), Tanaka et al (2003) e Matsuda et al (2004), estudaram o neurotropismo do VI e demonstraram que este vírus pode alcançar diferentes estruturas do SNC, a partir de diferentes vias periféricas de inoculação, fato que corrobora para a possibilidade de associação deste vírus com o nervo facial.

O fato de o VI estar presente no nervo facial contra-lateral ao lado inoculado implica na aceitação de que o VI, após a sua inoculação, migrou para o SNC e de lá alcançou o nervo facial do outro lado do animal. Shinya et al (1998) encontraram antígenos virais no tronco cerebral dos ratos inoculados via intranasal e Matsuda et al (2004), após inocularem via intranasal dois grupos de ratos (submetidos ou não a retirada do nervo vago de um lado), observaram o aparecimento do vírus no gânglio vagal de ambos os lados. Este fato sugere que o vírus tem a capacidade de propagar-se no tronco cerebral de um lado para outro, possibilitando a mesma analogia para o nervo facial.

Outro dado importante é o fato do VI estar no nervo facial e não ter desencadeado quadro clínico de paralisia facial. Inferir que o VI que atinge o nervo facial possa desencadear a paralisia facial é algo a ser mais bem estudado, pois é possível que isto possa acontecer como sugere o fato de haver uma maior incidência de PB na população vacinada contra a gripe, como observado por Mutsch et al, Sendi et al e Zhou et al em 2004.

Ao observarmos apenas um exame de PCR positivo para este vírus no fragmento de nervo facial extra-temporal contra-lateral de um animal, temos alguns fatores a considerar:

1) O número pequeno de animais (n=4) do nosso estudo não nos permitiu uma maior reprodutibilidade dos resultados. Mas é pertinente pensar que estudos futuros, com um maior número de animais, possa-se reproduzir esta positividade.

2) Todos os trabalhos citados na literatura utilizaram a via intranasal como via de inoculação deste vírus por ser este considerado um vírus respiratório, com tropismo inicial para o trato respiratório (Nishimura et al, 2000), diferente da técnica que utilizamos.



Conforme discutido anteriormente, a inoculação do VI na mucosa da orelha média pode levar a infecção viral (Buchman, 2000 e Joshua et al, 2003) e, portanto, esta via não inviabilizaria a infectividade do VI nos coelhos do nosso estudo. Mas, devemos lembrar que este vírus vem sendo aplicado por outras vias não naturais (vacinação parenteral) e, portanto, o comportamento do VI também deve ser investigado nestas circunstâncias.

3) A paralisia facial não apareceu em nenhum dos animais durante o período de observação, pós-inoculação do vírus. Este resultado não pode ser comparado com o da literatura porque não há trabalhos que estudaram o tropismo do VI, especificamente pelo nervo facial. Estudos futuros com um número maior poderão elucidar esta possibilidade do vírus desencadear a PFP. As manifestações características nos animais descritas em trabalhos como de Reinacher et al (1983) e Tanaka et al (2002) foram broncopneumonia e encefalite. No nosso modelo, não observamos alterações do estado geral dos animais.

4) O VI propaga-se nas células nervosas pelos prolongamentos periféricos dos nervos sensitivos, após sua replicação na mucosa respiratória (Park et al, 2002). O encontro do vírus em amostra de nervo facial no nosso experimento nos faz pensar que um dos mecanismos do transporte tenha sido a partir do contato deste vírus com fibras do nervo facial dentro da cavidade timpânica. Como também fizemos escarificação de região retro-auricular ipsilateral, não podemos desconsiderar a possibilidade desta via de infecção e considerar que o VI tenha migrado por fibras nervosas sensitivas da pele retro-auricular até o SNC e daí, atingido o nervo facial contra-lateral.

De acordo com este mecanismo, o VI inoculado na orelha ascenderia, de forma intra-axonal, do ramo auricular posterior do nervo facial (rota 1), ou do ramo auriculotemporal do nervo trigêmeo (rota 2) ao tronco cerebral e gânglio trigeminal. O VI propagar-se-ia no tronco cerebral e migraria, então, para o lado contra-lateral no nervo facial ou nervo trigêmeo, a partir do núcleo motor do nervo facial e núcleo trigeminal.

Corroborando com este mecanismo, temos o trabalho de Shinya et al (2000), no qual, após inoculação do VI intranasal, encontraram antígenos virais no gânglio trigeminal e gânglio vagal, sugerindo que após a replicação do vírus no epitélio respiratório, ele ascende para o SNC via nervos sensoriais, induzindo lesões no tronco cerebral e, então, propaga-se via trans-sináptica no SNC.

Outros trabalhos precisarão ser desenvolvidos a fim de confirmar este resultado, uma vez que não há referências na literatura, e de ampliar os conhecimentos a respeito.

5) O VI aqui estudado é infectante ao contrário do que se utiliza em vacinas para gripe (vírus inativado). Seria importante, no futuro, analisar se o VI inativado poderia por si só ser agressivo ao nervo facial e desencadear a paralisia facial como observado em

estatísticas oficiais nos EUA, o que não parece viável. Poderia ele, infectante ou não, ser apenas um indutor de um mecanismo não conhecido na gênese da PB?

Novas pesquisas devem ser desenvolvidas, investigando o tropismo do VI ao nervo facial e se o VI induz, direta ou indiretamente, os mecanismos de agressão ao nervo facial que ocorre na PB.

## 7. CONCLUSÃO

O vírus Influenza foi encontrado no nervo facial esquerdo de coelho inoculado com este vírus nas orelhas externa e média direita, enquanto o vírus herpes simples tipo I não foi observado no nervo facial, pela técnica de PCR utilizada.

## **8. ANEXOS**

### **ANEXO 1**

#### **PROTOCOLOS DE APROVAÇÃO DAS COMISSÕES DE ÉTICA**

### **ANEXO 2:**

## **TÉCNICA DO PCR E GENESCAN (Tomazelli, 2004)**

### **Extração de RNA das amostras (nervo facial) para o vírus Influenza**

Para a extração de RNA foram utilizadas entre 20 e 200 mg dos tecidos retirados dos coelhos (nervo facial). O fragmento de tecido foi macerado em tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL, com a utilização de pérolas de vidro por meio de agitação por 30 minutos, divididos em 3 tempos de 10 minutos, com intervalos de 5 minutos. A esse material foi adicionado 1 mL de Trizol LS (Invitrogen Life Technologies). A mistura foi homogeneizada, seguindo-se incubação por 5 minutos à temperatura ambiente. Foram adicionados 200µL de clorofórmio (Merck) à mistura e, após homogeneização por inversão do tubo, prosseguiu-se com incubação por 3 minutos a temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para outro tubo, e a precipitação do RNA foi feita à temperatura ambiente por 10 minutos, após a adição de 500 µL de isopropanol (Merck). O precipitado foi coletado por centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75% (Synth). O RNA seco foi dissolvido em 50 µL de água livre de RNases. O RNA foi estocado em freezer -70°C.

### **Obtenção de cDNAs por transcrição reversa.**

A transcrição reversa foi feita com a utilização do kit comercial High-Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems, cat. N° 4322171). O RNA (50 µL) extraído de cada amostra foi incubado por 10 minutos a 25°C na presença de 50 pMoles de “random primers” e demais reagentes obtendo-se um tampão de reação de 50 mM de Tri-HCL (pH 8.3), 75mM de KCL, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de dithiothreitol (DTT), 50 U/µL da enzima multiscribe RT, 1.5 mM de 25x cada dNTP (dATP, dGTP, dTTP e dCTP) e água livre de RNases para um volume total de 100 µL. As reações foram incubadas por 10 minutos a 25°C, seguidas de incubação a 37°C por 120 minutos. O cDNA foi estocado em freezer com temperatura de -70°C até sua utilização.

### **Extração e purificação do DNA viral dos tecidos (nervos) para o vírus herpes simples tipo I**

Cerca de 200ng de nervo foram incubados, por 30 minutos a 65°C com 150µL SDS por 20 minutos a 65°C. Após a maceração, incubou-se 20µL da amostra em 150µL de

TNE (Tris HCl 10mM, EDTA 10mM e NaCl 10mM, pH 8,0), acrescidos de 20µL de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio a 10%) e 10µL de proteinase K (10mg /mL- Sigma Diagnostics). O DNA foi extraído seqüencialmente pelo método fenol / e 60µL de Proteinase K (pK); em seguida, acrescentou-se 200µL de NaCl/CTAB 10% clorofórmio / álcool isoamílico (25:24:1) e armazenado a - 20°C até o uso. Às amostras incubadas foram acrescidos 200µL de fenol, agitando por 2 minutos e centrifugando por 3 minutos, a 12.000 x g, com temperatura entre 18 e 22°C. Da camada superior aspirou-se 150µL, passando-se para outro tubo e acrescentou-se 150µL de fenol / clorofórmio / álcool isoamílico, agitando por 2 minutos e centrifugando por 3 minutos, a 12.000 x g, com temperatura entre 18 e 22°C. Após a centrifugação, retirou-se 100µL da superfície e acrescentou-se 100µL de clorofórmio / álcool isoamílico, agitando por 2 minutos e centrifugando novamente.

O material da extração (40µL) foi armazenado a -20°, até ser utilizado na amplificação.

Como controle negativo foi utilizado água DNAase/RNAase free 0,1% e, como controle positivo, utilizamos a cultura de célula padrão infectada com o VHS-1.

## **Análise por Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)**

### **a. Oligonucleotídeos iniciadores (“primers”)**

Para o desenvolvimento das metodologias da PCR e nested-PCR (região de amplificação da seqüência dos pares de base) foram utilizados dois pares de “primers” (Outer1/Outer2, para o PCR e Inner1/Inner2, para o nested-PCR – Invitrogen) derivados do gene que codifica o genoma completo do HSV-1.

A seqüência das bases está apresentada na tabela 1:

**TABELA 1.**

Primer	Seqüência 5` - 3`
Outer 1	OUTER 1 - 5'GGG CCA GGC GCT TGT TGG TGT A 3' (SENSE)
Outer 2	OUTER 2 - 5'ACA TCG GCG TCA TCT GCG GCG 3' (ANTISENSE)
Inner 1	INNER 1 - 5' CAG TTC GGC GGT GAG GAC AAA 3' (SENSE)
	INNER 2 - 5' GCG TTT ATC AAG CGC ACC TCC 3'

---

Fonte :Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP

### **b. Amplificação do DNA viral pela técnica da PCR**

O volume de reação para amplificação, tanto para PCR quanto para nested-PCR foi de 50µL, contendo 26µL de água DEPC, 5µl de tampão 10%, 8µL de dNTPs 1,25mM, 2,5µL de cada um dos primers externos Outer1 / Outer2, 1,0µL da enzima Termus Thermophilus DNA polimerase (Biotools), e 5µL de cada amostra extraída.

A amplificação foi desenvolvida em termociclador Eppendorf. As amostras foram, primeiramente, denaturadas a 94°C por 4 minutos, e submetidas a 40 ciclos de amplificação, sendo cada ciclo composto de 3 temperaturas: denaturação das amostras a 94°C (1 minuto), pareamento dos primers a 50°C (1 minuto) e extensão das fitas de DNA a 72°C (1 minuto). Após completado os ciclos, um período de 7 minutos a 72°C foi aplicado para a finalização das extensões ocorridas. Após o término, o termociclador manteve a temperatura de 4°C até o processamento das amostras amplificadas.

### **c. Análise por nested-PCR**

Do produto da primeira amplificação, 5µL foram utilizados como molde para uma segunda amplificação com primers internos Inner1 / Inner2, na técnica de nested-PCR, sob as mesmas condições da PCR.

### **d. Análise dos produtos amplificados**

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose. Uma mistura de 5µL de produto amplificado e 2µL de Loading Buffer foi aplicada em gel de agarose 1,5% (Gibco BRL), em tampão TBE 0,5x (45mM de Tris Borato e 1mM de EDTA [pH 8,0]) com adição de Brometo de Etídio numa concentração final de 5 µg / mL.

A leitura do gel foi feita em transluminador de luz UV.

Foram consideradas negativas as amostras que não apresentaram bandas no gel, e positivas aquelas que apresentaram uma banda de 302pb, para o produto da amplificação da nested-PCR. Em cada gel foi incluído um marcador de peso molecular de

100pb, um controle negativo (água DNAase/RNAase free) e um controle positivo (cultura padrão de vírus). A corrida eletroforética foi desenvolvida a 100Volts, durante o tempo necessário para deslocar o marcador de corrida azul de bromofenol, que migra proporcionalmente a um segmento de DNA com 100pb, cerca de 1cm do ponto de aplicação da amostra.

### **Detecção dos Produtos Amplificados (GeneScan)**

Os produtos purificados foram analisados quantificados utilizando o Analisador Automático de DNA ABI Prisma modelo 310, com detecção para marcadores fluorescentes, utilizando o programa GeneScan para quantificação e análise de fragmento de DNA. A genotipagem foi possível devido aos *primers* específicos para cada agente etiológico marcado com fluorescência (FAM) e diferenciados por tamanho do fragmento de DNA gerado. 1 µL do produto de PCR purificado foi misturado com 12µL de formamida deionizada e 0,5µL de sizestandard (GeneScan 500 TM Rox). A inclusão do padrão de peso molecular em cada amostra permite a compensação de eventuais variações que possam ocorrer entre as corridas eletroforéticas. Essa mistura foi colocada no Termociclador para denaturação: 95°C por 3 minutos e imediatamente colocada em gelo até análise no aparelho.

Os produtos foram submetidos à corrida eletroforética de DNA no ABI modelo 310. Os tubos foram dispostos em uma bandeja, devidamente identificados e, em seguida, foi dado início a eletroforese, comandados por um computador acoplado ao equipamento. A partir desse momento, iniciou-se a injeção da primeira amostra ao interior de um capilar medindo 47 cm de comprimento, preenchido por um polímero POP-4 (Applied Biosystems ABI). A injeção da amostra no capilar durou 5 segundos sob uma corrente elétrica de 15.000 volts. Após a injeção, iniciou-se a corrida eletroforética que durou cerca de 30 minutos à temperatura de 60°C.

Os fragmentos marcados foram detectados por um feixe a laser e por uma câmara CCD, utilizando-se um filtro virtual "A", que em seguida foram analisados pelo programa ABI 310 GeneScan, produzindo eletroferogramas com dados quanto ao tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb) e, quanto à intensidade de fluorescência, em Unidades relativas de Fluorescência (URF).

O GeneScan é uma técnica bastante moderna na detecção de viroses respiratórias de análise de fragmentos de DNA baseada na detecção automática de fluorescência durante eletroforese em capilar bastante utilizada em procedimentos que requerem muita precisão no tamanho e quantidade do produto de DNA, incluindo seleção e validação de



SNP (Single Nucleic Polimorphism), análises de microsátélites, detecções de polimorfismos e outros.

O GeneScan em aplicações de PCR, baseia-se na utilização de um *primer* marcado com fluoresceína e outro não marcado usado para amplificar um alvo específico que gerará produtos de tamanhos esperados. O produto amplificado é combinado com um peso molecular padrão (sizestandard) e submetido a uma eletroforese em seqüenciador automático de DNA, no qual o produto fluorescente é medido e quantificado.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abico Y, Ikeda M, Hondo R. Secretion and dynamics of herpes simplex virus in tears and saliva of patients with Bell's palsy. *Otol Neurotol.* 2002;23 (5):779-83.

Buchman CA, Fregien N. Influenza A virus infection of human middle ear cells in vitro. *Laryngoscope.*2000; 110:1739-44.

Costa, HJZR. Estudo Experimental sobre a regeneração do nervo facial em coelhos. Tese (Mestrado). São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; 2003.

Davis, L.E. Experimental Viral Infections of the Facial Nerve and Genuiculate Ganglion. *Ann Neurol.*1981 ; 9: 120-125.

Durigon, E.L. Ataque dos virus. Folha de São Paulo. São Paulo. 2004, fev 01.

Furuta Y, Takasu T, Sato K, Inuyama Y, Nagashima K. Latent herpes simplex virus type 1 in human genuiculate ganglion. *Acta Neuropathol.* 1992; 84: 39-4.

Furuta, Y; Fukuda, S; Chida, S. et al. Reactivation of herpes simplex virus type 1 in patients with Bell's palsy. *J.Med Virol.* 1998; 54: 162-6.

Goodpasture, E.W.; Teague, O. Transmission of the virus of herpes febrilis along nerves in experimentally infected rabbits. *J Exp Med.*1923; 44:139-84.

Hill TJ, Blyth WA, Harbour DA. Trauma to the skin causes recurrence of herpes simplex in the mouse. *J Gen Virol.* 1978; 39:21-8.

Ishi K, Kurata,T, Sata T, Hao MV, Nomura Y. An animal model of type -1 herpes simplex virus infection of facial nerve. *Acta Otolaryngol [ Suppl] (Stockh)* 1988 ( suppl. 446): 157-64.

Itoyama Y, Sekizawa T, Openshaw H, Kogure K, Kuroiwa Y. Immunocytochemical Localization of Herpes Simplex Virus Antigen in the Trigeminal Ganglia of Experimentally Infected Mice. 1984; 66: 67-75.

Joshua L, Craig AB, Nevis F. Influenza A Virus Infection of Human Schwann Cells In Vitro. *Acta Oto-Laryngologica.* 2003 ; 123(1):41-5.

Kristensson K. Morphological Studies of the Neural Spread of Herpes Simplex Virus to the Central Nervous System. *Acta Neuropath (Berl.)* 1970; 16:54-63.

Kristensson K, Nennesmo I, Person L and Lycke E. Neuron to neuron transmission of herpes simplex virus . Transport of virus from skin to brainstem nuclei.1982.

Kumagami H. Experimental nerve paralysis . *Arch Otolaryngol.*1972 ; 95:305-312.

Lazarini PR, Viana MF, Alcântara MPA, Scalia RA, Caiaffa Fº HH. Pesquisa do vírus

herpes simples na saliva de pacientes com paralisia facial periférica de Bell. Rev Bras Otorrinolaringol; 2006;72(1):7-11.

Llorente JL, Ona M, Suarez C, Melon S, Hidalgo F, Carreno M, Fernandez J A . Identification of the HSV-1 genome by "Dot Blot hybridization" in the geniculate ganglion of rabbits. Rev Laryngol otol Rhinol. 1997;2: 163-165.

Lu X, Tumpey TM, Morken T, Zaki SR, Cox NJ, Katz JM. A mouse model for evaluation of pathogenesis and immunity to Influenza A (H5N1) viruses isolated from humans. Journal of Virology. 1999.73 (7): 5903-11.

Matsuda K, Park CH , Sunden Y , Kimura T , Ochiai K , Kida H, Umemura T. The Vagus Nerve is one route of Transneuronal Invasion for Intranasally Inoculated Influenza. A Virus in Mice. Vet Pathol. 2004; 41:101-7.

Matsuda K , Shibata T, Sakoda Y., Kida H , Kimura T, Ochiai, K., Umemura T. In vitro demonstration of neural transmission of avian Influenza A virus. Journal of Virology. 2005 ; 86:1131-9.

Murakami S, Hato N, Mizobuchi M, Doi T, Yanagihara N. Role of herpes simplex virus infection in the pathogenesis of facial paralysis in mice. Ann Otol Rhinol Laryngol. 1996a; 105: 49-53.

Murakami S, Mizobuchi, M; Nakashiro, Y, Doi, T; Hato, N; Yanagihara, N. Bell palsy and herpes simplex virus: identification of viral DNA in endoneurial fluid and muscle. Ann Intern Med.1996b; 124(1 Pte 1): 27-30.

Mutsch M, Zhou W, Rhodes P, Boop, M; Chen RT, Linder T, SPY RC, Steffen R. Use of inactivate intranasal Influenza vaccine and risk of Bell's palsy in Switzerland. N Engl J Med. 2004; 26:350 (9):860-1.

Nishimura, H; Itamura, S; Iwasaki, T; Kurata, T; Tashiro, M. Characterization of human Influenza A (H5N1) virus infection in mice: neuro, pneumo and adipotropic infection. Journal of General Virology. 2000; 81:2503-10.

Nomura Y, Kurata T, Saito K. Cochlear changes after herpes simplex virus infection. Acta Otolaryngol (Stockh) 1985; Supl 99:419-27.

Park CH, Ishinaka M, Takada A, Kida H, Kimura T, Ochiai K, Umemura T. The invasion routes of neurovirulent A/Hong Kong/483/97 (H5N1) Influenza virus into the central nervous system after respiratory infection in mice. Arch Virol. 2002; 147: 1425-36.

Peitersen E. Natural history of Bell's palsy. Acta otolaryngol Suppl.1992; 492:122-4.

Reinacher M, Bonin J, Narayan O, Scholtissek C. Pathogenesis of Neurovirulent Influenza A Virus Infection in Mice. Route of Entry of Virus into Brain Determines Infection of Different Populations of Cells. Laboratory Investigation. 1983; 49(6): 686-92.

Sendi P, Locher R, Bucheli B, Battegay M. Intranasal Influenza Vaccine in Working Population. Clinical Infectious Diseases. 2004; 38:974-80.

Severin MJ, White RJ. The neural transmission of Herpes Simplex Virus in Mice. *Amer. J. Pathol.* 1968; 53:1009-20.

Stevens JG, Nesburn AB, Cook JG. Latent Herpes Simplex virus from trigeminal ganglia of rabbits with recurrent eye infection. *Nature (London) New Biol.* 1972; 235: 216-17.

Sugita T, Murakami S, Yanagihara N, Fujiwara Y, Hirata Y, Murata T. Facial nerve paralysis induced by herpes simplex virus in mice: an animal model of acute and transient facial paralysis. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1995; 104:574-81.

Takahashi H, Hitsumoto Y, Honda N, Hato N, Mizobuchi M, Murakami S, Kisaki H, Wakisaka H, Gyo K. Mouse model of Bell's Palsy induced by reactivation of Herpes Simplex Virus type 1. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology.* 2001; 60(6):621-27.

Thomazelli LM. Vigilância Epidemiológica dos vírus respiratórios humanos em amostras clínicas pelo método de GeneScan-RT-PCR. Tese (Mestrado). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2004.

Tomishima MJ, Smith GA, Enquist LW. Sorting and transport of alpha herpesviruses in axons. *Traffic.* 2001; 2: 429-436

Trabulsi LR. *Microbiologia.* São Paulo: Atheneu Editora; 1986.

Ugolini G, Kuypers HGJM, Simmons A. Retrograde transneuronal transfer of Herpes simplex virus type 1 (HSV 1) from motoneurons. 1987; 422: 242-56.

Wakisaka H, Hato N, Honda N, Takahashi H, Kisaki H, Murakami S, Gyo K, Mominoki K, Kobayashi N, Matsuda S. Demyelination Associated with HSV-1-Induced Facial Paralysis. *Experimental Neurology.* 2002; 178: 68-79.

Zhou W, Pool V, Di Stefano F, Iskander JK, Haber P, Chen RT, VAERS Working Group. A potential signal of Bell's palsy after parenteral inactivated Influenza vaccines: reports to the Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS)- United States. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety.* 1991-2001-2004; 13:505-10.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com LIST OF JOURNALS INDEXED IN INDEX MEDICUS.

## **FONTES CONSULTADAS**

Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. Normatização para apresentação de dissertações e teses. São Paulo: F.C.M.S.C.S.P, 2004.

Ferreira ABH. Novo dicionário Aurélio da Língua Portuguesa. 3ª ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira; 1999.

## **Pesquisa dos vírus herpes simples tipo I e vírus Influenza em nervo facial de coelhos após a inoculação destes vírus nas orelhas média e externa.**

Suzana Maria Giancoli, tese de mestrado, 2006

**Introdução:** Atualmente a infecção viral é a causa mais aceita pela literatura mundial como causa da Paralisia Facial de Bell. O vírus herpes simples tipo 1 é o mais citado como um possível agente etiológico desta doença e aquele cuja neuro transmissão é bem conhecida. O vírus Influenza tem causado preocupação mundial pela sua capacidade de causar doença fatal e relacionado a um risco aumentado de desenvolvimento de Paralisia de Bell em populações que foram vacinadas com vacinas anti-Influenza. Desta forma, nos baseamos na premissa de que a infecção viral pode ter participação na etiopatogenia da lesão do nervo facial na PB e um ou mais vírus podem estar ali envolvidos, dentre eles o vírus Herpes Simples tipo I e o vírus Influenza. **Objetivo:** verificar a presença dos vírus herpes simples tipo I e vírus Influenza no nervo facial de coelhos submetidos à inoculação destes nas orelhas média e externa. **Método:** Inoculação dos vírus herpes simples tipo I e vírus Influenza na orelha média direita dos coelhos, divididos em 3 grupos, sendo um grupo inoculado somente com vírus herpes simples, outro com o vírus Influenza e um grupo controle, inoculado com solução salina tamponada estéril. Após um período de observação que variou de 7 a 17 dias, o nervo facial de ambos os lados foram retirados para pesquisa dos vírus pelo método de reação em cadeia da polimerase. **Resultados:** Dos animais inoculados com o vírus herpes simples não obtivemos nenhuma amostra positiva. Daqueles inoculados apenas com o vírus Influenza, encontramos uma amostra positiva no nervo facial contralateral. Os controles foram negativos. **Conclusão:** O vírus Influenza foi encontrado no nervo facial esquerdo de coelho inoculado com este vírus nas orelhas externa e média direita, enquanto o vírus herpes simples tipo I não foi observado no nervo facial, pela técnica de PCR utilizada.

## **Research of herpes simplex type I virus and virus influenza in facial nerve after the inoculation of these viruses in the ears of rabbits.**

**Introduction:** currently the viral infection is the most accepted cause for world-wide literature of the of Bell's Palsy. The herpes simplex virus type 1 is cited by literature as a possible etiological agent of this illness and that one whose neuro transmission is well known. The virus influenza has caused world-wide concern for its capacity to cause fatal illness and a possible increased on risk of Bell's Palsy in populations who had been vaccinated with vaccines anti-influenza. In such a way, we base them on the premise of that the viral infection can have participation in the etiopatogenesis of the injury of the facial nerve in the BP and one or more virus can be involved there, among them the Herpes simplex virus type I and the Influenza virus. **Aim:** to verify the presence of the viruses herpes simple type I and virus influenza in the facial nerve of rabbits submitted to the inoculation of these in the middle and external ears. **Methodology:** Inoculation of the viruses herpes simplex type I and virus influenza in the right middle ear of the rabbits, divided in 3 groups, being a group only inoculated with herpes simplex virus, another one with the influenza virus and a group as controlled, inoculated with phosphate buffer solution. After a period of comment that varied of 7 to 17 days, the facial nerve of both sides had been removed for research of the viruses for the method polymerase chain reaction. **Results:** of the animals inoculated with the herpes simplex virus we did not get a positive sample. Of those inoculated only with the virus influenza, we find a positive sample in the contra lateral facial nerve. The controls had been negative. **Conclusion:** the virus influenza was found in the left facial nerve of rabbit inoculated with this virus in the external and middle right ears, while the virus herpes simplex type I was not observed in the facial nerve, by the technique of PCR.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)



[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)