PALOMA DE OLIVEIRA TONIETTI

**Avaliação da resposta inflamatória no sistema nervoso central causada
pelo herpesvírus equino tipo 1 utilizando um modelo murino de
neuroinfecção**

São Paulo
2016

PALOMA DE OLIVEIRA TONIETTI

**Avaliação da resposta inflamatória no sistema nervoso central causada
pelo herpesvírus equino tipo 1 utilizando um modelo murino de
neuroinfecção**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Paulo César Maiorka

São Paulo
2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3386
FMVZ

Toniatti, Paloma de Oliveira

Avaliação da resposta inflamatória no sistema nervoso central causada pelo herpesvírus equino tipo 1 utilizando um modelo murino de neuroinfecção / Paloma de Oliveira Toniatti. -- 2016.

146 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Maiorka.

1. EHV-1. 2. Modelo murino. 3. Neurovirulência. 4. Meningoencefalite viral. 5. Mieloencefalopatia herpética equina. 6. Resposta inflamatória. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da resposta inflamatória no sistema nervoso central causada pelo herpesvirus equino tipo 1 utilizando um modelo murino de neuroinfecção", protocolado sob o nº 3097/2013, utilizando 126 (cento e vinte e seis) camundongos, sob a responsabilidade Prof. Dr. Paulo Cesar Maiorka, foi aprovado em reunião de 13/8/2014 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Evaluation of the inflammatory response in central nervous system caused by equine herpesvirus type 1 using a murine model of neuroinfection", protocol number 3097/2013, utilizing 126 (one hundred, twenty six) mice, under the responsibility Prof. Dr. Paulo Cesar Maiorka, was approved in the meeting of day 8/13/2014 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 18 de agosto de 2014.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: TONIETTI, Paloma de Oliveira

Título: Avaliação da resposta inflamatória no sistema nervoso central causada pelo herpesvírus equino tipo 1 utilizando um modelo murino de neuroinfecção

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Amauri Toniatti e Roseli de Oliveira Toniatti

*Aos meus avós, Maurílio Toniatti e Eunice Gonçalves Toniatti, e Luiz Antônio de
Carvalho e Delfina Afonso de Carvalho (in memoriam)*

Ao meu noivo Lucas Garcia Rios

À querida Rebeca (in memoriam)

À querida Pérola

EPÍGRAFE

***“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor,
a eletricidade e a energia atômica: a vontade.”***

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meus caminhos e sempre me fortalecer em todos os momentos de minha vida.

Aos meus queridos pais, Amauri Toniatti e Roseli de Oliveira Toniatti, pela amizade, apoio, carinho em todas as fases da minha vida e principalmente pelo exemplo de dignidade e respeito.

Ao meu noivo Lucas Garcia Rios, pela paciência, carinho e atenção em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Paulo César Maiorka, pela orientação, oportunidade de crescimento, confiança, amizade, conselhos, e grandes ensinamentos, proporcionando a execução deste trabalho.

À Profa. Dra. Claudia Madalena Cabrera Mori, pela coorientação, pelos ensinamentos pessoais e profissionais em todas as etapas deste trabalho, conselhos, sugestões, incentivos e amizade.

Ao pesquisador do Instituto Pasteur, Dr. Enio Mori, pelo auxílio, principalmente na etapa de Biologia Molecular, por todo apoio, sugestões e oportunidade de aprendizado.

À Profa. Dra. Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes, pelos ensinamentos transmitidos, incentivo e apoio durante esse período e pela oportunidade da realização desse trabalho, principalmente na etapa de citometria de fluxo, executada no Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia.

A todos os demais professores do Departamento de Patologia Experimental e Comparada (VPT), pelos momentos agradáveis.

Ao Prof. Dr Paulo Eduardo Brandão pela supervisão durante o estágio no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE).

Às pesquisadoras do Instituto Biológico, Elenice M. S. Cunha, Maria do Carmo C. S. H. Lara e Eliana M.C. Villalobos, pela grandiosa colaboração cedendo os isolados do herpesvírus equino tipo 1 das estirpes A4/72 e A9/92.

Aos pesquisadores do Instituto Pasteur Juliana, Karen, Keila, William, Pedro, Rafael, Carla e Helena pela utilização das instalações e equipamentos do Laboratório de Biologia Molecular, que tornaram possível a realização deste trabalho.

Ao querido Dennis Albert Zanatto, responsável técnico de laboratório no Departamento de Patologia, pelo apoio técnico neste trabalho, pela amizade, dedicação e incentivo para sempre seguir em frente, além dos momentos de risada e descontração.

Aos funcionários do Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia do VPT, Nicolle, Vagner e Herculano, principalmente na etapa da citometria de fluxo, pelos ensinamentos e auxílio nessa fase experimental, pela agradável convivência, momentos de risada e descontração.

Aos funcionários do biotério do Departamento de Patologia, Idalina, Nelsinho, Mauro e Luciana, pelo auxílio na fase de utilização dos animais de laboratório, desde o preparo e limpeza das gaiolas até o cuidado com os camundongos isogênicos utilizados nesse trabalho, pela agradável convivência, momentos de risada e descontração.

Aos camundongos isogênicos, que participaram ativamente deste trabalho, por serem modelos in vivo para novas descobertas e avanços na Medicina Veterinária.

Aos funcionários do Laboratório de Histologia Luciano Antas Bugalho e Cláudio Arroyo, pelo auxílio no processamento histológico das lâminas utilizadas neste trabalho.

À querida amiga Aline Santana da Hora, pelo auxílio na fase experimental e pelo apoio principalmente na etapa da qualificação.

Ao colega do Departamento de Patologia, Leonardo Mesquita, pelo auxílio, principalmente no processamento histológico e análise histopatológica das lâminas, além do apoio em outras etapas experimentais, e na discussão de artigos e metodologias utilizadas, pela paciência, sugestões e incentivos, momentos de risada e descontração.

Às queridas amigas da pós-graduação, Andressa Ferrari Arévalo, Thais Helena Gamon e Vera Lisa Generosa da Silva Paiva, pelo auxílio, principalmente, na necropsia dos camundongos, além de outras etapas experimentais, pela paciência em todos os momentos, conselhos, sugestões, incentivos, e, sobretudo, pela amizade e momentos de risada e descontração.

Ao Prof. Dr. Mário José Abdalla, que cedeu gentilmente o laboratório da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para a obtenção das fotomicrografias dos cérebros dos camundongos; e à querida amiga Karen Linares Ferrari, que me auxiliou na obtenção das fotomicrografias.

À Dra. Elaine Cristina Pereira, pelo auxílio numa fase dificultosa deste período de trabalho.

À Reitoria da Universidade de São Paulo e a todos os professores do Departamento de Patologia, por darem a oportunidade de finalização deste trabalho.

A todos os funcionários da Biblioteca Virginie BuffD'Ápice pela dedicação e revisão da tese.

À Hilka Fátima Frison Mendes Neves e Juliana Tessália Wagatsuma, queridas amigas da graduação, por todos os momentos de amizade, apoio e incentivo.

À Cristina Aurichi e Milena pelo constante auxílio como secretárias da Pós-Graduação.

À Adriana e Milena pelo constante auxílio como secretárias do Departamento de Patologia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de doutorado pelo período de um ano.

À Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP), que proporcionou o suporte financeiro necessário para a realização deste projeto com a bolsa de auxílio pesquisa concedida (nº do processo: 2012/24769-9).

A todos aqueles que de maneira direta ou indireta participaram da minha formação profissional e permitiram que este estudo fosse realizado, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

TONIETTI, P. O. **Avaliação da resposta inflamatória no sistema nervoso central causada pelo herpesvírus equino tipo 1 utilizando um modelo murino de neuroinfecção.** [Inflammatory response in the central nervous system caused by equine herpesvirus type 1 using a mouse model of neuroinfection]. 2016. 146 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

O herpesvirus equino tipo 1 (EHV-1) é um importante patógeno que causa doença respiratória, abortamento e desordens neurológicas em equinos. O presente estudo foi realizado visando avaliar a resposta inflamatória causada pelo EHV-1 por meio da análise das manifestações clínicas, alterações histopatológicas e resposta imune do hospedeiro no sistema nervoso central (SNC). Camundongos das linhagens BALB/c (H2^d), C57BL/6 (H2^b) e C3H/HeJ (H2^k) foram inoculados por via intranasal com as estirpes brasileiras A4/72 e A9/92 do EHV-1. Nesse estudo, associou-se a histopatologia, a resposta de citocinas pró-inflamatórias no SNC de camundongos das diferentes linhagens e o método de transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) para investigar a relação entre a infecção pelo EHV-1 e a resposta inflamatória com o desenvolvimento de lesões. As estirpes brasileiras A4/72 e A9/92 do EHV-1 causaram infecção aguda e letal nas diferentes linhagens de camundongos isogênicos. Os sinais clínicos e neurológicos, tais como perda de peso, pelos arrepiados, postura arqueada, apatia, dispneia, desidratação e sialorreia apareceram entre o 2º e 3º dia pós-infecção (dpi). Essas manifestações foram acompanhadas pelo aumento da sensibilidade a estímulos externos, convulsões, recumbência e morte. As alterações histopatológicas consistiram em necrose neuronal, edema, necrose de liquefação, leptomeningite neutrofílica, manguito perivascular, hemorragia focal, inflamação não supurativa, gliose multifocal e infiltração perivascular de células polimorfonucleares e mononucleares. As características e a extensão das lesões variaram entre as linhagens de camundongos. Animais inoculados com a estirpe A4/72 apresentaram lesões histopatológicas de maior grau de severidade quando comparados com aqueles inoculados com a estirpe A9/92. Observou-se aumento da concentração plasmática de TNF- α , IL-6, CCL2 e IFN- γ

nos camundongos infectados pelo EHV-1 no 2º dpi. Detectou-se aumento da concentração plasmática e da expressão de mRNA para TNF- α , IL-6 e CCL2 no SNC dos camundongos infectados pelo EHV-1 no 3º dpi; entretanto, não houve aumento da concentração plasmática nem da expressão de mRNA para IFN- γ no 3º dpi. Evidenciou-se que a estirpe A4/72 do EHV-1 induz uma resposta imune sistêmica mais efetiva, enquanto que o vírus A9/92 culmina em uma resposta imunológica mais efetiva no SNC. Os camundongos com o fundo genético C57BL/6 e BALB/c mostraram níveis mais altos de expressão de mRNA para TNF- α , IL-6 e CCL2, quando comparados com os C3H/HeJ. A gravidade dos sinais clínicos observados em camundongos infectados pode ser correlacionada com o pico dessas citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6) e da quimiocina CCL2, que são produzidas logo após a infecção viral por células residentes da glia e/ou infiltrativas no SNC. Esses achados indicam que as diferentes linhagens de camundongos isogênicos são susceptíveis à infecção por estirpes neuropatogênicas do EHV-1; as diferenças no padrão de alterações histopatológicas mostram que elas dependem do hospedeiro infectado, da estirpe viral e da resposta imunológica; e a supressão do interferon (IFN) tipo 1 sugere ser um mecanismo de escape do EHV-1 frente ao sistema imune. A baixa expressão de IL-6, TNF- α e da quimiocina CCL2 em camundongos C3H/HeJ se explica pela mutação no gene *toll-like receptor 4* (TLR-4) existente nessa linhagem de camundongo. Adicionalmente, os camundongos C3H/HeJ apresentaram lesões histopatológicas mais severas no SNC quando comparados com BALB/c e C57BL/6. Sugere-se que o IFN tipo I e o gene TLR-4 apresentam importante papel na patogênese do EHV-1 bem como proteínas do agente viral responsáveis pela supressão do IFN e partículas virais que sejam reconhecidas pelo TLR-4 podem ser alvos para o desenvolvimento de novas abordagens para o tratamento da doença viral e para a eficiência de imunógenos.

Palavras-chave: EHV-1. Modelo murino. Neurovirulência. Meningoencefalite viral. Mieloencefalopatia herpética equina. Resposta inflamatória.

ABSTRACT

TONIETTI, P. O. **Inflammatory response in the central nervous system caused by equine herpesvirus type 1 using a mouse model of neuroinfection.** [Avaliação da resposta inflamatória no sistema nervoso central causada pelo herpesvírus equino tipo 1 utilizando um modelo murino de neuroinfecção]. 2016. 146 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The equine herpesvirus type 1 (EHV-1) is an important pathogen that causes respiratory disease, abortion and neurological disorders in horses. This study was conducted to evaluate the inflammatory response caused by EHV-1 by the analysis of clinical manifestations, histopathological changes and the host immune response in the central nervous system (CNS). BALB/c (H2^d), C57BL/6 (H2^b) and C3H/HeJ (H2^k) mice were inoculated intranasally with Brazilian EHV-1 strains A4/72 and A9/92. In this study, joined histopathology, the response of proinflammatory cytokines in the CNS of mice of different strains and reverse transcription method followed by quantitative polymerase chain reaction in real time (RT-qPCR) to investigate the relationship between infection by EHV-1 and inflammatory response in the development of lesions. Brazilian strains A4/72 and A9/92 EHV-1 caused acute lethal infection in different strains of inbred mice. Clinical and neurological signs such as weight loss, the bristly hair, hunched posture, apathy, dyspnoea, dehydration and salivary hypersecretion appeared between 2nd and 3rd day after infection (dpi). These events were accompanied by increase in the sensitivity to external stimuli, convulsions, recumbency and death. Histopathological changes were neuronal necrosis, edema, liquefaction necrosis, neutrophilic leptomeningitis, perivascular cuff, focal hemorrhage, non-suppurative inflammation, multifocal gliosis and perivascular infiltration of polymorphonuclear and mononuclear cells. The characteristics and the extent of the injuries varied between strains of mice. Animals inoculated with the A4/72 strain showed histopathological lesions of greater severity when compared with those inoculated with the A9/92 strain. There was an increase in plasma concentrations of TNF- α , IL-6, CCL2 and IFN- γ in mice infected by EHV-1 in 2nd dpi. Plasma concentrations and the expression of mRNA for TNF- α , IL-6 and CCL2 in the CNS of mice infected with EHV-1 at 3rd dpi were increased; however, there was no

increase in plasma concentration or expression for the mRNA of IFN- γ at 3rd dpi. It was evident that the EHV-1 strain A4/72 induces a more effective systemic immune response, whereas the A9/92 virus culminates in a more effective immune response in the CNS. The C57BL/6 and BALB/c mice showed higher levels of mRNA expression for TNF- α , IL-6 and CCL2, compared to C3H/HeJ mice. The severity of clinical signs observed in infected mice can be correlated with the peak of these pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-6) and CCL2 chemokine, which are then produced after viral infection by resident glial cells and/or infiltrative cells in the CNS. These findings indicate that different strains of inbred mice are susceptible to infection neuropathogenic EHV-1 strains; the differences in the pattern of pathological changes show that they depend on the infected host, the EHV-1 strain and the immune response; and the suppression of interferon (IFN) type I suggested to be an escape mechanism for the EHV-1 against the immune system. The low expression of IL-6, TNF- α and chemokine CCL2 in C3H/HeJ mice can be explained by a mutation in toll-like receptor 4 (TLR-4) gene existing in this mouse strain. Additionally, C3H/HeJ mice exhibited more severe histopathological lesions in the CNS as compared to BALB/c and C57BL/6. It is suggested that type I IFN and TLR-4 gene have important role in the pathogenesis of EHV-1 and viral agent proteins responsible for the suppression of IFN and the viral particles that are recognized by TLR-4 can be targets for the development of new approaches for the treatment of viral disease and the efficiency of immunogens.

Keywords: EHV-1. Mouse model. Neurovirulence. Viral meningoencephalitis. Equine herpes myeloencephalopathy. Inflammatory response.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Associação dos genótipos do EHV-1 com a DNA polimerase das três apresentações da doença. As linhas tracejadas representam os genótipos do EHV-1 com maior potencial para o desenvolvimento de formas específicas da doença.....	33
Figura 2 - Patogênese do EHV-1.....	34
Figura 3 - Latência e reativação do EHV-1. Observam-se partículas virais (círculos vermelhos), linfócitos com partículas latentes (círculos verdes) e partículas ativas (círculo roxo).....	39
Figura 4 - Delineamento experimental.....	55
Figura 5 - Bomba peristáltica utilizada para a perfusão transcardíaca dos camundongos.....	56
Figura 6 - Perfusão transcardíaca utilizando a bomba peristáltica para perfusão de camundongos (MasterFlex - Cole-Parmer®) - São Paulo – 2013	57
Figura 7 - Punção cardíaca terminal - São Paulo – 2013	59
Figura 8 - Preparação dos padrões de citocinas para a citometria de fluxo	60
Figura 9 - [A] Parâmetros FL2 (Anticorpos de detecção) e FL3 (<i>Beads</i> de Captura); e [B] citômetro de fluxo utilizado nesse estudo.....	61
Figura 10 - Gral e pistilo utilizados para macerar os encéfalos dos camundongos, congelados em vapor de nitrogênio líquido, para extração de RNA - São Paulo – 2014.....	62
Figura 11 - Representação esquemática das etapas de extração de RNA total a partir de amostras de encéfalos dos camundongos dos grupos controle e inoculados com as estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1,	

utilizando o <i>kit RNAspin Mini RNA isolation</i> (GE HealthCare) - São Paulo – 2016	63
Figura 12 - Representação esquemática da amplificação do DNA pelo sistema Taqman	66
Figura 13 - Camundongos da linhagem BALB/c inoculados com a estirpe A4/72 no 3º dia pós-infecção (dpi). Animais apresentaram [A] pelos arrepiados, postura arqueada, olhar fixo para um único ponto, [B] desidratação, [C] e [D] perda da propriocepção – São Paulo – 2013.....	72
Figura 14 - Camundongos da linhagem C57BL/6 inoculados com a estirpe A4/72 no 3º dpi. Animais apresentaram [A] convulsões tônico-clônicas, [B] paralisia da cauda e dos membros posteriores [C] <i>head tilt</i> [D] ataxia e perda de equilíbrio – São Paulo – 2013.....	72
Figura 15 - Camundongos da linhagem [A] BALB/c e [B] C57BL/6 inoculados com a estirpe A9/92 no 3º dpi. Animais apresentaram [A] convulsão clônica, [B] paralisia da cauda e dos membros posteriores – São Paulo – 2013	73
Figura 16 - Camundongos da linhagem C3H/HeJ inoculados com a estirpe A4/72 no 3º dpi. Animais apresentaram [A] e [B] convulsão clônica, postura arqueada e [C] e [D] apatia - São Paulo – 2013.....	73
Figura 17 - Camundongos da linhagem C3H/HeJ inoculados com a estirpe A9/92 no 3º dpi. Animais apresentaram [A] piloereção e postura arqueada, [B] andar em círculos e perda de equilíbrio, [C] desidratação e apatia e [D] sialorreia - São Paulo – 2013.....	74
Figura 18 - Fotomicrografias representativas e características das principais alterações microscópicas observadas em SNC de camundongos BALB/c (H ^d) dos grupos controle e infectados pelas estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 – São Paulo – 2016	81
Figura 19 - Fotomicrografias representativas e características das principais alterações microscópicas observadas em SNC de camundongos	

C57BL/6 (H ^b) dos grupos controle e infectados pelas estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 – São Paulo – 2016	82
Figura 20 - Fotomicrografias representativas e características das principais alterações microscópicas observadas em SNC de camundongos C3H/HeJ (H2 ^k) dos grupos controle e infectados pelas estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 – São Paulo – 2016.....	83
Quadro 1 - Fatores de risco para as doenças associadas ao EHV-1	35
Quadro 2 - Distribuição dos camundongos BALB/c (H2 ^d), C57BL/6 (H2 ^b) e C3H/HeJ (H2 ^k) nos grupos controle e inoculados por via intranasal com as estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 na dose infectante de 10 ⁴ DICT ₅₀ /20µL - São Paulo – 2013.....	54
Quadro 3 - <i>Beads</i> de captura contidas no <i>Cytometric Bead Array Mouse Inflammation Kit</i>	61
Quadro 4 - Assays [Oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>) senso e antisenso e sondas internas marcadas com fluoróforos] e seus respectivos números de identificação (<i>Assays ID - part number</i>) utilizados na avaliação da expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias e quimiocina por RT-qPCR - São Paulo – 2016.....	67
Quadro 5 - Valores de p representativos da comparação entre o peso dos animais nos diferentes dias após a inoculação com as estirpes A4/72 e A9/92 – São Paulo – 2016	76
Quadro 6 - Valores de p representativos da comparação entre a variação do peso médio dos animais nos diferentes dias após a inoculação com as estirpes A4/72 e A9/92 na relação entre as diferentes linhagens – São Paulo – 2016	77

Quadro 7 - Valores de p representativos da comparação entre a variação do peso médio dos animais da mesma linhagem nos diferentes dias após a inoculação na relação entre as estirpes A4/72 e A9/92 – São Paulo – 2016.....	77
Quadro 8 - Lesões histopatológicas observadas no SNC conforme a linhagem dos camundongos analisados - BALB/c (H2 ^d), C57BL/6 (H2 ^b) e C3H/HeJ (H2 ^k) – São Paulo 2016.....	80
Quadro 9 - Intensidade das lesões histopatológicas observadas no SNC conforme a localização, a estirpe viral – A4/72 ou A9/92 - e linhagem dos camundongos analisados - BALB/c (H2 ^d), C57BL/6 (H2 ^b) e C3H/HeJ (H2 ^k) – São Paulo 2016.....	80
Quadro 10 - Extensão das lesões nas diferentes regiões do SNC dos camundongos da linhagem BALB/c (H2 ^d) analisados. Os círculos em preto indicam os locais onde as lesões foram observadas – São Paulo - 2016	84
Quadro 11 - Extensão das lesões nas diferentes regiões do SNC dos camundongos da linhagem C57BL/6 (H2 ^b) analisados. Os círculos em preto indicam os locais onde as lesões foram observadas – São Paulo - 2016	84
Quadro 12 - Extensão das lesões nas diferentes regiões do SNC dos camundongos da linhagem C3H/HeJ (H2 ^k) analisados. Os círculos em preto indicam os locais onde as lesões foram observadas – São Paulo - 2016	85
Quadro 13 - Valores de p entre os camundongos inoculados com as estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 no 2º dpi comparados ao grupo controle e aos grupos das diferentes estirpes – São Paulo – 2016	88
Quadro 14 - Valores de p entre os camundongos inoculados com as estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 no 3º dpi comparados ao grupo controle e aos grupos das diferentes estirpes – São Paulo – 2016	91

Quadro 15 - Valores de p entre os camundongos inoculados com as estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 no 3º dpi na comparação entre os valores relativos da expressão de mRNA de IL-6, TNF- α e CCL2 – São Paulo – 2016.....	98
Gráfico 1 - Variação do peso médio dos camundongos BALB/c infectados com as estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 comparados ao grupo controle – São Paulo – 2016	74
Gráfico 2 - Variação do peso médio dos camundongos C57BL/6 infectados com as estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 comparados ao grupo controle – São Paulo – 2016	75
Gráfico 3 - Variação do peso médio dos camundongos C3H/HeJ infectados com as estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 comparados ao grupo controle – São Paulo – 2016	75
Gráfico 4 - Variação do peso médio dos camundongos BALB/c, C57BL/6 e C3H/HeJ infectados com a estirpe A4/72 do EHV-1– São Paulo – 2016	76
Gráfico 5 - Variação do peso médio dos camundongos BALB/c, C57BL/6 e C3H/HeJ infectados com a estirpe A9/92 do EHV-1– São Paulo – 2016	77
Gráfico 6 - Concentração plasmática de IL-6 em camundongos isogênicos no 2º dia após infecção pelo herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1) – São Paulo - 2016	86
Gráfico 7 - Concentração plasmática de IFN- γ em camundongos isogênicos no 2º dia após infecção pelo herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1) – São Paulo – 2016.....	86

Gráfico 8 - Concentração plasmática de TNF- α em camundongos isogênicos no 2º dia após infecção pelo herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1) – São Paulo – 2016.....	87
Gráfico 9 - Concentração plasmática de CCL2 em camundongos isogênicos no 2º dia após infecção pelo herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1) – São Paulo – 2016.....	87
Gráfico 10 - Concentração plasmática de IL-6 em camundongos isogênicos no 3º dia após infecção pelo herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1) – São Paulo – 2016.....	89
Gráfico 11 - Concentração plasmática de CCL2 em camundongos isogênicos no 3º dia após infecção pelo herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1) – São Paulo – 2016.....	89
Gráfico 12 - Concentração plasmática de TNF- α em camundongos isogênicos no 3º dia após infecção pelo herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1) – São Paulo – 2016.....	90
Gráfico 13 - Concentração plasmática de IFN- γ em camundongos isogênicos no 3º dia após infecção pelo herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1) – São Paulo – 2016.....	90
Gráfico 14 - Concentração plasmática de IL-6 em camundongos isogênicos do 2º para o 3º dia após infecção pelo herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1): [A] A4/72 e [B] A9/92 – São Paulo – 2016	93
Gráfico 15 - Diminuição da concentração plasmática de IFN- γ em camundongos isogênicos do 2º para o 3º dia após infecção pelo herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1): [A] A4/72 e [B] A9/92 – São Paulo – 2015	94
Gráfico 16 - Concentração plasmática de CCL2 em camundongos isogênicos do 2º para o 3º dia após infecção pelo herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1): [A] A4/72 e [B] A9/92 – São Paulo – 2016	95

Gráfico 17 - Diminuição da concentração plasmática de TNF- α em camundongos isogênicos do 2º para o 3º dia após infecção pelo herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1): [A] A4/72 e [B] A9/92 – São Paulo – 2016	96
Gráfico 18 - Variação em número de vezes da expressão gênica da quimiocina CCL2 no SNC dos camundongos de diferentes linhagens inoculados com as estirpes neuropatogênicas A4/72 e A9/92 do EHV-1, calculada pelo método $\Delta\Delta Ct$. Os valores relativos (média $\pm$ desvio padrão) representam o número de vezes que a expressão de mRNA no SNC dos camundongos infectados está aumentada em relação ao controle - São Paulo – 2016	100
Gráfico 19 - Variação em número de vezes da expressão gênica da quimiocina TNF- α no SNC dos camundongos de diferentes linhagens inoculados com as estirpes neuropatogênicas A4/72 e A9/92 do EHV-1, calculada pelo método $\Delta\Delta Ct$. Os valores relativos (média $\pm$ desvio padrão) representam o número de vezes que a expressão de mRNA no SNC dos camundongos infectados está aumentada em relação ao controle - São Paulo – 2016	101
Gráfico 20 - Variação em número de vezes da expressão gênica da quimiocina IL-6 no SNC dos camundongos de diferentes linhagens inoculados com as estirpes neuropatogênicas A4/72 e A9/92 do EHV-1, calculada pelo método $\Delta\Delta Ct$. Os valores relativos (média $\pm$ desvio padrão) representam o número de vezes que a expressão de mRNA no SNC dos camundongos infectados está aumentada em relação ao controle - São Paulo – 2016	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Manifestações clínicas da infecção pelas estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 em camundongos das linhagens BALB/c (H2 ^d), C57BL/6 (H2 ^b) e C3H/HeJ (H2 ^k) - São Paulo – 2016.....	71
Tabela 2 -	Variação em número de vezes da expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 e da quimiocina CCL2 no SNC dos camundongos de diferentes linhagens inoculados com as estirpes neuropatogênicas A4/72 e A9/92 do EHV-1, calculada pelo método $\Delta\Delta Ct$. Os valores relativos foram expressos em média $\pm$ desvio padrão - São Paulo – 2016	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs	células apresentadoras de antígenos
ATF-2/c-Jun	fator de transcrição-2/c-Jun
BHE	barreira hematoencefálica
CCL2 (MCP-1)	proteína quimiotática de monócitos 1
CCL3 (MIP-1 α)	proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa
CXCL9 (MIG)	monocina induzida pelo interferon gama
CXCL10 (IP-10)	interferon gama induzido pela proteína 10
CD4	molécula de superfície de linfócitos T com função auxiliadora
CD8	molécula de superfície de linfócitos T com função citotóxica
cDNA	DNA complementar
CBP/P300	proteína de ligação de CREB/ p300
CEUA	comissão de ética no uso de animais
cm	centímetro
cm ²	centímetro quadrado
CO ₂	gás carbônico
CSF	fluido cerebrospinal
CTL	linfócitos T citotóxicos
DCs	células dendríticas
DEPC	dietilpirocarbonato
dL	decilitro
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNAse	desoxirribonuclease
dNTP	nucleotídeos trifosfatados
dpi	dias pós-infecção
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminatetracético
EEV	vírus da encefalite equina venezuelana
EHM	mieloencefalopatia herpética equina
EHV	herpesvírus equino

EHV-1	herpesvírus equino tipo 1
EHV-2	herpesvírus equino tipo 2
EHV-3	herpesvírus equino tipo 3
EHV-4	herpesvírus equino tipo 4
EHV-5	herpesvírus equino tipo 5
ELISA	ensaio de imunoabsorção enzimática
EMEM	meio essencial de Eagle
ERECs	cultura primária de células de epitélio respiratório equino
EUA	Estados Unidos da América
FC	fixação de complemento
FCoV	coronavírus felino
FECV	coronavírus felino entérico
FIPV	vírus da peritonite infecciosa felina
FMVZ/USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
g	grama
gB	glicoproteína B
HE	hematoxilina e eosina
HSV	herpesvírus simplex
ICP4	proteína da célula infectada 4
IFN-I	interferon do tipo 1
IFN- α	interferon alfa
IFN- β	interferon beta
IFN- γ	interferon gama
IFA	imunofluorescência
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
IHQ	imunoistoquímica
IL	interleucina
IRF-3	fator de regulação de interferon 3
ISGs	estimuladores de genes de interferon
JAK-STAT	janus kinase/transdutores de sinal e ativadores de transcrição
Kb	quilobases

Kg	quilograma
LCR	líquido cefalorraquidiano
M	molar
min	minutos
mm	milímetros
mM	milimolar
MDA-5	melanoma associado à diferenciação de proteínas-5
mg	miligrama
MGB	do inglês: <i>minor groove binder</i>
MHC	complexo de histocompatibilidade principal
mL	mililitro
mM	milimolar
mm	milímetro
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
NF- β	fator nuclear <i>kappa</i> β
ng	nanograma
NK	do inglês: <i>natural killer</i>
NRC	National Research Council
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
ORF	do inglês: <i>open reading frame</i>
PAMPs	padrões moleculares associados ao patógeno
PBS	tampão fosfato salino (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	reação em cadeia da polimerase
PFU	unidades formadoras de placas
pH	potencial hidrogeniônico
PRRs	receptores de reconhecimento de padrões
qPCR	reação em cadeia da polimerase quantitativa
q.s.p.	quantidade suficiente para
RFLP	do inglês: <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RIG-I	genes indutores de ácido retinóico-I
RNA	ácido ribonucleico
RNAse	ribonuclease
rRNA	ácido ribonucleico ribossomal

RSV	vírus sincicial respiratório
RT	transcrição reversa
RT-qPCR	transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
SN	soroneutralização
SNC	sistema nervoso central
STAT 1	transdutor de sinal e fator de transcrição 1
STAT 2	transdutor de sinal e fator de transcrição 2
TCID ₅₀	dose infectante 50% em cultura de tecidos
TCRs	do inglês: <i>T cell receptors</i>
Th	linfócitos T auxiliares
Th1	linfócitos T auxiliares que secretam citocinas do tipo 1
Th2	linfócitos T auxiliares que secretam citocinas do tipo 2
TMEV	vírus da encefalomyelite murina de Theiler
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
TNF- β	fator de necrose tumoral beta
TLR	do inglês: <i>toll-like receptor</i>
$\pm$	mais ou menos
<	menor que
%	por cento
°C	grau Celcius
μ g	micrograma
μ L	microlitro
μ m	micrometro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	28
1.1	REVISÃO DE LITERATURA	31
1.1.1	Classificação e etiologia	31
1.1.2	Patogênese do EHV-1	33
1.1.3	Epidemiologia e transmissão	37
1.1.4	Resposta imunológica frente ao EHV-1	40
1.1.5	Sinais clínicos	43
1.1.6	Diagnóstico	46
1.1.7	Tratamento, profilaxia e controle das infecções pelo EHV-1	49
1.1.8	Modelos animais e EHV-1	49
2	OBJETIVOS	51
2.1	OBJETIVO GERAL.....	51
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	52
3.1	HERPESVÍRUS EQUINO TIPO I	52
3.2	CAMUNDONGOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	52
3.3	PERFUSÃO TRANSCARDÍACA	55
3.4	ANÁLISE MACROSCÓPICA E HISTOPATOLÓGICA	57
3.5	COLETA DE SANGUE PARA CITOMETRIA DE FLUXO E DO ENCÉFALO PARA RT-PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL	58
3.6	QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINA NO PLASMA.....	59
3.7	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RNA TOTAL	62
3.8	TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT)	64
3.9	EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS E QUIMIOCINA PRÓ- INFLAMATÓRIAS.....	64

3.10	ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	67
4	RESULTADOS	69
4.1	SINAIS CLÍNICOS.....	69
4.2	ANÁLISE MACROSCÓPICA E HISTOPATOLÓGICA	78
4.3	QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINA NO PLASMA NO 2º DIA APÓS INFECÇÃO	85
4.4	QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINA NO PLASMA NO 3º DIA APÓS INFECÇÃO	88
4.5	QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINA NO PLASMA ENTRE AS LINHAGENS ISOGÊNICAS DE CAMUNDONGOS NOS 2º E 3º DIA APÓS INFECÇÃO	91
4.6	QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINA NO PLASMA DAS LINHAGENS ISOGÊNICAS DE CAMUNDONGOS DO 2º PARA O 3º DIA APÓS INFECÇÃO	92
4.7	EXPRESSÃO GÊNICA DAS CITOCINAS E QUIMIOCINA PRÓ- INFLAMATÓRIAS.....	97
5	DISCUSSÃO	103
6	CONCLUSÃO.....	116
	REFERÊNCIAS	118
	ANEXO	138

1 INTRODUÇÃO

O herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1) é um patógeno de suma importância capaz de ocasionar perdas significativas sob o ponto de vista econômico aos plantéis, fato que o caracteriza como uma ameaça potencial à criação mundial de equinos. Esse agente pode causar diferentes formas de doença em cavalos, das quais as mais comuns são a rinopneumonite equina, o abortamento equino a vírus e a mieloencefalopatia herpética equina (EHM) (MORI, 2005). A EHM é menos comum do que as outras formas de doença determinadas pelo EHV-1. Entretanto, recentemente surtos de manifestações neurológicas têm sido relatados com maior frequência na América do Norte e Europa, resultando na classificação do EHV-1 como causador de doença potencialmente emergente pelo Ministério da Agricultura dos Estados Unidos da América (EUA) (APHIS, 2007; VANDEKERCKHOVE et al., 2010).

Os cavalos têm sido utilizados como hospedeiros naturais para estudo da infecção pelo EHV-1 por diversos pesquisadores, os quais relataram dificuldade em identificar indivíduos que não foram previamente infectados pelo vírus, devido à natureza endêmica desse agente nas populações de equinos. Além do mais, as investigações com cavalos são dispendiosas e geralmente utilizam um número reduzido de animais devido às dificuldades de execução dos experimentos e de manejo (SLATER et al., 1993; SMITH et al., 2000; MORI, 2005). Por outro lado, a disponibilidade de diversas linhagens de camundongos susceptíveis à infecção pelo EHV-1, as semelhanças entre a resposta imune do camundongo e do cavalo e a quantidade de informação disponível sobre características genéticas e biológicas das linhagens de camundongos isogênicos faz dessa espécie um atrativo modelo animal para a investigação da patogênese e dos mecanismos imunológicos responsáveis pela eliminação do vírus (AWAN et al., 1990; MORI et al., 2012).

Os modelos animais utilizados no estudo das encefalites virais foram responsáveis por grande parte do nosso conhecimento atual sobre a infecção e a resposta imune no sistema nervoso central (SNC). A infecção experimental em camundongos com as estirpes nacionais A4/72 e A9/92 do EHV-1, um alfa herpesvírus pertencente à família *Herpesviridae* e ao gênero *Varicellovírus*,

demonstrou ser um excelente modelo para o estudo das alterações no SNC causadas pela encefalite viral (MORI et al., 2006; MORI et al., 2012). Quando inoculado por via intranasal em camundongos, o vírus replica-se nos tecidos linfóides resultando em intensa viremia e, conseqüentemente, atravessa a barreira hematoencefálica (BHE) causando lesões no tecido nervoso. Essa característica é vantajosa em relação a de outros modelos descritos na literatura (LIN et al., 2004), pois permite avaliar os eventos que ocorrem no SNC após a infecção viral, sem a necessidade de inocular o agente diretamente por via intracerebral com conseqüente distúrbio físico da BHE.

Além disso, relatos de literatura demonstraram que camundongos inoculados por via intranasal com o EHV-1 apresentaram lesões no SNC semelhantes às aquelas observadas em cavalos acometidos pela EHM (GOSZTONYI et al., 2009; KASEM et al., 2010; YU et al., 2010). Estudos recentes comprovaram que diferentes linhagens de camundongos desafiadas com estirpes nacionais neuropatogênicas do EHV-1 foram susceptíveis à infecção, exibindo acentuada perda de peso e manifestações respiratórias e neurológicas, tais como, diminuição na propriocepção, hiperexcitabilidade e convulsões no 3º dpi. Constatou-se que as lesões histopatológicas encontradas no encéfalo desses camundongos, tais como hemorragia focal, trombose, manguitos perivasculares, ventriculite, degeneração neuronal, necrose, neuronofagia e gliose multifocal, foram semelhantes às aquelas observadas em cavalos acometidos pela EHM, confirmando que o modelo murino reproduz as alterações observadas no hospedeiro natural (MORI, 2012).

A resistência ou a susceptibilidade das diferentes linhagens de camundongos frente à infecção viral está relacionada a fatores genéticos, particularmente ao complexo de histocompatibilidade principal (MHC) gene H2, determinando assim linhagens susceptíveis (haplotipo H2^d) ou resistentes (haplotipos H2^b e H2^k) à infecção herpética (GUÉNET, 2005). As linhagens resistentes como o C57BL/6 (haplotipo H2^b) tendem a ter resposta predominantemente Th1 caracterizada pela produção de interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral beta (TNF- β) e interleucina-2 (IL-2). Ocorre ativação precoce dos macrófagos e dos mecanismos citotóxicos mediados pelos linfócitos T CD8+, eficazes na eliminação de patógenos intracelulares como os vírus. Ao mesmo tempo esse mecanismo leva a uma extensa destruição dos tecidos infectados. Já as linhagens susceptíveis como o BALB/c

(haplotipo H2^d) possuem padrão de resposta Th2 caracterizada pela produção das interleucinas 4 e 5 (IL-4 e IL-5), estimulando a produção de anticorpos pelos linfócitos B (SHELLAM; FLEXMAN, 1986; DÖRRIES, 2001; SPELLBERG; EDWARDS JR, 2001; WEINBERG et al., 2004).

Awan et al. (1990) observaram variações na susceptibilidade à infecção pelo EHV-1 em camundongos de diferentes linhagens, das quais o C57BL/6 demonstrou titulação viral no tecido respiratório cerca de 10 vezes menor do que o BALB/c. Segundo Frampton et al. (2004), camundongos da linhagem CBA (haplotipo H2^k) servem como modelo para o estudo da doença neurológica causada pelo EHV-1, devido a semelhança das lesões encontradas no cavalo.

Apesar da crescente importância do EHV-1 em populações de equinos no mundo, ainda nos dias de hoje existe um número limitado de publicações sobre o papel das citocinas em resposta à infecção por esse agente (KYDD et al., 2006). Estudos preliminares demonstraram aumento nas concentrações plasmáticas da quimiocina CCL2 e das citocinas TNF- α , e IL-6 em camundongos BALB/c infectados com estirpes neuropatogênicas do EHV-1. Avaliando a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias no SNC, em um modelo de encefalite viral causada por estirpes neuropatogênicas do EHV-1 em camundongos, detectou-se aumento de expressão dos RNAs mensageiros (mRNAs) que codificam para TNF- α , IL-6 e CCL-2. Além do mais, as linhagens de camundongos estudadas apresentaram diferença no padrão de resposta das citocinas e quimiocina expressas no SNC. De modo geral, os valores relativos da expressão de mRNAs para TNF- α , IL-6 e CCL2 foram menores nos camundongos da linhagem BALB/c (H2^d) quando comparados aos camundongos com fundo genético C57BL/6 (MORI, 2012). Contudo, os mecanismos envolvidos na resposta imune sistêmica e no SNC frente à infecção pelo EHV-1 requerem estudos mais detalhados.

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 Classificação e etiologia

O EHV-1 é um DNA vírus, envelopado, classificado na família *Alphaherpesvirinae* e ordem *Herpesvirales* (KING et al., 2011). EHV-1 é um importante agente viral, que acomete equinos e tem grande impacto econômico por causar abortos em éguas prenhes, morte neonatal de potros, doenças respiratórias e EHM (OSTLUND, 1993). Apesar de ser uma manifestação esporádica e relativamente incomum da infecção por EHV-1, a EHM pode causar perdas devastadoras e afetar seriamente a indústria equina, como exemplificado por recentes surtos em escolas de equitação, hipódromos, e hospitais veterinários em toda a América do Norte e Europa (HENNINGER et al., 2007; TRAUB-DARGATZ et al., 2013).

O EHV-1 e o herpesvírus equino tipo 4 (EHV-4) são distinguíveis do herpesvírus equino (EHV) tipo 2, 3 e 5 (EHV-2, EHV-3 e EHV-5) por propriedades biológicas específicas, ensaios de neutralização, teste de impressão digital genética (DNA *fingerprinting*), sequenciamento de DNA, e vários testes imunológicos à base de anticorpos monoclonais para cada vírus. EHV-1 e EHV-4 estão intimamente relacionados, mas antigenicamente e geneticamente distintos e associados com perfis de doenças distintas (ALLEN; BRYANS, 1986; OSTLUND, 1993; CRABB; STUDDERT, 1995).

O EHV-1 é um vírus de DNA linear, fita dupla (TELFORD et al., 1992), que possui um genoma de 150 quilobases (Kb) e codifica para 76 genes. A expressão desses genes dentro das células infectadas ocorre em uma cascata altamente controlada de eventos sequenciais. Um ciclo de replicação completa demora cerca de 20 horas. Durante esse período, ocorre a adesão à membrana celular do hospedeiro, fusão das membranas celular e viral, penetração, translocação de DNA para o núcleo, replicação do DNA viral e síntese de proteínas, montagem do capsídeo e envoltório, e a lise da célula com liberação dos vírions gerados (GRAY et al., 1987).

A primeira caracterização molecular de estirpes do EHV-1 foi descrita com base nos diferentes padrões eletroforéticos de DNA viral obtidos pela endonuclease de restrição (RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*). Os principais padrões eletroforéticos são denominados P e B (ALLEN et al., 1983). Estirpes de EHV-1 isoladas de equinos com distúrbios neurológicos têm sido caracterizadas como sendo do tipo P. As diferenças entre o EHV-1 dos tipos P e B referem-se a mutações no gene *open reading frame* (ORF) 64. Este gene codifica a proteína da célula infectada 4 (ICP4), que pode estar envolvida na neuropatogenicidade do EHV-1 (PAGAMJAV et al., 2005).

Marcadores de virulência que distinguem estirpes de EHV-1 que induzem a EHM e/ou aborto têm sido determinados. A descoberta mais importante pode ser a associação da ocorrência de EHM com um único polimorfismo de nucleotídeo na posição 2254 no gene da DNA polimerase (ORF 30) (NUGENT et al., 2006). A análise de mais de 100 surtos de EHV-1 com diversas apresentações clínicas demonstraram que a variabilidade de um único resíduo de aminoácido na posição 752 da DNA polimerase pode estar fortemente associada com a ocorrência de EHM, com estirpes de EHV-1 associadas a surtos neurológicos envolvendo o genótipo D₇₅₂, ao passo que a maioria dos surtos não neurológicos envolveu o genótipo N₇₅₂ (NUGENT et al., 2006; PERKINS et al., 2009). A observação de que os EHV-1 com o genótipo D₇₅₂ tem maior potencial para induzir EHM foi apoiada em um estudo experimental com vírus recombinantes apresentando diferentes sequências de polimerase (GOODMAN et al., 2007). O vírus mutante N₇₅₂ não causou sinais neurológicos e foi associado à redução dos níveis de viremia. Contudo, a excreção viral foi semelhante entre ambos os mutantes do vírus. Do ponto de vista epidemiológico, parece que a maioria dos EHV-1 circulantes no campo são do genótipo N₇₅₂. Embora os genótipos D₇₅₂ do EHV-1 sejam mais comumente associados à EHM, os vírus com o genótipo N₇₅₂ não são apatogênicos; eles têm sido responsáveis por cerca de 81% a 98% dos focos de aborto nos EUA, Reino Unido e outros países, e entre 15% e 26% dos surtos neurológicos (ALLEN et al., 2008; PUSTERLA et al., 2010) (Figura 1). Estudos recentes com outros vírus, como o coronavírus felino (FCoV), têm investigado marcadores de virulência que possam diferenciar estirpes que induzam a evoluções clínicas distintas, como é o caso do vírus da peritonite infecciosa felina (FIPV) que culmina em uma doença fatal,

enquanto que o coronavírus felino entérico (FECV) causa tipicamente infecções assintomáticas (HORA et al., 2016) (ANEXO A).

Figura 1 - Associação dos genótipos do EHV-1 com a DNA polimerase das três apresentações da doença. As linhas tracejadas representam os genótipos do EHV-1 com maior potencial para o desenvolvimento de formas específicas da doença

Fonte: adaptada de Pusterla e Hussey (2014)

1.1.2 Patogênese do EHV-1

A patogênese de EHV-1 está ilustrada na Figura 2. A infecção primária com EHV-1 ocorre pelo trato respiratório (ALLEN, 2004). Após a infecção, a replicação no epitélio das vias aéreas respiratórias provoca a erosão da mucosa respiratória e eliminação do vírus pelas secreções nasais para o ambiente. Dentro de 12 a 24 horas, o vírus se espalha rapidamente pela membrana basal para as células da lâmina própria e tecidos subjacentes. Após 24 a 48 horas, o vírus pode ser detectado nos linfonodos locais do trato respiratório, onde ocorre a replicação e infecção dos leucócitos (LUNN et al., 2009). Depois da replicação viral nos linfonodos locais, os leucócitos que abrigam o agente infeccioso são liberados na

corrente sanguínea entre o 4º e o 10º dia pós-infecção (dpi) e uma viremia é estabelecida. Essa viremia transporta o vírus para os locais de infecção secundária onde o contato entre leucócitos infectados e o endotélio vascular leva à infecção celular, inflamação, trombose, e necrose do tecido e manifestações de doenças secundárias seguidas de viremia entre o 9º e 13º dpi. Além disso, estudos recentes identificaram também a ativação da cascata de coagulação e deposição/degradação de fibrina durante o estágio virêmico do EHV-1 (GOEHRING et al., 2013).

As doenças secundárias causadas pelo EHV-1 incluem EHM, abortos, morte perinatal e coriorretinopatia. Embora haja uma correlação positiva entre a duração e a magnitude da viremia e a incidência de EHM, há uma pequena porcentagem (aproximadamente 10%) de cavalos virêmicos que posteriormente desenvolvem a EHM. Portanto, deve-se considerar uma combinação de fatores virais e do hospedeiro que culminam no desenvolvimento da EHM (ALLEN, 2008) (Quadro 1).

Figura 2 - Patogênese do EHV-1

Fonte: Adaptada de Pusterla e Hussey (2014)

Quadro 1 - Fatores de risco para as doenças associadas ao EHV-1

<i>Doença respiratória</i>	<i>Aborto</i>	<i>EHM</i>
Abaixo de 2 anos de idade		Acima de 3 anos de idade; risco maior em machos acima de 20 anos de idade (66%)
	Infecção com o genótipo N ₇₂₅	Infecção com o genótipo D ₇₅₂
		Temporada: final do outono, primavera, inverno
		Raça e gênero
		Região geográfica
Exposição passada ao vírus	Exposição passada ao vírus	Exposição passada ao vírus
		Magnitude e duração da viremia
Estresse associado com o desmame, transporte, introdução de novos animais, infecção secundária, imunossupressão.	Estresse associado com o desmame, transporte, introdução de novos animais, infecção secundária, imunossupressão.	Estresse associado com o desmame, transporte, introdução de novos animais, infecção secundária, imunossupressão.
	Gestação no último trimestre	Gestação e éguas com potro ao pé
Presença do EHV-1 e/ou equinos eliminando o vírus no mesmo espaço em que se encontram animais susceptíveis	Presença do EHV-1 e/ou equinos eliminando o vírus no mesmo espaço em que se encontram animais susceptíveis	Presença do EHV-1 e/ou equinos eliminando o vírus no mesmo espaço em que se encontram animais susceptíveis

Fonte: Adaptado de Pusterla e Hussey (2014) e Dunowska (2014)

Atualmente, ainda não estão claros quais fatores virais e do hospedeiro são importantes para a evolução clínica da infecção por EHV-1 num animal isolado. Por exemplo, apesar da similaridade genética e antigênica entre o EHV-1 e o EHV-4, o primeiro tem o potencial de causar uma doença mais grave do que o último (SLATER, 2007). Além disso, a existência de isolados de EHV-1 com diferentes fenótipos biológicos tem sido reconhecida por diversos autores (SMITH et al., 2000; TEARLE et al., 2003; GARDINER et al., 2012). Uma característica específica é que geralmente é observado baixo nível de variabilidade genética entre diferentes isolados de EHV-1 (VAN MAANEN et al., 2000). Por exemplo, há apenas 0,1% de diferença entre as sequências de EHV-1 de estirpes com baixa (V592) e alta virulência (Ab4) (SLATER, 2007). A única diferença observada associada às propriedades biológicas dessas duas estirpes foi o dimorfismo na sequência de DNA da polimerase, codificada pelo gene ORF30. Uma única substituição de asparagina (N) por ácido aspártico (D), na posição 752 de aminoácidos do gene, foi associada com o aumento da neurovirulência (NUGENT et al., 2006). No entanto, nem todos os isolados de EHV-1 com a substituição de N₇₅₂ por D₇₅₂ induz à doença neurológica, e nem todos os casos de doença neurológica causada pelo EHV-1 são associados ao vírus que contém ácido aspártico na posição 752 (D₇₅₂) (PERKINS et al., 2009; CUXSON et al., 2014).

O EHV-1 demonstrou *in vitro* que pode penetrar nas células por diferentes vias, como fusão direta com a membrana citoplasmática ou por endocitose seguida pela fusão com a membrana endossomal (AZAB et al., 2013). O MHC-I (KURTZ et al., 2010) e as integrinas (AZAB et al., 2013) foram identificados como receptores utilizados pelo EHV-1.

Várias glicoproteínas virais e as proteínas do tegumento foram investigadas como potenciais marcadores de virulência (THORMANN et al., 2012). Também tem sido sugerido que a capacidade do vírus para modular a resposta imune do hospedeiro pode afetar sua virulência. Alguns investigadores demonstraram diferenças na expressão de quimiocinas em células mononucleares equinas do sangue periférico infectadas *in vitro* com cepas de diferente patogenicidade do EHV-1 (WIMER et al., 2011). Outra característica viral que tenha sido investigada inclui a capacidade do EHV-1 em regular negativamente a expressão de MHC-I na superfície de células infectadas (RAPPOCCIOLO et al., 2003; AMBAGALA et al.,

2004). Esse recurso tem sido associado às proteínas virais UL56 (MA et al., 2012) e UL49.5 (KOPPERS-LALIC et al., 2008).

1.1.3 Epidemiologia e transmissão

a) *Excreção e disseminação viral*

A infecção por EHV-1 ocorre através da inalação do agente infeccioso (PATEL et al., 1982). As fontes mais comuns incluem secreções respiratórias de cavalos ativamente infectados, fetos ou placentas de abortos ocasionados por EHV-1, e fômites. O período de excreção do EHV-1 a partir do trato respiratório depende da susceptibilidade e do estado imunitário do cavalo infectado bem como das propriedades dos vírus. Animais experimentalmente infectados podem eliminar o EHV-1 a partir do 1º dpi (GARDINER et al., 2012). A maioria dos cavalos cessam a eliminação do vírus dentro de aproximadamente 1 a 2 semanas após a infecção (GIBSON et al. 1992b), embora baixos níveis de EHV-1 tenham sido detectados em um caso no 21º dia após a infecção experimental com EHV-1 (PERKINS et al., 2008). No geral, equinos eliminam EHV-1 a partir de seu trato respiratório tipicamente dentro de 1 a 3 semanas após a infecção. Garanhões infectados podem eliminar EHV-1 em sêmen, embora o significado desse achado para a epidemiologia de EHV-1 ainda não tenha sido estabelecido (TEARLE et al., 1996).

A carga de EHV-1 nas secreções nasais varia entre os equinos, mas os valores exatos relatados são de difícil comparação entre os estudos devido às diferenças nos métodos de amostragem e de laboratório empregados. Por exemplo, os números máximos de vírus vivos em 1 mL de meio utilizado para a coleta de amostras de mucosas nasais foram de aproximadamente 10^3 unidades formadoras de placas (PFU) em um estudo (HUSSEY et al., 2006) e 10^5 PFU em outro (GIBSON et al. 1992a). Utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real para avaliar a carga de DNA viral em secreções nasais de EHV-1 em cavalos infectados observou-se cerca de 10 (HUSSEY et al., 2006) a $4,2 \times 10^4$ (PUSTERLA et al., 2009) cópias de glicoproteína B (gB) virais por nanograma (ng) de DNA.

Outra variável na avaliação da carga de EHV-1 na secreção nasal é o fato de a quantidade de vírus eliminado diferir durante todo o período de excreção para cada equino individualmente (BURGESS et al., 2012). Assim, seria de se esperar ver uma alta variabilidade da carga de EHV-1 em cavalos amostrados apenas uma vez e em diferentes fases de progressão da doença. Independentemente da carga viral, o vírus é altamente infeccioso, com taxas de infecção de até 100% em animais susceptíveis à infecção (ALLEN et al., 2004).

b) *Latência e reativação viral*

Sob condições apropriadas, o vírus latente pode ser reativado, o que é denominado recrudesência. O EHV-1 estabelece latência no gânglio trigêmeo e linfócitos T. Partículas infecciosas do vírus não são produzidas por células infectadas de forma latente (DUNOWSKA, 2014). O vírus pode ser reativado pela administração experimental de doses elevadas de glicocorticóides (EDINGTON et al., 1985). Dessa forma, as condições de estresse, como transporte e competições, têm o potencial de induzir o recrudesimento do EHV-1. O recrudesimento do vírus também pode ocorrer em animais imunocomprometidos. Esse último pode proporcionar uma explicação para uma circulação silenciosa de EHV-1 entre éguas prenhes, fase em que se observa uma imunossupressão fisiológica em equinos (NORONHA; ANTCZAK, 2012). A recrudesência de EHV-1 latente pode (GIBSON et al., 1992a) ou não (EDINGTON et al., 1985) ser acompanhada de doença clínica. Em ambos os casos, cavalos com infecção latente podem reativar a infecção pelo recrudesimento do EHV-1 no trato respiratório, e, portanto, tornarem-se uma fonte de infecção de EHV-1 para animais susceptíveis (Figura 3).

A infecção respiratória inicial que levou ao estabelecimento de latência pode ter iniciado em qualquer momento da vida do hospedeiro no passado, possivelmente meses a anos antes do aborto ou doença neurológica causados pelo EHV-1 (ALLEN, 2006). Isso proporciona um desafio para o diagnóstico e controle de doenças associadas ao EHV-1.

Figura 3 - Latência e reativação do EHV-1. Observam-se partículas virais (círculos vermelhos), linfócitos com partículas latentes (círculos verdes) e partículas ativas (círculo roxo)

Fonte: Adaptada de Dunowska (2014)

1.1.4 Resposta imunológica frente ao EHV-1

Tal como acontece com outras infecções virais, tanto a resposta imune humoral como a mediada por células são desencadeadas em equinos infectados ou vacinados (SOBOLL et al., 2006; PAILLOT et al., 2007). Uma resposta efetiva do hospedeiro contra a infecção viral no SNC é o principal fator que determina a evolução da EHM. A resposta imune é responsável por conter e controlar a replicação do agente; paradoxalmente, essa mesma resposta pode contribuir para o desenvolvimento das lesões no SNC (DÖRRIES, 2001).

Após a infecção há um curto período de imunidade que proteja contra a reinfecção com EHV-1. Embora os anticorpos neutralizantes do vírus reduzam a excreção viral nasal, linfócitos T citotóxicos (CTL) desempenham um papel mais importante na proteção contra a doença clínica (KYDD et al., 2003). A imunidade após a infecção ou vacinação é insuficiente para oferecer uma proteção, especialmente contra EHM. Essa falta de indução de imunidade protetora contra o EHV-1 é provavelmente causada pelas propriedades imunomoduladoras do vírus (AMBAGALA et al., 2004).

Na resposta imune inata contra os vírus, atuam principalmente as células dendríticas (DCs), o interferon do tipo I (IFN-I), células *natural killer* (NK) e os componentes ativos do sistema complemento. A resposta imune adquirida é mediada por células (linfócitos T) e por moléculas circulantes (anticorpos), produzidas por células derivadas dos linfócitos B (ABBAS et al., 2000).

Os epítomos virais, genericamente denominados padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), (ABBAS et al., 2000) são reconhecidos pelos chamados receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que incluem *toll-like receptors* (TLRs), genes indutores de ácido retinóico-I (RIG-I) e melanoma associado a diferenciação de proteínas-5 (MDA-5). Esses PRRs recrutam várias quinases que fosforilam e ativam fatores de transcrição incluindo o fator regulatório de interferon 3 (IRF-3), a ativação do fator de transcrição-2/c-Jun (ATF-2/c-Jun) e fator nuclear *kappa* β (NF- β). Esses fatores de transcrição ativados associam-se com a proteína de ligação de CREB/ p300 (CBP/P300), agindo como coativadores no núcleo para

formar o acentuassomo do IFN- β , o que induz a transcrição de genes de IFN- β (MOSSMAN; ASHKAR, 2005; PICHLMAIR; REIS; SOUSA, 2007). Sinais de IFN- β secretados através da via de sinalização janus kinase/transdutores de sinal e ativadores de transcrição (JAK-STAT) induz a transcrição de certo número de estimuladores de genes de INF (ISGs) proporcionando resistência antiviral global que limita a replicação e propagação do vírus às células vizinhas (MOSSMAN et al., 2001).

O contato dos PAMPs com os PRRs das DCs é fundamental para dar início à estimulação dessas próprias células e fazer com que elas processem adequadamente os antígenos virais e os apresentem às diferentes populações de linfócitos; as DCs são capazes de processar esses antígenos e associá-los às moléculas do MHC. Os antígenos virais capturados no exterior das células, também denominados antígenos exógenos, são processados e unidos ao MHC-II e apresentados aos linfócitos T auxiliares (Th), enquanto que os antígenos virais produzidos dentro das DCs, denominados de antígenos endógenos, são unidos ao MHC-I e apresentados aos CTL. O reconhecimento de antígenos pelos linfócitos T requer que o antígeno seja previamente processado e apresentado por células apresentadoras de antígenos (APCs), as quais disponibilizam o antígeno viral em um contexto favorável para reconhecimento pelos linfócitos. A forma de reconhecimento de antígenos pelos linfócitos depende basicamente da associação desse antígeno com as moléculas do MHC presentes nas APCs (ABBAS et al., 2000). Em geral, as moléculas do MHC de classe I apresentam antígenos para os CTL, enquanto os linfócitos Th utilizam as moléculas de classe II (SELLERS et al., 2012).

Os linfócitos Th reconhecem antígenos virais por meio de receptores de membrana, denominados TCRs (*T cell receptors*), juntamente com a molécula acessória CD4. Por isso, são também chamados de linfócitos T CD4+. A estimulação induzida pelos linfócitos Th é mediada pela secreção de citocinas. A subpopulação de linfócitos Th1 secreta predominantemente TNF- α , IFN-I, IL-2 e IL-12 e estimula preferencialmente uma resposta imune do tipo celular (linfócitos CTL, DCs, células NK e macrófagos), enquanto que a subpopulação de linfócitos Th2 secreta IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 e estimula preferencialmente uma resposta imune humoral. Essas citocinas possuem papel importante na ativação, proliferação

e diferenciação de linfócitos B e secreção de anticorpos. Ou seja, as citocinas produzidas pelos linfócitos Th em resposta ao antígeno estimulam tanto a resposta celular quanto a resposta humoral. O balanço entre as respostas do tipo Th1 e Th2 depende da biologia de cada vírus e de suas interações com o sistema imunológico. Os CTLs reconhecem proteínas virais por meio dos TCRs, juntamente com a molécula acessória CD8. Por isso, essas células são também chamadas de linfócitos T CD8+. A resposta imune humoral é mediada por imunoglobulinas (anticorpos) produzidas por plasmócitos, os quais resultam da proliferação e diferenciação de linfócitos B maduros presentes nos órgãos linfoides secundários (AHMED; BIRON, 1998; ABBAS et al., 2000).

O sistema complemento é composto por um conjunto de proteínas presentes no plasma sanguíneo na forma inativa. Essas proteínas podem ser ativadas pela presença de complexos imunes, formados pela ligação de imunoglobulinas com antígenos (via clássica de ativação), pela deposição espontânea do componente C3b do complemento na superfície de micro-organismos (via alternativa) ou devido à ligação com proteínas que se ligam à manose (via da lecitina). A ativação do complemento por qualquer uma dessas vias resulta em uma cascata de ativação sequencial, com a formação de moléculas intermediárias que possuem diversas atividades biológicas, principalmente ligadas à ativação do processo inflamatório. Dentre as funções dos componentes ativados do complemento, destacam-se opsonização; quimiotaxia e ativação de neutrófilos e outras células inflamatórias; degranulação de mastócitos com consequente vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar (AHMED; BIRON, 1998; ABBAS et al., 2000).

Há um consenso geral entre os pesquisadores de que a imunidade celular e proteção da mucosa são mais importantes do que a resposta humoral na infecção pelo EHV-1 (KYDD et al., 2012). O papel dos linfócitos T, principalmente CD4+ e CD8+, na resposta contra a infecção viral no SNC é fortemente influenciado por características intrínsecas ao hospedeiro. Em geral, o recrutamento rápido de populações específicas de linfócitos T, acompanhado pela secreção precoce de anticorpos neutralizantes, limita a disseminação do vírus e reduz a resposta inflamatória no tecido nervoso. Já uma resposta tardia e inespecífica, com baixa produção de anticorpos neutralizantes, permite a disseminação viral pelo SNC e,

consequentemente, induz intensa infiltração de linfócitos T que contribuem para o desenvolvimento da doença (DÖRRIES, 2001).

A resposta inflamatória contra vírus no SNC é mediada por macrófagos e células da glia, que liberam citocinas como INF- α e β , IL-1 e IL-6 e TNF- α , além de INF- γ , constituindo a primeira linha de defesa do organismo. Os neurônios também podem sintetizar TNF- α e IL-1 (BREDER et al., 1988). As citocinas são fundamentais para a diferenciação, amplificação e regulação da resposta imune. Os interferons estimulam linfócitos T CD8+ e células NK, que lisam células infectadas, enquanto que outras citocinas ativam linfócitos T CD4+, que liberam INF- γ e promovem a síntese de anticorpos pelos linfócitos B (BABIUK et al., 1996).

Os herpesvírus, incluindo o EHV-1, evoluíram mecanismos para escapar da resposta imune do hospedeiro (VAN DER MEULEN et al., 2006; MA et al., 2013). Um deles é a capacidade do EHV-1 em regular negativamente a expressão de proteínas do MHC tipo I em células infectadas (MA et al. 2012), o que resulta em evitar a lise de células mediada pelas células NK. Outros mecanismos de evasão incluem o desenvolvimento de latência (EDINGTON et al., 1994), a interferência na citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (STOKES; WARDLEY, 1988), e a supressão da ativação dos linfócitos através de interações com as citocinas do hospedeiro (COOMBS et al., 2006).

1.1.5 Sinais clínicos

As manifestações clínicas da infecção por EHV-1 incluem a doença respiratória primária (GILKERSON et al., 1999), abortos (CARRIGAN et al., 1991), morte neonatal (FRYMUS et al., 1986), EHM (HENNINGER et al., 2007), e coriorretinopatia (PUSTERLA; HUSSEY, 2014). A existência de EHV-1 com diferentes potenciais patogênicos têm sido descrita por diversos autores (PATEL et al., 1982; TEARLE et al., 2003). Além de fatores virais, também existem as variáveis do hospedeiro e do ambiente que podem influenciar na evolução clínica da infecção pelo EHV-1.

a) Doença respiratória

A infecção do trato respiratório com EHV-1 pode ser leve ou assintomática em animais mais velhos ou já expostos anteriormente ao vírus (ALLEN, 2004). Em contrapartida, a doença respiratória observada em cavalos mais jovens é frequentemente severa. Ela tem a duração de 2 a 3 semanas e é caracterizada por uma febre bifásica, depressão, anorexia, tosse, e descarga nasal e ocular que, inicialmente, é serosa e, em seguida, torna-se mucopurulenta. Os cavalos, geralmente, desenvolvem uma linfadenopatia significativa dos gânglios linfáticos do trato respiratório inferior acompanhada de linfopenia e neutropenia por vários dias. A doença no trato respiratório inferior pode ser observada em potros e, geralmente, se associa com infecção bacteriana secundária, taquipneia, anorexia e depressão (PUSTERLA; HUSSEY, 2014).

b) Doença neonatal

A infecção pelo EHV-1 de uma égua próximo do momento do parto pode resultar no nascimento de um potro fraco, severamente leucopênico (DIXON et al., 1978). Não se sabe até o momento se os potros tornam-se infectados *in utero*, durante o parto ou logo após o nascimento. Potros infectados, tipicamente, morrem nos primeiros dias de vida. Aqueles que sobrevivem por mais tempo desenvolvem pneumonia progressiva que é complicada por infecções bacterianas secundárias, e morrem com cerca de 2 semanas de idade (SLATER, 2007).

c) Aborto

O EHV-1 também é uma causa de abortos tardios e parto prematuro de potros que morrem logo após o nascimento. As éguas infectadas com EHV-1 podem parecer saudáveis e abortar de 2 semanas a vários meses após a infecção ou reativação do vírus (ALLEN, 2004). O aborto ocorre normalmente no último trimestre da gestação e a placenta é expelida juntamente com o feto, que morre de asfixia ou

logo após o nascimento. Ocasionalmente, potros que nascem aparentemente saudáveis, adoecem no prazo de 2 dias após o nascimento e apresentam dispneia, febre, fraqueza, diarreia e leucopenia (PUSTERLA; HUSSEY, 2014).

d) Doença neurológica

A doença neurológica causada pelo EHV-1 é muitas vezes referida como mieloencefalopatia causada pelo herpesvírus equino ou EHM. Ela pode ocorrer de forma esporádica ou como um surto (DUNOWSKA, 2014). Ela é caracterizada por doença respiratória ligeira a moderada e febre. Os sinais clínicos aparecem após o início da viremia, muitas vezes, na sequência de um pico de febre e na ausência de doença respiratória secundária. O início da EHM normalmente ocorre repentinamente. Ela pode ocorrer durante ou no final da fase virêmica (LUNN, 1989). Os sinais clínicos variam de ataxia leve e temporária à paralisia que pode levar ao decúbito e incontinência urinária, muitas vezes resultando em eutanásia. Comumente, a medula espinhal caudal é afetada mais severamente, o que resulta em fraqueza dos membros posteriores, disfunção da bexiga, e déficits sensoriais na área perineal. Casos graves de EHM podem mostrar paresia, paralisia, ou mesmo tetraplegia. Menos frequentemente, cavalos com EHM podem desenvolver doenças vestibulares caracterizadas por depressão, decúbito, inclinação da cabeça, ataxia, e déficits de nervos cranianos. Ainda não está claro se a infecção inicial de células endoteliais do SNC é suficiente para ocasionar a neuropatogenicidade do vírus, ou outros fatores do hospedeiro impulsionam a patogênese da EHM (PUSTERLA; HUSSEY, 2014).

e) Corioretinopatia

A corioretinopatia por EHV-1 causa lesões permanentes da retina em uma proporção substancial de cavalos infectados. No entanto, muitas vezes as lesões oculares não são relacionadas à infecção por EHV-1. Recentemente, demonstrou-se

que até 80% dos cavalos de um ano podem exibir lesões clássicas após a infecção experimental com EHV-1 (HUSSEY et al., 2013).

As lesões oculares afetam principalmente a vasculatura coroide e aparecem entre 4 semanas e 3 meses após a infecção primária. As lesões podem ser focal, multifocal ou, em raras ocasiões, difusa, afetando todo o olho. Clinicamente, apenas lesões difusas têm um impacto significativo e podem causar a perda de visão (PUSTERLA e HUSSEY, 2014).

1.1.6 Diagnóstico

O diagnóstico *ante-mortem* da infecção pelo EHV-1 apresenta limitações, que estão intrinsecamente ligadas às características biológicas do vírus, entre elas a capacidade do vírus em ficar latente, o que faz com que ele não seja eliminado e não seja facilmente acessível (por exemplo, estar dentro do gânglio trigeminal) (DUNOWSKA, 2014).

Para o diagnóstico laboratorial do EHV-1 são normalmente utilizadas a contagem de células sanguíneas, a análise do fluido cerebrospinal (CSF) (WILSON, 1997), PCR (PUSTERLA et al., 2008; PUSTERLA et al., 2009a,b), análise sorológica (MCCARLAN et al., 1995), isolamento viral e exame histopatológico (PUSTERLA; HUSSEY, 2014).

Na contagem de células sanguíneas podem ser observadas leve anemia e linfopenia nos estágios iniciais da doença, seguida por hiperfibrinogenemia suave alguns dias depois. Azotemia e hiperbilirrubinemia podem ocorrer secundárias à desidratação e anorexia, respectivamente (WILSON, 1997).

A análise do CSF normalmente revela xantocromia, um aumento da concentração de proteína (100-500 mg/dL), e um aumento do quociente de albumina, o que reflete vasculite com extravasamento de proteínas no CSF. A contagem de células nucleadas no líquido cefalorraquidiano (LCR) é geralmente normal (0-5 células/mL), podendo estar ocasionalmente aumentada. A localização

da coleta do LCR é uma limitação, podendo influenciar os resultados citológicos (WILSON, 1997).

Por sua vez, a PCR é utilizada em função da sua alta sensibilidade e especificidade desde que haja *primers* adequados. A detecção do DNA do EHV-1 é realizada rotineiramente em secreções nasais ou a partir de amostras de sangue não coagulado. Uma evolução da PCR, a reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) permite a caracterização do estágio da doença em conjunto com a detecção do agente viral (PUSTERLA et al., 2008; PUSTERLA et al., 2009a,b). A PCR direcionada ao gene ORF30 tem sido desenvolvida e utilizada para diferenciar os isolados de EHV-1 de equinos com e sem sintomatologia neurológica. No entanto, a genotipagem de isolados de campo precisa ser interpretada com cuidado, pois cerca de 14% a 24% de isolados de EHV-1 de cavalos com EHM não tem o marcador neuropatogênico (Figura 1) presente nessa região do genoma viral (NUGENT et al., 2006; PERKINS et al., 2009).

A detecção de anticorpos no soro de equinos com suspeita de infecção pelo EHV-1 pode ser realizada por soroneutralização (SN), fixação de complemento (FC) e ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (OIE, 2008). Nas infecções por EHV-1, observa-se um aumento de 4 vezes ou mais no título de anticorpos em amostras de soro coletadas na fase aguda e na fase convalescente da enfermidade (geralmente intervalo de 14 a 21 dias) (LUNN et al., 2009). A imunidade humoral contra o EHV-1 é relativamente de curta duração. Anticorpos neutralizantes e fixadores de complemento aparecem cerca de 2 semanas após a infecção e tanto IgG como IgM podem ser detectados. Anticorpos fixadores de complemento tem meia vida curta e desaparecem em cerca de 3 meses, enquanto que anticorpos neutralizantes podem persistir por mais de 1 ano (PAILLOT et al., 2008).

Entretanto, a SN não permite a diferenciação entre os anticorpos induzidos após a infecção pelo EHV-1 ou EHV-4 devido à reatividade sorológica cruzada entre esses dois agentes. Além disso, os testes sorológicos convencionais não permitem a diferenciação dos anticorpos vacinais daqueles induzidos pela infecção natural (PATEL; HELDENS, 2005; FOOTE et al., 2006).

Outros testes sorológicos que podem identificar o EHV-1 são o teste de imunofluorescência (IFA) e a imunoistoquímica (IHQ). Essas técnicas têm sido

utilizadas para demonstrar a presença de antígenos virais em cortes de tecidos congelados e/ou em células infectadas (FRANCO, 2012).

O isolamento viral é considerado a técnica padrão ouro para fazer um diagnóstico laboratorial de infecção por EHV-1 e deve ser utilizada, especialmente, durante os surtos de EHM, concomitante com a utilização de testes rápidos de diagnóstico, como a qPCR, para a caracterização molecular do isolado viral. A probabilidade de isolar EHV-1 durante os surtos de doença neurológica aumenta quando a coleta das amostras (*swab* nasofaríngeo e creme leucocitário) desses animais é feita durante o período prodrômico antes que os sinais neurológicos se desenvolvam (PUSTERLA; HUSSEY, 2014).

Ao exame histopatológico, observam-se inflamação, necrose e corpúsculos de inclusão intranucleares nos epitélios nasal, faríngeo e, ocasionalmente, traqueal, e nos centros germinativos dos linfonodos mandibulares, faríngeos e bronquiais (ALLEN; BRYANS, 1986; EDINGTON et al., 1986; KYDD et al., 1994). Estudos demonstraram que muitas das lesões são vasculares com trombos nos vasos da mucosa nasal e vasculite pulmonar (JACKSON et al., 1977; EDINGTON et al., 1986; WHITWELL; BLUNDEN, 1992; KYDD et al., 1994). Em éguas prenhes infectadas pelo EHV-1, observa-se o endométrio congesto, com edema perivascular, áreas extensas de isquemia associada à necrose vascular e infiltração perivascular de linfócitos, neutrófilos e monócitos (SMITH et al., 1992; CARLTON; MCGAVIN, 1995).

O exame histopatológico do cérebro e da medula espinhal é essencial na confirmação da infecção pelo EHV-1 em um cavalo com suspeita de EHM. Nela se observam trombos nos vasos da substância branca e cinzenta do sistema nervoso central e leptomeningite, seguida por vasculite focal e necrose do tronco cerebral, cérebro e substância branca da medula espinhal (JACKSON et al., 1977; EDINGTON et al., 1986; WHITWELL; BLUNDEN, 1992).

1.1.7 Tratamento, profilaxia e controle das infecções pelo EHV-1

Até o momento não há tratamento específico para o EHV-1 (PUSTERLA; HUSSEY, 2014). Para os casos de EHM, é feito tratamento suporte, que se baseia na redução da inflamação associada à vasculite, por meio do uso de anti-inflamatórios e sequestrantes de radicais livres (PUSTERLA et al., 2009); e na utilização de medicações específicas contra herpesvíroses (HENNINGER et al., 2007; VISSANI et al., 2016).

A profilaxia e controle das herpesvíroses equinas consistem, essencialmente, em medidas de higiene e manejo adequadas associadas à vacinação (SLATER, 2007). Uma vacinação eficiente contra o EHV-1, com a indução da imunidade protetora de longa duração ainda não está disponível comercialmente. O aumento da ocorrência de surtos de EHV-1 em nível mundial, particularmente com a apresentação neurológica, tem resultado numa reavaliação dos imunógenos utilizados atualmente para o controle da infecção em rebanhos equinos (VAN DE WALLE et al., 2010).

As medidas profiláticas também englobam a restrição de movimentação de equinos e o isolamento de animais com sintomas respiratórios; separação de éguas prenhes de outras categorias de animais, principalmente onde existam equinos jovens que são mais susceptíveis à infecção respiratória; evitar situações de estresse como desnutrição, transporte e superlotação, evitando assim possíveis reativações de infecções latentes (CHRINSIDE et al., 2000; FRANCO, 2012).

1.1.8 Modelos animais e EHV-1

Os primeiros modelos, que usaram inoculação experimental por EHV-1 consistiram na infecção pela via intracerebral em camundongos lactentes (PATEL; EDINGTON, 1983; NOWOTNY et al., 1987) e na inoculação intranasal e intraperitoneal em hamsters (WILKS; COGGINS, 1977; STOKES et al., 1989). Esses estudos apresentaram limitações, pois utilizaram vias de infecção que diferem do

que ocorre naturalmente, além de produzirem doença clínica diferente do que ocorre nas infecções naturais. Subsequentemente, a infecção induzida pelo EHV-1 num modelo murino demonstrou muitas das características observadas na infecção do hospedeiro natural com tal agente viral. Esse estudo utilizou camundongos infectados por via intranasal sob anestesia geral (AWAN et al., 1990). Estudos têm sido realizados para identificar linhagens de camundongos susceptíveis ao EHV-1. Comumente, os camundongos BALB/c têm sido utilizados, visto que outras linhagens de camundongos demonstraram uma menor receptividade à infecção (AWAN et al., 1990; WALKER et al., 1998b). No entanto, Alber et al. (1995) demonstraram que a infecção de EHV-1 nas linhagens de camundongos C3H (H-2^k) produziu respostas imunológicas mais pronunciadas do que em camundongos BALB/c.

O desenvolvimento de um modelo murino levou a um considerável número de estudos com o objetivo de investigar a patogênese e a resposta imune do EHV-1 em camundongos (FIELD et al., 1992; AZMI; FIELD, 1993a,b; INAZU et al., 1993; ALBER et al., 1995; AWAN et al., 1995; BAXI et al., 1995; CSELLNER et al., 1995; MARSHALL; FIELD, 1997; BARTELS et al., 1998; SMITH et al., 1998b; WALKER et al., 1998a,b). Do mesmo modo, esse modelo animal tem sido usado para investigar a eficiência de imunógenos frente ao EHV-1 (TEWARI et al., 1994, 1995; OSTERRIEDER et al., 1995; STOKES et al., 1996, 1997; KUKREJA et al., 1998a,b; PACKIARAJAH et al., 1998; RUITENBERG et al., 1998), o efeito de antivirais na infecção por EHV-1 (FIELD; AWAN, 1990; GIBSON et al., 1992b; AWAN; FIELD, 1993), e a patogenicidade de diferentes estirpes de EHV-1 (VAN WOENSEL et al., 1995; COLLE et al., 1996).

Recentemente, Kanitz et al. (2015) demonstraram que a inoculação intranasal de coelhos com a estirpe Kentucky D do EHV-1 resultou no desenvolvimento da doença semelhante, em muitos aspectos, à patogênese da infecção nos hospedeiros naturais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- 1) Avaliar a resposta inflamatória causada pelo EHV-1 por meio da análise das manifestações clínicas, alterações histopatológicas e resposta imune do hospedeiro no SNC utilizando diferentes linhagens de camundongos infectados com estirpes neuropatogênicas do EHV-1.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Quantificar a concentração plasmática das citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α , IL-6) e da quimiocina MCP-1 (CCL2), pelo método de citometria de fluxo, em camundongos das linhagens isogênicas BALB/c (H2^d) e C57BL/6 (H2^b) e C3H/HeJ (H2^k), infectados pelo EHV-1.
- 2) Quantificar a expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α , IL-6) e da quimiocina CCL2 pela transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) no SNC de camundongos das linhagens isogênicas BALB/c (H2^d) e C57BL/6 (H2^b) e C3H/HeJ (H2^k), infectados pelo EHV-1.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 HERPESVÍRUS EQUINO TIPO I

As estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 utilizadas nesse estudo foram isoladas a partir de tecidos de fetos equinos abortados e de um caso de mortalidade perinatal no Brasil (REINER et al., 1972; CUNHA et al., 1993; CARVALHO et al., 2012). A identidade desses isolados foi confirmada pela PCR, e posterior sequenciamento nucleotídico do DNA do gene regulador transcricional (números de acesso no GenBank: EU094657 e EU094655, respectivamente) (MORI et al., 2012). Os isolados virais foram cultivados em células E-Dermal (CCL-57, ATCC) no Instituto Biológico de São Paulo, Brasil e mantidos em meio essencial de Eagle (EMEM) suplementados com 10% de soro fetal bovino e incubados a 37°C em câmara úmida com atmosfera de 5% de CO₂. A estirpe A9/92 do EHV-1 foi submetida a no máximo três passagens *in vitro* e, conseqüentemente, classificada como estirpe viral de baixa passagem. Já a estirpe A4/72 foi submetida a 14 passagens *in vitro*, sendo considerada uma estirpe viral com elevado número de passagem em cultivo celular.

3.2 CAMUNDONGOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Cento e vinte e seis camundongos com oito semanas de idade, fêmeas, das linhagens BALB/c (H2^d), C57BL/6 (H2^b) e C3H/HeJ (H2^k), compondo 42 animais de cada linhagem, foram provenientes do biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP). As condições climáticas e do ambiente foram controladas com temperatura entre 22 e 24°C, umidade relativa do ar entre 40 e 60% e fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, no qual as luzes acendiam as 6:00 horas e apagavam as 18:00 horas. Os camundongos infectados e controles foram alojados separadamente em mini-isoladores de polisulfona medindo 20×32×21 cm (422 cm²), com canudos de papel dispostos dentro das gaiolas para o enriquecimento

ambiental. Água filtrada e autoclavada e ração comercial peletizada para camundongos (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes SA., Curitiba, PR) foram fornecidas *ad libitum*. As condições de alojamento e manejo dos animais estavam de acordo com as normas éticas internacionais, em especial àquelas do National Research Council (NRC) 2010. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) da FMVZ/USP (número do protocolo: 3097/2013 CEUA FMVZ/USP).

Os animais foram divididos em 3 grupos (controle, A4/72 e A9/92) com 6 animais por grupo para os testes laboratoriais de expressão gênica e quantificação de citocinas e quimiocina pró-inflamatórias, e em 4 animais por grupo para o exame histopatológico (Quadro 2 e Figura 4).

As suspensões das estirpes virais A4/72 e A9/92 do EHV-1 utilizadas para a infecção dos camundongos por via intranasal foram preparadas em EMEM para fornecer 20 µL de inóculo contendo 10^4 TCID₅₀ (dose infectante 50% em cultura de tecidos) de cada vírus. Os camundongos de cada linhagem foram inoculados por via intranasal, sob anestesia inalatória com sevofluorano (Sevorane®, Cristália, Itapira, SP), com 20 µl de EMEM contendo a suspensão de vírus com as estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1, respectivamente. Os camundongos dos grupos controle foram tratados de forma idêntica aos experimentais e receberam 20 µl de meio EMEM por via intranasal. Para cada vírus testado, 12 camundongos foram divididos em 3 grupos de 4 animais de cada linhagem para o exame histopatológico, e 18 camundongos foram divididos em 3 grupos de 6 animais de cada linhagem para a análise da expressão gênica e da quantificação de citocinas e quimiocina pró-inflamatórias (Quadro 2 e Figura 4). Os camundongos foram avaliados duas vezes ao dia, até o 3º dpi. Os sintomas como apatia, pelos arrepiados, postura arqueada, alterações respiratórias e neurológicas e o peso corpóreo de cada animal foi registrado diariamente. Os camundongos que apresentavam sintomas graves de encefalite viral, tais como paralisia espástica e convulsões foram eutanasiados pela administração de *overdose* de anestésico (Sevorane®, Cristália, Itapira, SP).

Quadro 2 - Distribuição dos camundongos BALB/c (H2^d), C57BL/6 (H2^b) e C3H/HeJ (H2^k) nos grupos controle e inoculados por via intranasal com as estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 na dose infectante de 10⁴ DICT₅₀/20μL - São Paulo – 2013

Grupos	Linhagens	Número de camundongos		
		Exame histopatológico	Expressão gênica e quantificação de citocinas e quimiocina pró-inflamatórias	
			2º dpi	3º dpi
EHV/1 A4/72	BALB/c (H2 ^d)	4	6	6
	C57BL/6 (H2 ^b)	4	6	6
	C3H/HeJ (H2 ^k)	4	6	6
EHV/1 A9/92	BALB/c (H2 ^d)	4	6	6
	C57BL/6 (H2 ^b)	4	6	6
	C3H/HeJ (H2 ^k)	4	6	6
Controle	BALB/c (H2 ^d)	4	-	6
	C57BL/6 (H2 ^b)	4	-	6
	C3H/HeJ (H2 ^k)	4	-	6

Fonte: Tonietti (2016)

Figura 4 - Delineamento experimental

Fonte: Toniatti (2016)

3.3 PERFUSÃO TRANSCARDÍACA

Visando uma adequada preservação do tecido nervoso realizou-se a perfusão transcardíaca para o exame histopatológico. Cada animal foi anestesiado por via intraperitoneal com 100mg/Kg de quetamina (Dopalen®, Sespo Indústria e Comércio Ltda., Divisão Vetbrands Saúde Animal, Paulínia, SP), 10mg/Kg de cloridrato de xilazina (Anasedan®, Sespo Indústria e Comércio Ltda., Divisão Vetbrands Saúde Animal, Paulínia, SP) e 2 mg/Kg de diazepam (Compaz®, Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA., São Paulo, SP), e mantido em plano anestésico com sevofluorano (Sevorane®, Cristália, Itapira, SP). Quando os reflexos podal e ocular estavam ausentes, procedeu-se a abertura da cavidade torácica por meio de uma incisão partindo do centro da cavidade abdominal passando nas laterais do apêndice xifóide e rebatendo-se cranialmente as costelas. Uma agulha (26GX½”), cortada de forma romba a 01 centímetro da base e conectada ao sistema de

perfusão foi introduzida no ventrículo esquerdo, o qual foi pinçado no terço ventral contra a agulha para fixação da mesma, evitando o refluxo (Figura 6).

Em seguida ao início da perfusão, foi realizada uma pequena incisão no átrio direito permitindo a drenagem do sangue. Cada animal foi perfundido inicialmente com cerca de 40 a 50 mL de tampão fosfato-salino (PBS) com 0,01M de EDTA (ácido etilenodiaminatetracético, sal dissódico; $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$; 3,72 g de EDTA diluído em 1 litro de PBS) tamponado (pH 7,4), para retirada do sangue. Após a passagem desse volume pela circulação sanguínea, a bomba foi desligada e o equipo passado do frasco com solução salina para o outro recipiente contendo formol a 10% como fixador. O sistema de perfusão contou com bomba peristáltica com velocidade regulável, específica para a perfusão de camundongos (MasterFlex - Cole-Parmer®) (Figura 5).

Figura 5 - Bomba peristáltica utilizada para a perfusão transcardíaca dos camundongos

Fonte: www.coleparmer.com

Figura 6 - Perfusão transcardíaca utilizando a bomba peristáltica para perfusão de camundongos (MasterFlex - Cole-Parmer®) - São Paulo – 2013

Fonte: Tonietti (2016)

3.4 ANÁLISE MACROSCÓPICA E HISTOPATOLÓGICA

Após a perfusão transcardíaca, amostras de tecidos das vísceras e SNC foram coletadas e fixadas em formol a 10% por 24 horas em temperatura ambiente. Após a fixação, fragmentos de aproximadamente 6mm dos tecidos foram desidratados com diferentes concentrações de etanol (70%, 80%, 95% e 100%). Posteriormente, os fragmentos foram diafanizados em xilol por 2 horas e inclusos em cassetes com parafina e polímeros plásticos (*Paraplast Plus*®, St. Louis, USA), previamente identificados. Os blocos foram submetidos à microtomia, sendo produzidos cortes coronais do SNC de 5µm de espessura em lâminas de vidro. As regiões analisadas englobaram porções estriada e diencefálica da região septal,

porção caudal do diencefalo, e porções rostrais do mesencefalo e cerebelo. Utilizou-se a coloração por hematoxilina e eosina (HE) no seguinte procedimento: as lâminas contendo cortes de 5 µm dos blocos de parafina foram desparafinizadas em estufa e reidratadas na seguinte bateria de banhos: xilol 100% (3x de 10 min), etanol 100% (3x de 5 min), etanol 95% (5 min), etanol 80% (5 min), etanol 70% (5 min) e água destilada (5 min). Em seguida, as lâminas foram imersas em Hematoxilina de Erlich por 1 minuto, lavadas 3 vezes em água corrente e em água destilada, e imersas em Eosina alcoólica 0,5% por 1-2 minutos. Após a coloração, as lâminas foram desidratadas por meio da seguinte sequência de banhos (de 5 min cada): etanol 95%, etanol 100% (3x), etanol/xilol 1:1, xilol 100% (2x). Finalmente as lâminas foram montadas utilizando-se resina Entelan® (Merck, Darmstadt, Germany).

Posteriormente, as lâminas foram fotodocumentadas e o SNC dos diferentes grupos experimentais foi descrito, conforme a presença ou ausência de alterações histopatológicas, e as características e extensão delas. As lâminas foram fotografadas com fotomicroscópio Zeiss Axio Imager A2 (Zeiss, Munich, Germany).

3.5 COLETA DE SANGUE PARA CITOMETRIA DE FLUXO E DO ENCÉFALO PARA RT-PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL

De acordo com o delineamento experimental, os camundongos foram anestesiados em cuba saturada com sevoflurano (Sevorane®, Cristália, Itapira, SP) e mantidos em plano anestésico com auxílio de máscara inalatória para a coleta de sangue total por punção cardíaca terminal, no 2º e 3º dpi (Figura 7). No 3º dpi, os camundongos foram eutanasiados por *overdose* anestésica (Sevorane®, Cristália, Itapira, SP) logo no início do aparecimento dos sintomas neurológicos. Em seguida, os animais foram necropsiados para a retirada do encéfalo que foi acondicionado em tubo estéril e livre de RNase. As amostras de sangue total foram coletadas em tubos de 1,5 mL contendo 10 µL de EDTA 10%, centrifugadas a 1000×g por 20 minutos e armazenadas em freezer a -80°C até o processamento. As amostras de encéfalo foram imediatamente congeladas em vapor de nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C para posterior processamento.

Figura 7 - Punção cardíaca terminal - São Paulo – 2013

Fonte: Toniatti (2016)

3.6 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINA NO PLASMA

As concentrações plasmáticas de citocinas e quimiocina (IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α , IL-12p70 e CCL2) foram avaliadas utilizando-se o *Cytometric Bead Array Mouse Inflammation Kit* (CBA, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), conforme as instruções do fabricante, com pequenas modificações. As amostras de plasma foram descongeladas a temperatura ambiente e homogeneizadas em vórtex. Inicialmente, preparou-se os padrões de citocinas para obtenção da curva controle. Para tal, os padrões de citocinas liofilizadas foram reconstituídas em 2,0 mL de diluente e deixadas em repouso por 15 minutos. Posteriormente, o padrão inicial foi colocado em tubo cônico e foi referido como *Top Standard* (20000 pg/mL). Outros tubos cônicos foram identificados com a ordem de diluição: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, e os mesmos foram preenchidos com 300 μ L do diluente. Para as consecutivas diluições, 300 μ L do *Top Standard* foi acrescentada ao primeiro tubo

de diluição seriada (1:2), e assim sucessivamente até o tubo 1:256 (Figura 8). O controle negativo (0 pg/mL) continha 300 µL de diluente de ensaio puro. Em seguida, tubos apropriados para citometria de fluxo (tubos tipo Cristal) foram identificados para as amostras a serem testadas, para a curva padrão e controle negativo. Em seguida, foram adicionados aos tubos, 25 µL de solução das *Beads* de Captura (Quadro 3) e anticorpos de detecção e 25 µL das amostras a serem testadas, dos padrões e controle negativo. Essas soluções foram delicadamente homogeneizadas e incubadas por 2 horas a temperatura ambiente, protegidas da luz. Após o período de incubação, acrescentou-se 500 µL de tampão de lavagem a cada tubo, e os mesmos foram submetidos a centrifugação a 500 g por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante resultante foi descartado e o *pellet* foi gentilmente homogeneizado e ressuspendido em 300 µL do tampão de lavagem. A quantificação das citocinas e quimiocinas nas amostras foi realizada em citômetro de fluxo (FACScalibur Immunocytometry System, San Jose, CA, USA) utilizando-se os parâmetros FL2 (Anticorpos de detecção) e FL3 (*Beads* de Captura) (Figura 9). Os diferentes níveis de citocinas e quimiocinas, bem como a curva padrão, foram analisados utilizando-se o software FCAP Array™ (Becton Dickinson, CA, USA).

Figura 8 - Preparação dos padrões de citocinas para a citometria de fluxo

Fonte: Adaptado de https://www.bdbiosciences.com/documents/CBA_MouseInflammation_Kit_Manual.pdf

Quadro 3 - *Beads* de captura contidas no *Cytometric Bead Array Mouse Inflammation Kit*

<i>Bead</i>	Especificidade
A1	IL-6
A2	IL-10
A3	CCL2
A4	INF- γ
A5	TNF
A6	IL-12p70

Fonte: https://www.bdbiosciences.com/documents/CBA_MouseInflammation_Kit_Manual.pdf

Figura 9 - [A] Parâmetros FL2 (Anticorpos de detecção) e FL3 (*Beads* de Captura); e [B] citômetro de fluxo utilizado nesse estudo

Fonte: Adaptado de https://www.bdbiosciences.com/documents/CBA_MouseInflammation_Kit_Manual.pdf
www.isu.edu

3.7 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RNA TOTAL

Para extração do RNA, as amostras de encéfalo foram maceradas em vapor de nitrogênio líquido até obtenção de lise celular utilizando gral e pistilo (Figura 10).

A extração de RNA de aproximadamente 30 mg de tecido nervoso foi realizada utilizando-se o *RNAspin Mini RNA isolation Kit* (GE Healthcare, UK), seguindo o protocolo determinado pelo fabricante (Figura 11). As amostras de RNA extraídas foram tratadas com DNase I (RNase free) (Fermentas Inc., USA) para eliminar o DNA residual e armazenadas em microtubos de polipropileno de 1,5 mL a -80°C até o momento do uso.

A quantificação do RNA foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop[®] 2000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA). Somente as amostras que apresentaram razão da absorbância 260/280 nanômetros com valores próximos a 2,0, indicando baixa contaminação do RNA por proteínas ou fenol, foram consideradas adequadas para transcrição reversa.

Figura 10 - Gral e pistilo utilizados para macerar os encéfalos dos camundongos, congelados em vapor de nitrogênio líquido, para extração de RNA - São Paulo – 2014

Fonte: Tonietti (2016)

Figura 11 - Representação esquemática das etapas de extração de RNA total a partir de amostras de encéfalos dos camundongos dos grupos controle e inoculados com as estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1, utilizando o *kit RNAspin Mini RNA isolation* (GE HealthCare) - São Paulo – 2016

Fonte: Mori (2012)

3.8 TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT)

Após a quantificação do RNA foi feita a transcrição reversa de 1 µg de RNA total para DNA complementar (cDNA) utilizando-se o kit *SuperScript™III Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Nesse protocolo foi adicionado ao RNA 1 µL de oligo(dT) *primer* a 0,5 µg/µL (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1 µL de dNTP (*mix* de 10mM – 2,5 mM de cada: dATP, dTTP, dCTP e dGTP) e água tipo I tratada com 0,1% de DEPC (dietilpirocarbonato) q.s.p. 14 µL. Essa mistura foi aquecida em 65°C por 5 minutos em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) e depois mantida em gelo por, pelo menos, 2 minutos. Em seguida, foram adicionados ao tubo da reação 4 µL de tampão 5× (5× *First-Strand Buffer*), 1 µL de ditioneitol 0,1 M (DTT) e 1 µL de *SuperScript™III RT* (200 U/µL). As amostras foram colocadas em termociclador a 50°C por 60 minutos para extensão dos oligonucleotídeos iniciadores e, em seguida, inativou-se a enzima por 15 minutos a 70°C. Ao final da reação de transcrição, as amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos com 1 µL (2 unidades) de enzima RNase H (para eliminar resíduos de RNA no cDNA), e o cDNA armazenado em freezer –20°C.

3.9 EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS E QUIMIOCINA PRÓ-INFLAMATÓRIAS

Visto que os valores mais elevados de expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias e quimiocina no encéfalo dos camundongos foram detectados com três dias após a infecção pelo EHV-1 (MORI, 2012), estipulou-se o 3º dpi para mensurar a expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias IL-6, INF-γ TNF-α e quimiocina CCL2 no SNC dos camundongos infectados com as estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1, por RT-qPCR em placas com 96 poços (Thermo Scientific™ 96-Well Semi-Skirted Plates, Flat Deck, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) no aparelho 7500 *Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, USA). Foram selecionados iniciadores e sondas de hidrólise TaqMan® tipo MGB™ (*Minor Groove Binder*) marcadas com o fluoróforo

FAM (6-carboxifluoresceína) na posição repórter (Applied Biosystems, USA) para IL-6 (Mm00446190_m1), TNF- α (Mm00443258_m1), CCL2 (Mm00441242_m1) e INF- γ (Mm01168134_m1). A sonda TaqMan® tipo MGB™ marcada com fluoróforo VIC na posição reporter para o gene 18S rRNA (RNA ribossomal) (Hs99999901_s1) foi utilizada como controle endógeno para a quantificação relativa do mRNA em cada amostra (Quadro 4). Em resumo, as sondas de hidrólise TaqMan® tipo MGB™ são compostas por um fluoróforo *reporter* ligado covalentemente à extremidade 5' da sonda (FAM ou VIC) e a uma molécula *quencher* não fluorescente (MGB) ligada à extremidade 3'-terminal, atuando como atenuadora da fluorescência. Durante a amplificação, a Taq DNA polimerase estende os iniciadores e essa sonda é clivada devido à atividade de exonuclease da enzima separando as moléculas *reporter* e *quencher*. Isso faz com que a fluorescência da molécula *reporter* deixe de ser captada pela molécula *quencher* e passe a ser detectada pelo sistema óptico do equipamento de PCR em tempo real (WATZINGER et al., 2006) (Figura 12).

A reação foi realizada em um volume final de 20 μ L contendo 10 μ L do tampão TaqMan® *Universal Master Mix* 2X (Applied Biosystems, Foster CA, USA), 2 μ L (100ng) de cDNA total, 1 μ L do *Assay Mix* (0,9 mM de cada iniciador e 0,25 mM da sonda TaqMan® MGB™) e água ultra-pura q.s.p. As condições de reação foram as seguintes: ativação a 50°C por 2 minutos e desnaturação inicial a 95°C durante 10 minutos seguido de 40 ciclos com 15 segundos, a 95°C para desnaturação e 1 minuto a 60°C para anelamento e extensão.

Figura 12 - Representação esquemática da amplificação do DNA pelo sistema Taqman

Fonte: Adaptado de www.dnvision.com

A quantificação relativa da expressão do mRNA para IL-6, INF- γ TNF- α e CCL2 foi calculada pelo método comparativo Ct, conforme descrito na literatura (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). Os valores de Ct obtidos nos ensaios foram utilizados para o cálculo da expressão relativa de mRNA em relação ao controle endógeno (18S rRNA), ou seja, calculou-se o delta Ct (Δ Ct) utilizando a seguinte fórmula:

$$\Delta Ct = (Ct_{\text{gene de interesse}} - Ct_{\text{controle endógeno}})$$

Para comparar a expressão gênica de mRNA para as citocinas no SNC dos camundongos infectados em relação ao controle calculou-se o delta delta Ct ($\Delta\Delta$ Ct) pela seguinte fórmula:

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct_{\text{infectado}} - \Delta Ct_{\text{controle}})$$

Em seguida, os valores de $\Delta\Delta C_t$ foram transformados em escala logarítmica ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) com a finalidade de comparar, em número de vezes, o aumento ou a diminuição na expressão de mRNA para IL-6, IFN- γ , TNF- α e CCL2 no SNC dos camundongos infectados em relação ao controle:

$$\text{Variação (número de vezes)} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Quadro 4 - Assays [Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) senso e antisenso e sondas internas marcadas com fluoróforos] e seus respectivos números de identificação (*Assays ID - part number*) utilizados na avaliação da expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias e quimiocina por RT-qPCR - São Paulo – 2016

Genes	Assays ID
IL-6	<i>Mm00446190_m1</i>
TNF- α	<i>Mm00443258_m1</i>
MCP-1 ou CCL2	<i>Mm00441242_m1</i>
INF- γ	<i>Mm01168134_m1</i>
18S rRNA	<i>Hs99999901_s1</i>

Fonte: Mori (2012)

3.10 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados foram analisados utilizando o programa estatístico *Graph Pad InStat* (versão 3.01, 32 bit for Windows 95/NT). Os dados foram apresentados como o valor médio $\pm$ desvio padrão (expressão gênica de citocinas no SNC, quantificação de citocinas e quimiocina no plasma e variação de peso dos animais)

A diferença nas médias da concentração plasmática e na expressão gênica de IL-6, IFN- γ , TNF- α e CCL2 entre os camundongos inoculados com as estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 comparados ao grupo controle, entre as diferentes estirpes virais e entre as diferentes linhagens isogênicas foi comparada utilizando o teste de

análise de variância (ANOVA) não paramétrico (teste de *Kruskal-Wallis*), seguida pelo teste múltiplo de comparação Dunn. O nível de significância estatística foi estabelecido em $p < 0,05$.

Já a diferença nas médias da concentração de citocinas e quimiocina no plasma entre o 2º e 3º dpi e a variação de peso dos animais de uma mesma linhagem entre as diferentes estirpes (A4/72 e A9/92) foi comparada utilizando o teste “t” de *Student* não pareado bicaudal, com correção de *Welch*. Cada variável foi testada para normalidade, aplicando o método de *Kolmogorov e Smirnov*. O nível de significância estatística foi estabelecido em $p < 0,05$.

Para comparar a diferença nos valores médios da variação de peso dos animais entre os diferentes dias após a inoculação e entre as diferentes linhagens utilizou-se a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste múltiplo de comparação *Tukey-Kramer*. Cada variável foi testada para normalidade, aplicando o método de *Kolmogorov e Smirnov*. O nível de significância estatística foi estabelecido em $p < 0,05$.

A diferença entre as médias da expressão gênica entre as estirpes A4/72 e A9/92 de uma mesma linhagem de camundongo foi comparada utilizando-se o teste *Mann-Whitney* não pareado bicaudal. O nível de significância estatística foi estabelecido em $p < 0,05$.

Os gráficos de variação de peso dos camundongos, concentração plasmática e expressão gênica de citocinas e quimiocina no plasma foram feitos pelo programa *GraphPad Prism* v. 6.04.

4 RESULTADOS

4.1 SINAIS CLÍNICOS

A inoculação por via intranasal das estirpes A4/72 e A9/92 causou manifestações clínicas nos camundongos BALB/c, assim como nos C57BL/6 e C3H/HeJ, observando-se variações no aparecimento dos primeiros sintomas e na evolução da doença de acordo com a linhagem de camundongo. No segundo dia pós-inoculação, além da perda de peso, foi possível observar o aparecimento dos primeiros sinais clínicos da doença nos camundongos da linhagem BALB/c inoculados com a estirpe A4/72 (Figura 13), tais como: apatia, hipofagia, postura arqueada, desidratação e pelos arrepiados. Os camundongos da linhagem C57BL/6 apresentaram perda de peso, paralisia de membros posteriores (2º dpi), paralisia espástica da cauda e dos membros posteriores, convulsões e *head tilt* (3º dpi) (Figura 14). Após 72 horas da inoculação viral, todos os camundongos inoculados das três linhagens tiveram os sintomas agravados apresentando apatia intensa, postura arqueada, fraqueza, conjuntivite seropurulenta, desidratação e sialorreia.

Os camundongos BALB/c apresentaram acentuada perda de peso (Gráfico 1), pelos arrepiados, diminuição dos reflexos, tremores, apatia intensa, olhar fixo para um único ponto (normalmente a parede lateral da gaiola), perda da propriocepção e anorexia. As alterações respiratórias como dispneia e taquipneia foram bastante pronunciadas nos camundongos BALB/c. Os camundongos C57BL/6 e C3H/HeJ apresentaram perda de peso (Gráficos 2 e 3) e pelos arrepiados. Nos camundongos BALB/c e C57BL/6 inoculados com a estirpe A9/92 (Figura 15) observaram-se também perda de peso e manifestações neurológicas caracterizadas por hiperexcitabilidade em resposta aos estímulos sonoros, andar em círculos, perda da propriocepção, ataxia, perda de equilíbrio e convulsões. No 3º dpi todos os camundongos da linhagem C3H/HeJ inoculados com A4/72 (Figura 16) e A9/92 (Figura 17) tiveram o aparecimento dos sintomas apresentando perda de peso, apatia intensa, pelos arrepiados, postura arqueada, fraqueza, hiperexcitabilidade em resposta aos estímulos sonoros e tácticos, movimentos mastigatórios repetitivos, convulsão clônica e olhar fixo para um único ponto (normalmente a parede lateral da

gaiola). Os camundongos C3H/HeJ inoculados com a última estirpe, também apresentaram desidratação, sialorreia, andar em círculos e perda de equilíbrio.

As manifestações clínicas e a variação de peso em porcentagem das três linhagens de camundongos isogênicos estão representadas na Tabela 1. A variação de peso média dos camundongos inoculados com as estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 e dos animais do grupo controle, com o número total de animais está representada nos Gráficos 1, 2 e 3, sendo BALB/c, C57BL/6 e C3H/HeJ, respectivamente. A diferença significativa na variação da média dos pesos entre os dias variou entre as três diferentes linhagens de camundongos (Quadro 5).

As três linhagens de camundongos apresentaram perda de peso progressiva a partir do 1º dpi. Observou-se diferença estatística significativa quando se comparou a variação de peso entre as três linhagens de camundongo inoculadas com a estirpe A4/72 no 1º dpi nas relações BALB/c X C57BL/6 e BALB/c X C3H/HeJ e no 2º dpi nas relações BALB/c X C3H/HeJ e C57BL/6 X C3H/HeJ (Gráfico 4 e Quadro 5); e com a estirpe A9/92 do EHV-1 somente no 1º dpi nas relações BALB/c X C57BL/6 e BALB/c X C3H/HeJ (Gráfico 5 e Quadro 6).

Após 72 horas, houve uma maior perda de peso dos camundongos C3H/HeJ inoculados com A9/92 (-14,6%, Tabela 1) quando comparados àqueles infectados com A4/72 (-9,6%, Tabela 1), considerando-se o peso inicial (Dia 0). Comparando-se a mesma linhagem infectada com as diferentes estirpes do EHV-1 (A4/72 e A9/92) observou-se diferença estatística significativa no 2º dpi para as linhagens BALB/c e C57BL/6 e no 1º dpi para a linhagem C3H/HeJ (Gráficos 1, 2 e 3 e Quadro 7).

Tabela 1 - Manifestações clínicas da infecção pelas estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 em camundongos das linhagens BALB/c (H2^d), C57BL/6 (H2^b) e C3H/HeJ (H2^k) - São Paulo - 2016

		BALB/c			C57BL/6			C3H/HeJ		
		24h*	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
EHV-1 A4/72	Variação de peso (%)	6,3	-10,2	-13,2	1,9	-9	-11,5	3,3	-1,4	-9,6
	Apatia	0	+2	+3	0	0	+3	0	0	+2
	Pelos arrepiados	0	+2	+3	0	0	+1	0	0	+1
	Postura arqueada	0	+2	+3	0	0	+2	0	0	+1
	Sintomas respiratórios	0	+2	+2	0	0	+1	0	0	+1
	Sintomas neurológicos	0	+2	+2	0	+1	+3	0	0	+3
EHV-1 A9/92	Variação de peso (%)	6	-2,6	-14,5	3,3	-2,1	-10,3	0,27	-2	-14,6
	Apatia	0	0	+2	0	0	+2	0	0	+3
	Pelos arrepiados	0	0	+3	0	0	+1	0	0	+2
	Postura arqueada	0	0	+3	0	0	+1	0	0	+1
	Sintomas respiratórios	0	0	+2	0	0	+1	0	0	+1
	Sintomas neurológicos	0	0	+2	0	0	+3	0	0	+3

Fonte: Toniatti (2016)

* Tempo decorrido após a infecção pelo EHV-1

Sem sintomas aparentes: 0;

Apatia: +1 leve, +2 moderada (movimenta-se pela gaiola), +3 intensa (permanece encolhido nos cantos da gaiola a maior parte do tempo);

Pelos arrepiados: +1 ao redor do pescoço, +2 ao redor do pescoço e dorso, +3 por todo o corpo;

Postura arqueada: +1 ao sentar, +2 coluna vertebral proeminente ao sentar e caminhar;

Sintomas respiratórios: +1 taquipneia e dispneia leves; +2 taquipneia e dispneia intensas;

Sintomas neurológicos: +1 hiperexcitabilidade, +2 andar em círculos, convulsões tipo clônica, +3 andar em círculos, espasmos de membros posteriores e da cauda, convulsões tônico-clônicas

Figura 13 - Camundongos da linhagem BALB/c inoculados com a estirpe A4/72 no 3º dia pós-infecção (dpi). Animais apresentaram [A] pelos arrepiados, postura arqueada, olhar fixo para um único ponto, [B] desidratação, [C] e [D] perda da propriocepção – São Paulo – 2013

Fonte: Tonietti (2016)

Figura 14 - Camundongos da linhagem C57BL/6 inoculados com a estirpe A4/72 no 3º dpi. Animais apresentaram [A] convulsões tônico-clônicas, [B] paralisia da cauda e dos membros posteriores [C] *head tilt* [D] ataxia e perda de equilíbrio – São Paulo – 2013

Fonte: Tonietti (2016)

Figura 15 - Camundongos da linhagem [A] BALB/c e [B] C57BL/6 inoculados com a estirpe A9/92 no 3º dpi. Animais apresentaram [A] convulsão clônica, [B] paralisia da cauda e dos membros posteriores – São Paulo – 2013

Fonte: Tonietti (2016)

Figura 16 - Camundongos da linhagem C3H/HeJ inoculados com a estirpe A4/72 no 3º dpi. Animais apresentaram [A] e [B] convulsão clônica, postura arqueada e [C] e [D] apatia - São Paulo – 2013

Fonte: Tonietti (2016)

Figura 17 - Camundongos da linhagem C3H/HeJ inoculados com a estirpe A9/92 no 3º dpi. Animais apresentaram [A] piloereção e postura arqueada, [B] andar em círculos e perda de equilíbrio, [C] desidratação e apatia e [D] sialorreia - São Paulo – 2013

Fonte: Tonietti (2016)

Gráfico 1 - Variação do peso médio dos camundongos BALB/c infectados com as estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 comparados ao grupo controle – São Paulo – 2016

Fonte: Tonietti (2016)

Gráfico 2 - Variação do peso médio dos camundongos C57BL/6 infectados com as estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 comparados ao grupo controle – São Paulo – 2016

Fonte: Toniatti (2016)

Gráfico 3 - Variação do peso médio dos camundongos C3H/HeJ infectados com as estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 comparados ao grupo controle – São Paulo – 2016

Fonte: Toniatti (2016)

Quadro 5 - Valores de p representativos da comparação entre o peso dos animais nos diferentes dias após a inoculação com as estirpes A4/72 e A9/92 – São Paulo – 2016

		BALB/c	C57BL/6	C3H/HeJ
EHV-1 A4/72	1º dpi x 2º dpi	p<0,001	p<0,001	NS*
	1º dpi x 3º dpi	p<0,001	p<0,001	p<0,001
	2º dpi x 3º dpi	NS*	NS*	p<0,01
EHV-1 A9/92	1º dpi x 2º dpi	p<0,001	NS*	NS*
	1º dpi x 3º dpi	p<0,001	p<0,001	p<0,001
	2º dpi x 3º dpi	p<0,001	p<0,01	p<0,001

Fonte: Toniatti (2016)

*NS: não significativo

Gráfico 4 - Variação do peso médio dos camundongos BALB/c, C57BL/6 e C3H/HeJ infectados com a estirpe A4/72 do EHV-1 – São Paulo – 2016

Fonte: Toniatti (2016)

Gráfico 5 - Variação do peso médio dos camundongos BALB/c, C57BL/6 e C3H/HeJ infectados com a estirpe A9/92 do EHV-1– São Paulo – 2016

Fonte: Toniatti (2016)

Quadro 6 - Valores de p representativos da comparação entre a variação do peso médio dos animais nos diferentes dias após a inoculação com as estirpes A4/72 e A9/92 na relação entre as diferentes linhagens – São Paulo – 2016

		BALB/c X C57BL/6	BALB/c X C3H/HeJ	C57BL/6 X C3H/HeJ
EHV-1 A4/72	1º dpi	p<0,01	p<0,05	NS*
	2º dpi	NS*	p<0,001	p<0,01
	3º dpi	NS*	NS*	NS*
EHV-1 A9/92	1º dpi	p<0,05	p<0,001	NS*
	2º dpi	NS*	NS*	NS*
	3º dpi	NS*	NS*	NS*

Fonte: Toniatti (2016)

*NS: não significativo

Quadro 7 - Valores de p representativos da comparação entre a variação do peso médio dos animais da mesma linhagem nos diferentes dias após a inoculação na relação entre as estirpes A4/72 e A9/92 – São Paulo – 2016

		BALB/c	C57BL/6	C3H/HeJ
A4/72 X A9/92	1º dpi	NS*	NS*	p<0,05
	2º dpi	p<0,001	p<0,01	NS*
	3º dpi	NS*	NS*	NS*

Fonte: Toniatti (2016)

*NS: não significativo

4.2 ANÁLISE MACROSCÓPICA E HISTOPATOLÓGICA

Macroscopicamente, camundongos das linhagens BALB/c (H2^d), C57BL/6 (H2^b) e C3H/HeJ (H2^k) infectados pelas estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 apresentaram alterações em órgãos linfóides, especificamente aumento de linfonodos mesentéricos e cervicais, esplenomegalia e atrofia do timo. As lesões histopatológicas no SNC estavam presentes em todas as linhagens de camundongos inoculados com as estirpes A4/72 e A9/92. A presença ou não de determinadas lesões variou entre as linhagens de camundongos (Quadro 8). Além disso, dentre as lesões encontradas, foram observadas variações entre as linhagens e as estirpes virais no que tange à localização das lesões e a severidade dessas (Quadros 8 a 12). Os camundongos controle não apresentaram lesões.

Os camundongos da linhagem BALB/c (H2^d) inoculados com a estirpe A4/72 apresentaram neurônios relativamente diminuídos de tamanho, angulares, com citoplasma marcadamente eosinofílico (neurônios vermelhos) e cariorexia de leve a moderada (necrose neuronal). Os espaços perivasculares do neuroparênquima estavam preenchidos por uma camada de células inflamatórias compostas principalmente por neutrófilos (manguito perivascular). Os espaços perivasculares e pericelulares estavam moderadamente aumentados (edema) (Figura 18). No neuroparênquima havia vacuolização multifocal associada à dissociação do neurópilo (necrose de liquefação). As áreas de necrose estavam associadas a uma gliose difusa, acentuadas em regiões mais ventrais de septo-estriado (principalmente tubérculo olfatório, área piriforme e hipotálamo), diencéfalo caudal (principalmente região cortical amigdalar, área piriforme e hipotálamo), e mesencéfalo rostral (principalmente região cortical amigdalar, entorrinal e hipotálamo). O hipotálamo das porções de diencéfalo caudal e mesencéfalo rostral apresentaram as lesões com grau leve de intensidade. O hipocampo evidenciou áreas multifocais de necrose neuronal moderada nas porções da camada piramidal e camada de células granulosas. No cerebelo rostral desses animais não foram observadas lesões. Nos camundongos da linhagem BALB/c (H2^d) inoculados com a estirpe A9/92 do EHV-1 foram visualizadas as mesmas lesões observadas naqueles inoculados com A4/72, porém com severidade moderada. Adicionalmente, observou-

se hemorragia. No hipocampo e cerebelo rostral desses animais não foram visualizadas lesões (Quadros 8 a 10).

Nos camundongos da linhagem C57BL/6 (H2^b) inoculados com a estirpe A4/72, observou-se leptomeninges infiltradas por um grande número de neutrófilos e plasmócitos (leptomeningite neutrofílica) (Figura 19), manguito perivascular, associados a necrose neuronal, edema, necrose de liquefação e gliose leves nas regiões mais ventrais do septo-estriado (principalmente tubérculo olfatório, área piriforme e hipotálamo), diencefalo caudal (principalmente região cortical amigdalar, área piriforme e hipotálamo), e mesencefalo rostral (principalmente região cortical amigdalar, entorrinal e hipotálamo). No cerebelo rostral observou-se áreas multifocais de necrose de liquefação e raras regiões de necrose neuronal. No hipocampo não foram visualizadas lesões. Nos camundongos da linhagem C57BL/6 (H2^b) inoculados com a estirpe A9/92 do EHV-1 observou-se a presença das mesmas lesões observadas naqueles inoculados com A4/72, porém de intensidade leve. No hipocampo e no cerebelo rostral desses animais não foram visualizadas lesões (Quadros 8, 9 e 11).

Em relação aos camundongos da linhagem C3H/HeJ (H2^k) inoculados com a estirpe A4/72 observou-se necrose neuronal, associada a edema, necrose de liquefação (Figura 20) e gliose difusos e severos em toda a extensão do córtex de septo-estriado, hipotálamo e núcleo septal lateral; e em todo o córtex de diencefalo caudal e mesencefalo rostral. No hipotálamo das porções de diencefalo caudal e mesencefalo rostral foi visualizada necrose neuronal com grau leve de intensidade. No hipocampo havia áreas multifocais e coalescentes de necrose neuronal acentuada nas porções da camada piramidal e camada de células granulosas. No cerebelo rostral desses camundongos não foram visualizadas lesões. Nos camundongos da linhagem C3H/HeJ (H2^k) inoculados com a estirpe A9/92 do EHV-1 visualizou-se as mesmas lesões observadas naqueles inoculados com A4/72, porém com menor grau de severidade. Quanto à localização, as lesões dos camundongos dessa linhagem inoculados com a estirpe A9/92 se restringiram às regiões mais ventrais do septo-estriado (principalmente tubérculo olfatório, área piriforme e hipotálamo), diencefalo caudal (principalmente região cortical amigdalar, área piriforme e hipotálamo), e mesencefalo rostral (principalmente região cortical

amigdalares, entorrinal e hipotálamo). No hipocampo e cerebelo rostral não havia alterações (Quadros 8, 9 e 12).

Quadro 8 - Lesões histopatológicas observadas no SNC conforme a linhagem dos camundongos analisados - BALB/c (H2^d), C57BL/6 (H2^b) e C3H/HeJ (H2^k) – São Paulo 2016

Lesões	EHV/1 A4/72			EHV/1 A9/92		
	BALB/c (H2 ^d)	C57BL/6 (H2 ^b)	C3H/HeJ (H2 ^k)	BALB/c (H2 ^d)	C57BL/6 (H2 ^b)	C3H/HeJ (H2 ^k)
Necrose neuronal	X	X	X	X	X	X
Edema	X	X	X	X	X	X
Gliose	X	X	X	X	X	X
Leptomeningite neutrofílica	-	X	-	-	X	-
Manguito perivascular	X	X	-	-	X	-

Fonte: Tonietti (2016)

X lesões presentes

- lesões ausentes

Quadro 9 - Intensidade das lesões histopatológicas observadas no SNC conforme a localização, a estirpe viral – A4/72 ou A9/92 - e linhagem dos camundongos analisados - BALB/c (H2^d), C57BL/6 (H2^b) e C3H/HeJ (H2^k) – São Paulo 2016

Localização no SNC		EHV/1 A4/72			EHV/1 A9/92		
		BALB/c (H2 ^d)	C57BL/6 (H2 ^b)	C3H/HeJ (H2 ^k)	BALB/c (H2 ^d)	C57BL/6 (H2 ^b)	C3H/HeJ (H2 ^k)
Septo-estriado	Córtex	+++	+++	+++	++	+	++
	Hipotálamo	+++	+++	+++	++	+	++
Diencefalo caudal	Córtex	+++	++	+++	++	+	++
	Hipotálamo	+	++	++	+	+	+
Mesencefalo rostral	Córtex	+++	++	+++	++	+	++
	Hipotálamo	+	++	++	+	+	+
Cerebelo rostral		-	++	-	-	-	-
Hipocampo		++	-	+++	+	-	-

Fonte: Tonietti (2016)

Intensidade das lesões:

+++ severa

++ moderada

+ leve

- lesões ausentes

Figura 18 - Fotomicrografias representativas e características das principais alterações microscópicas observadas em SNC de camundongos BALB/c (H^d) dos grupos controle e infectados pelas estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 – São Paulo – 2016

Fonte: Toniatti (2016)

a grupo controle: sem alterações evidentes

b grupo infectado: 1 - necrose neural, 2 - manguito perivascular, 3 - edema

Figura 19 - Fotomicrografias representativas e características das principais alterações microscópicas observadas em SNC de camundongos C57BL/6 (H^b) dos grupos controle e infectados pelas estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 – São Paulo – 2016

Fonte: Toniatti (2016)

a grupo controle: sem alterações evidentes

b grupo infectado: 1 - necrose de liquefação, 2 – necrose neuronal, 3 - leptomeningite neutrofílica

Figura 20 - Fotomicrografias representativas e características das principais alterações microscópicas observadas em SNC de camundongos C3H/HeJ (H2^k) dos grupos controle e infectados pelas estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 – São Paulo – 2016

Fonte: Toniatti (2016)

a grupo controle: sem alterações evidentes

b grupo infectado: 1 - necrose neural, 2 - necrose de liquefação

Quadro 10 - Extensão das lesões nas diferentes regiões do SNC dos camundongos da linhagem BALB/c (H2^d) analisados. Os círculos em preto indicam os locais onde as lesões foram observadas – São Paulo - 2016

Localização no SNC	Animais		
	BALB/c (H2 ^d) Controle	BALB/c (H2 ^d) Inoculado A4/72	BALB/c (H2 ^d) Inoculado A9/92
Septo-estriado
Diencefalo caudal
Mesencéfalo rostral
Cerebelo rostral

Fonte: Adaptado de <http://www.hms.harvard.edu/research/brain/atlas.html>

Quadro 11 - Extensão das lesões nas diferentes regiões do SNC dos camundongos da linhagem C57BL/6 (H2^b) analisados. Os círculos em preto indicam os locais onde as lesões foram observadas – São Paulo - 2016

Localização no SNC	Animais		
	C57BL/6 (H2 ^b) Controle	C57BL/6 (H2 ^b) Inoculado A4/72	C57BL/6 (H2 ^b) Inoculado A9/92
Septo-estriado
Diencefalo caudal
Mesencéfalo rostral
Cerebelo rostral

Fonte: Adaptado de <http://www.hms.harvard.edu/research/brain/atlas.html>

Quadro 12 - Extensão das lesões nas diferentes regiões do SNC dos camundongos da linhagem C3H/HeJ (H2^k) analisados. Os círculos em preto indicam os locais onde as lesões foram observadas – São Paulo - 2016

Localização no SNC	Animais		
	C3H/HeJ (H2 ^k) Controle	C3H/HeJ (H2 ^k) Inoculado A4/72	C3H/HeJ (H2 ^k) Inoculado A9/92
Septo-estriado
Diencefalo caudal
Mesencefalo rostral
Cerebelo rostral

Fonte :Adaptado de <http://www.hms.harvard.edu/research/brain/atlas.html>

4.3 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINA NO PLASMA NO 2º DIA APÓS INFECÇÃO

No 2º dpi, observou-se aumento significativo na concentração de IL-6, IFN- γ , TNF- α e CCL2 nos camundongos BALB/c, C57BL/6 e C3H/HeJ infectados com a estirpe A4/72 do EHV-1, comparando-se com o grupo controle, exceto os camundongos C57BL/6, que não demonstraram aumento significativo de CCL2 quando infectados com a estirpe A4/72. Apesar de demonstrarem um aumento de IL-6 e TNF- α , visualmente, quando comparadas ao controle, os animais inoculados com a estirpe A9/92 apresentaram elevação significativa apenas de IFN- γ e CCL2. Camundongos inoculados com a estirpe A4/72 demonstraram aumento significativo para as quatro citocinas analisadas, (Gráficos 6, 7, 8 e 9, respectivamente). Os valores de p estão representados no Quadro 13. Não houve aumento significativo das citocinas IL-10 e IL12p70.

Gráfico 6 - Concentração plasmática de IL-6 em camundongos isogênicos no 2º dia após infecção pelo herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1) – São Paulo - 2016

Fonte: Tonietti (2016)

*Aumento estatístico significativo dos grupos inoculados com a estirpe A4/72 em relação ao grupo controle

Gráfico 7 - Concentração plasmática de IFN- γ em camundongos isogênicos no 2º dia após infecção pelo herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1) – São Paulo – 2016

Fonte: Tonietti (2016)

*Aumento estatístico significativo dos grupos inoculados com as estirpes A4/72 e A9/92 em relação ao grupo controle

♦Diferença estatística significativa entre as linhagens

Gráfico 8 - Concentração plasmática de TNF- α em camundongos isogênicos no 2º dia após infecção pelo herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1) – São Paulo – 2016

Fonte: Toniatti (2016)

*Aumento estatístico significativo dos grupos inoculados com a estirpe A4/72 em relação ao grupo controle

Gráfico 9 - Concentração plasmática de CCL2 em camundongos isogênicos no 2º dia após infecção pelo herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1) – São Paulo – 2016

Fonte: Toniatti (2016)

*Aumento estatístico significativo dos grupos inoculados com as estirpes A4/72 e A9/92 em relação ao grupo controle

Quadro 13 - Valores de p entre os camundongos inoculados com as estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 no 2º dpi comparados ao grupo controle e aos grupos das diferentes estirpes – São Paulo – 2016

		IL-6	IFN- γ	TNF- α	CCL2
Controle X A4/72	BALB/c	p<0,001	p<0,05	p<0,01	p<0,01
	C57BL/6	p<0,01	p<0,01	p<0,001	NS*
	C3H/HeJ	p<0,01	p<0,01	p<0,001	p<0,05
Controle X A9/92	BALB/c	NS*	p<0,01	NS*	p<0,05
	C57BL/6	NS*	p<0,05	NS*	p<0,05
	C3H/HeJ	NS*	p<0,05	NS*	p<0,05
A4/72 X A9/92	BALB/c	NS*	NS*	NS*	NS*
	C57BL/6	NS*	NS*	NS*	NS*
	C3H/HeJ	NS*	NS*	NS*	NS*

Fonte: Tonietti (2016)

*NS: não significativo

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINA NO PLASMA NO 3º DIA APÓS INFECÇÃO

No 3º dpi, observou-se aumento significativo na concentração de IL-6, TNF- α e CCL2 nos camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com a estirpe A4/72 do EHV-1, comparando-se com o grupo controle. Os camundongos C3H/HeJ inoculados com a estirpe A4/72 também apresentaram elevação significativa de TNF- α quando comparados àqueles infectados com a estirpe A9/92, assim como os camundongos BALB/c e C57BL/6. Quando comparados ao grupo controle, os camundongos C3H/HeJ demonstraram aumento significativo somente de IL-6 e CCL2. Houve diminuição significativa de IFN- γ nos camundongos C3H/HeJ infectados com a estirpe A9/92 (0pg/mL) quando comparados ao grupo controle (Gráficos 10, 11, 12 e 13 respectivamente). Os valores de p estão representados no Quadro 14. Não houve aumento significativo das citocinas IL-10 e IL12p70.

Gráfico 10 - Concentração plasmática de IL-6 em camundongos isogênicos no 3º dia após infecção pelo herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1) – São Paulo – 2016

Fonte: Toniatti (2016)

*Aumento estatístico significativo dos camundongos inoculados com a estirpe A4/72 em relação ao grupo controle

♦Diferença estatística significativa entre as linhagens

Gráfico 11 - Concentração plasmática de CCL2 em camundongos isogênicos no 3º dia após infecção pelo herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1) – São Paulo – 2016

Fonte: Toniatti (2016)

*Aumento estatístico significativo dos camundongos inoculados com a estirpe A4/72 em relação ao grupo controle

♦Diferença estatística significativa entre as linhagens

Gráfico 12 - Concentração plasmática de TNF- α em camundongos isogênicos no 3º dia após infecção pelo herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1) – São Paulo – 2016

Fonte: Toniatti (2016)

#Aumento estatístico significativo dos camundongos inoculados com a estirpe A4/72 em relação àqueles inoculados com A9/92

*Aumento estatístico significativo dos camundongos inoculados com a estirpe A4/72 em relação ao grupo controle

♦Diferença estatística significativa entre as linhagens

Gráfico 13 - Concentração plasmática de IFN- γ em camundongos isogênicos no 3º dia após infecção pelo herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1) – São Paulo – 2016

Fonte: Toniatti (2016)

*Diminuição estatística significativa

Quadro 14 - Valores de p entre os camundongos inoculados com as estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 no 3º dpi comparados ao grupo controle e aos grupos das diferentes estirpes – São Paulo – 2016

		IL-6	IFN- γ	TNF- α	CCL2
Controle X A4/72	BALB/c	p<0,01	NS*	p<0,05	p<0,05
	C57BL/6	p<0,01	NS*	p<0,01	p<0,01
	C3H/HeJ	p<0,05	NS*	NS*	p<0,05
Controle X A9/92	BALB/c	NS*	NS*	NS*	NS*
	C57BL/6	NS*	NS*	NS*	NS*
	C3H/HeJ	NS*	p<0,05	NS*	NS*
A4/72 X A9/92	BALB/c	NS*	NS*	p<0,05	NS*
	C57BL/6	NS*	NS*	p<0,05	NS*
	C3H/HeJ	NS*	NS*	p<0,01	NS*

Fonte: Tonietti (2016)

*NS: não significativo

4.5 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINA NO PLASMA ENTRE AS LINHAGENS ISOGENICAS DE CAMUNDONGOS NOS 2º E 3º DIA APÓS INFECÇÃO

Observou-se variação na concentração de citocinas pró-inflamatórias entre as três linhagens isogênicas de camundongos tanto no 2º como no 3º dpi.

No 2º dpi, visualmente, houve uma diferença na concentração de IFN- γ entre BALB/c, C57BL/6 e C3H/HeJ tanto quando inoculados com a estirpe A4/72, quanto quando infectados com a estirpe A9/92 do EHV-1. Contudo, observou-se aumento significativo nas concentrações de IFN- γ nos camundongos infectados com a estirpe A4/72 somente na relação entre BALB/c e C57BL/6 (p<0,05). Já naqueles animais infectados com a estirpe A9/92, houve aumento significativo dessa citocina nos camundongos BALB/c em relação aos C57BL/6 e aos C3H/HeJ (p<0,05) (Gráfico 7). No que tange às outras citocinas pró-inflamatórias analisadas, não houve diferença estatística significativa entre as linhagens de camundongos estudadas.

No 3º dpi, visualmente, houve uma diferença na concentração de IL-6 e CCL2 entre BALB/c, C57BL/6 e C3H/HeJ quando inoculados com A4/72, e na

concentração de TNF- α quando essas mesmas linhagens foram infectadas com a estirpe A9/92. No entanto, observou-se aumento significativo nas concentrações de IL-6 somente nos camundongos C57BL/6 em relação aos C3H/HeJ ($p < 0,05$) inoculados com a estirpe A4/72 (Gráfico 10) e nas concentrações de CCL2 apenas nos camundongos C57BL/6 em relação ao BALB/c ($p < 0,05$) quando infectados com a mesma estirpe (Gráfico 11). Houve elevação significativa nas concentrações de TNF- α somente nos camundongos C57BL/6 em relação aos C3H/HeJ ($p < 0,05$) quando inoculados com a estirpe A9/92 do EHV-1 ($p < 0,05$) (Gráfico 12).

Em relação à comparação da concentração das outras citocinas entre as três linhagens isogênicas de camundongos analisadas nesse estudo, não houve diferença estatística significativa.

4.6 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINA NO PLASMA DAS LINHAGENS ISOGÊNICAS DE CAMUNDONGOS DO 2º PARA O 3º DIA APÓS INFECÇÃO

Os camundongos da linhagem BALB/c inoculados tanto com a estirpe A4/72 como com A9/92 do EHV-1 apresentaram aumento significativo de IL-6 ($p < 0,05$) (Gráfico 14) e diminuição significativa de IFN- γ do 2º dpi para o 3º dpi ($p < 0,05$) (Gráfico 15). Além disso, os camundongos BALB/c também demonstraram diminuição significativa de CCL2 do 2º dpi para o 3º dpi ($p < 0,001$) quando inoculados com a estirpe A4/72 (Gráfico 16) e de TNF- α ($p < 0,01$) quando infectados com A9/92 (Gráfico 17).

Os camundongos da linhagem C57BL/6 inoculados tanto com a estirpe A4/72 como com A9/92 do EHV-1 apresentaram diminuição significativa de IFN- γ ($p < 0,01$) (Gráfico 15). Essa linhagem também demonstrou diminuição significativa de TNF- α ($p < 0,001$) (Gráfico 17) e aumento significativo de IL-6 ($p < 0,05$) (Gráfico 14) do 2º dpi para o 3º dpi quando inoculados com a estirpe A9/92. A quimiocina CCL2 não apresentou diferença estatística significativa para os camundongos dessa linhagem.

Os camundongos da linhagem C3H/HeJ inoculados tanto com a estirpe A4/72 como com A9/92 do EHV-1 apresentaram diminuição significativa de IFN- γ ($p < 0,01$)

(Gráfico 15) e de $\text{TNF-}\alpha$ ($p < 0,05$ para A4/72 e $p < 0,0001$ para A9/92) (Gráfico 17) do 2º dpi para o 3º dpi. A citocina IL-6 e a quimiocina CCL2 não apresentaram diferença estatística significativa para os camundongos dessa linhagem.

Gráfico 14 - Concentração plasmática de IL-6 em camundongos isogênicos do 2º para o 3º dia após infecção pelo herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1): [A] A4/72 e [B] A9/92 – São Paulo – 2016

Fonte: Toniatti (2016)

*Aumento estatístico significativo

Fonte: Toniatti (2016)

*Aumento estatístico significativo

Gráfico 15 - Diminuição da concentração plasmática de IFN- γ em camundongos isogênicos do 2º para o 3º dia após infecção pelo herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1): [A] A4/72 e [B] A9/92 – São Paulo – 2015

Fonte: Toniatti (2016)

◆ Diminuição estatística significativa

Fonte: Toniatti (2016)

◆ Diminuição estatística significativa

Gráfico 16 - Concentração plasmática de CCL2 em camundongos isogênicos do 2º para o 3º dia após infecção pelo herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1): [A] A4/72 e [B] A9/92 – São Paulo – 2016

Fonte: Tonietti (2016)

♦Diminuição estatística significativa

Fonte: Tonietti (2016)

Não houve diferença estatística significativa

Gráfico 17 - Diminuição da concentração plasmática de TNF- α em camundongos isogênicos do 2º para o 3º dia após infecção pelo herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1): [A] A4/72 e [B] A9/92 – São Paulo – 2016

Fonte: Toniatti (2016)

◆Diminuição estatística significativa

Fonte: Toniatti (2016)

◆Diminuição estatística significativa

4.7 EXPRESSÃO GÊNICA DAS CITOCINAS E QUIMIOCINA PRÓ-INFLAMATÓRIAS

Detectou-se pela RT-qPCR aumento de expressão dos mRNAs que codificam para TNF- α , IL-6 e CCL-2 no tecido nervoso de todos os camundongos infectados com as estirpes neuropatogênicas A4/72 e A9/92 do EHV-1 em relação aos controles no 3º dpi. Por sua vez, não se detectou expressão de mRNA para IFN- γ nos animais infectados quando comparados aos controles. Houve diferença no padrão de resposta das citocinas e quimiocina expressas no SNC entre as linhagens de camundongos estudadas. De modo geral, os valores relativos da expressão de mRNAs para TNF- α , IL-6 e CCL2 foram menores nos camundongos da linhagem C3H/HeJ quando comparados aos camundongos da linhagem BALB/c e C57BL/6.

Para os camundongos inoculados com a estirpe A4/72, observou-se diferenças significantes na expressão de mRNA para os camundongos BALB/c (CCL2, não houve aumento significativo; TNF- α , aumento de 527,67 vezes; IL-6, não houve aumento significativo em relação ao controle), e C57BL/6 (CCL2, aumento de 607,60 vezes; TNF- α , aumento de 199,65 vezes; IL-6, aumento de 180,28 vezes em relação ao controle) quando comparados ao grupo controle. Para os camundongos inoculados com a estirpe A9/92, observou-se diferenças significantes na expressão de mRNA para os camundongos BALB/c (CCL2, aumento de 748,56 vezes; TNF- α , aumento de 102,31 vezes; IL-6, aumento de 451,52 vezes em relação ao controle), e C57BL/6 (CCL2, aumento de 8644,28 vezes; TNF- α , aumento de 857,64 vezes; IL-6, aumento de 2585,22 vezes em relação ao controle) quando comparados ao grupo controle. Os camundongos C3H/HeJ não apresentaram aumento significativo em relação ao grupo controle tanto quando inoculados com a estirpe neuropatogênica A4/72, como com a A9/92. Tais resultados podem ser observados na Tabela 2 e Gráficos 18, 19 e 20.

Na comparação entre as linhagens de camundongos inoculados com a estirpe A4/72, observou-se diferença estatística significativa entre a linhagem BALB/c quando comparada às linhagens C57BL/6 e C3H/HeJ para a quimiocina CCL2, e entre os camundongos C57BL/6 e C3H/HeJ para a citocina TNF- α . Não houve diferença estatística entre as linhagens de camundongos inoculadas com A4/72 para

a citocina IL-6. Já para os camundongos inoculados com a estirpe A9/92, observou-se diferença estatística significativa entre os camundongos BALB/c e C57BL/6 quando comparados aos camundongos C3H/HeJ tanto para CCL2 como para TNF- α e IL-6. Também foi observada diferença estatística entre os camundongos BALB/c e C57BL/6 apenas para as quimiocina CCL2 e IL-6 (Tabela 2).

Comparando-se os camundongos da mesma linhagem inoculados com A4/72 e A9/92, observou-se diferença estatística significativa entre os camundongos C57BL/6 e C3H/HeJ para todas as citocinas e quimiocina analisadas. Os camundongos BALB/c não apresentaram diferença estatística somente para TNF- α (Quadro 15).

Quadro 15 - Valores de p entre os camundongos inoculados com as estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 no 3º dpi na comparação entre os valores relativos da expressão de mRNA de IL-6, TNF- α e CCL2 – São Paulo – 2016

		IL-6	TNF- α	CCL2
A4/72 X A9/92	BALB/c	p<0,001	NS*	p<0,001
	C57BL/6	p<0,001	p<0,01	p<0,001
	C3H/HeJ	p<0,001	p<0,001	p<0,001

Fonte: Tonietti (2016)

*NS: não significativo

Tabela 2 - Variação em número de vezes da expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 e da quimiocina CCL2 no SNC dos camundongos de diferentes linhagens inoculados com as estirpes neuropatogênicas A4/72 e A9/92 do EHV-1, calculada pelo método $\Delta\Delta Ct$. Os valores relativos foram expressos em média $\pm$ desvio padrão - São Paulo – 2016

Linhagem	Estirpe	Valores Relativos			Sintoma Neurológico
		CCL-2	TNF- α	IL-6	
BALB/c	A4/72	11,047* ** $\pm 12,50$	527,67* $\pm 820,18$	3,10* $\pm 3,86$	Moderado
	A9/92	748,56** $\pm 668,74$	102,31 $\pm 65,01$	451,52* ** $\pm 262,70$	Severo
C57BL/6	A4/72	607,60* ** $\pm 597,26$	199,65** $\pm 110,87$	180,28 $\pm 252,11$	Severo
	A9/92	8644,28* • $\pm 7082,72$	857,64* $\pm 360,70$	2585,22* • $\pm 2946,16$	Severo
C3H/HeJ	A4/72	0,50** $\pm 0,46$	1,49** $\pm 2,70$	0,84 $\pm 0,83$	Severo
	A9/92	0,0017** • $\pm 0,0015$	0,00076* • $\pm 0,00068$	0,0098* ** • $\pm 0,0071$	Severo

Fonte: Tonietti (2016)

Os valores relativos correspondem à variação em número de vezes da expressão de mRNA no SNC dos camundongos infectados em relação ao controle.

* $p < 0,05$ - CCL2/ A4/72: BALB/c x C57BL/6; IL-6/ A9/92: BALB/c x C57BL/6

** $p < 0,01$ - CCL2/ A4/72: BALB/c x C3H/HeJ; CCL2/ A9/92: BALB/c x C3H/HeJ; TNF- α / A4/72: C57BL/6 x C3H/HeJ; IL-6/ A9/92: BALB/c x C3H/HeJ; CCL2, TNF- α e IL-6/ A9/92: BALB/c x C3H/HeJ

• $p < 0,001$ - CCL2, TNF- α e IL-6/ A9/92: C57BL/6 x C3H/HeJ

Gráfico 18 - Variação em número de vezes da expressão gênica da quimiocina CCL2 no SNC dos camundongos de diferentes linhagens inoculados com as estirpes neuropatogênicas A4/72 e A9/92 do EHV-1, calculada pelo método $\Delta\Delta Ct$. Os valores relativos (média $\pm$ desvio padrão) representam o número de vezes que a expressão de mRNA no SNC dos camundongos infectados está aumentada em relação ao controle - São Paulo – 2016

Fonte: Tonietti (2016)

Gráfico 19 - Variação em número de vezes da expressão gênica da quimiocina TNF- α no SNC dos camundongos de diferentes linhagens inoculados com as estirpes neuropatogênicas A4/72 e A9/92 do EHV-1, calculada pelo método $\Delta\Delta Ct$. Os valores relativos (média $\pm$ desvio padrão) representam o número de vezes que a expressão de mRNA no SNC dos camundongos infectados está aumentada em relação ao controle - São Paulo – 2016

Fonte: Tonietti (2016)

Gráfico 20 - Variação em número de vezes da expressão gênica da quimiocina IL-6 no SNC dos camundongos de diferentes linhagens inoculados com as estirpes neuropatogênicas A4/72 e A9/92 do EHV-1, calculada pelo método $\Delta\Delta Ct$. Os valores relativos (média $\pm$ desvio padrão) representam o número de vezes que a expressão de mRNA no SNC dos camundongos infectados está aumentada em relação ao controle - São Paulo – 2016

Fonte: Toniatti (2016)

5 DISCUSSÃO

Apesar da crescente importância do EHV-1 em populações de equinos no mundo, ainda nos dias de hoje existe um número limitado de publicações sobre o papel das citocinas em resposta a infecção por esse agente (KYDD et al., 2006). Muitos aspectos da patogênese da EHM ainda precisam ser elucidados (DUNOWSKA, 2014). Dentro desse contexto, a disponibilidade de diversas linhagens de camundongos susceptíveis a infecção pelo EHV-1, as semelhanças entre a resposta imune do camundongo e do cavalo e a quantidade de informação disponível sobre características genéticas e biológicas das linhagens de camundongos isogênicos faz dessa espécie um atrativo modelo animal para a investigação da patogênese e dos mecanismos imunológicos responsáveis pela eliminação do vírus (AWAN et al., 1990; MORI et al., 2012).

Até o momento, as informações sobre a patogênese do EHV-1 baseiam-se no processo lítico de infecção inicial, que ocorre no epitélio respiratório da nasofaringe. O agente atravessa a membrana basal dentro de linfócitos T e assim se dissemina por meio da viremia. A translocação do agente para as células endoteliais do útero ou do SNC pode levar ao aborto ou ao desenvolvimento da EHM, respectivamente. A latência do vírus pode estabelecer-se em linfócitos T ou no nervo trigêmeo, provavelmente por meio do transporte axonal retrógrado do vírus, seguindo por meio do nervo sensorial na cavidade nasal (Figura 3) (DUNOWSKA, 2014).

Considerando esses fatos, no presente estudo, foram selecionadas duas estirpes brasileiras do EHV-1 (A4/72 e A9/92), isoladas a partir de casos de abortamento em éguas e de mortalidade perinatal, e três linhagens de camundongos (BALB/c (H2^d), C57BL/6 (H2^b) e C3H/HeJ (H2^k)) com o intuito de avaliar a resposta inflamatória do hospedeiro frente à infecção pelo EHV-1 para estudo dos mecanismos envolvidos na patogenia dessa encefalite viral.

Assim como relatado em estudos anteriores (AWAN et al., 1990; INAZU et al., 1993; WALKER et al., 1998a e MORI et al., 2012) após a inoculação intranasal das estirpes Ab4, HH1, HVS25A e A4/72 e A9/92 do EHV-1, respectivamente, no presente estudo os camundongos demonstraram sintomas como perda de peso, apatia, dispneia, postura arqueada, desidratação e pelos arrepiados (Figuras 13, 16

e 17). A paralisia de membros posteriores foi reportada por Awan et al. (1990) e Mori et al. (2012), conforme denotado nos camundongos C57BL/6 desse estudo (Figuras 14 e 15). Adicionalmente, Mori et al. (2012) relataram manifestações neurológicas caracterizadas por hiperexcitabilidade em resposta aos estímulos sonoros, andar em círculos, perda da propriocepção, ataxia, perda de equilíbrio e convulsões, assim como observado nesse estudo (Figuras 13 a 17). Adicionalmente, as manifestações neurológicas observadas, tais como, hiperexcitabilidade, andar em círculos, paralisia e convulsões foram comparáveis aos sintomas observados em camundongos e hamsters infectados pelo EHV-9 (FUKUSHI et al., 1997; FUKUSHI et al., 2000; EL-HABASHI et al., 2011a,b; EL-NAHASS et al., 2011).

A severidade dos sinais clínicos em camundongos infectados pelo EHV-1 varia de acordo com a dose (AZMI; FIELD, 1993a; SMITH et al., 1998a) e com a estirpe de EHV-1 inoculada (VAN WOENSEL et al., 1995). A estirpe Ab4, por exemplo, isolada de cavalos com sinais neurológicos, pode levar o camundongo à morte (AWAN et al., 1990; FIELD et al., 1992; AZMI; FIELD, 1993b; BAXI et al., 1996), enquanto que a estirpe KyA causa apenas uma doença com sintomas moderados (COLLE et al., 1996). Adicionalmente, Yu et al. (2010) demonstraram variados graus de patogenicidade entre oito estirpes japonesas (89c1, 90c16, 90c18, 97c11, 98c12, 00c19, 01c1 e HH-1) e uma estirpe britânica (Ab4p) do EHV-1 após a inoculação desse agente viral em camundongos CBA. Tais estudos concordam com as diferenças na severidade dos sintomas denotadas no presente estudo, onde os camundongos inoculados com a estirpe A4/72 apresentaram evolução para sinais clínicos mais severos quando comparada com a estirpe A9/92.

A meningoencefalite aguda foi notavelmente exacerbada nos camundongos C57BL/6 e C3H/HeJ em comparação aos camundongos BALB/c, provavelmente devido às diferenças no padrão de resposta imune das linhagens de camundongo estudadas (SELLERS et al., 2012). SMITH et al. (2005) observaram que camundongos CBA foram mais susceptíveis a infecção pelo EHV-1 do que os C57BL/6 ou BALB/c, sugerindo uma possível influência da linhagem de camundongo utilizada na resposta ao agente.

A análise estatística da variação de peso de cada linhagem de camundongo demonstrou significância na comparação entre os dias após a inoculação do EHV-1 (Quadro 5 e Gráficos 1 a 3). Entretanto, no 3º dpi não houve relação estatística

significativa na comparação entre as linhagens isogênicas de camundongos e entre as duas estirpes virais utilizadas no presente estudo. Para os animais inoculados com a estirpe A9/92, o resultado da análise estatística também não demonstrou significância no 2º dpi (Quadros 5 e 6 e Gráficos 4 e 5). O padrão de perda de peso foi similar para as linhagens de camundongos BALB/c, C57BL/6 inoculadas com as estirpes A4/72 e A9/92 e para a linhagem C3H/HeJ infectada com a estirpe A9/92 do EHV-1, variando entre -10,3% (C57BL/6 inoculados com A9/92) e -14,6% (C3H/HeJ inoculados com A9/92) do peso corpóreo no 3º dpi. Contudo, os camundongos C3H/HeJ inoculados com A4/72 apresentaram menor variação de peso no 3º dpi (-9,6%) (Tabela 1 e Gráficos 1 a 5). Tal resultado pode ser explicado pelo fato de que o neurotropismo e a neuroinvasividade do EHV-1 são características intrínsecas à estirpe viral; entretanto, sua patogenicidade em camundongos depende de uma associação de fatores relacionados tanto ao agente quanto à resposta imune do hospedeiro.

Embora houvesse divergências na capacidade de cada estirpe do vírus de causar doença, uma vez que as manifestações clínicas foram observadas e evoluíram de forma aguda, houve pouca diferença com relação à suscetibilidade das linhagens de camundongo utilizadas nos experimentos. As três linhagens de camundongos desafiadas com as estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 desenvolveram meningoencefalite não-suprativa grave. A infecção por via intranasal em camundongos com as estirpes altamente virulentas do EHV-1 induziu o aparecimento de lesões inflamatórias agudas no SNC, caracterizando o neurotropismo e a neurovirulência desses vírus. De acordo com Hasabe et al. (2002a,b), esses achados indicam que a neurovirulência do EHV-1 pode ser relacionada diretamente com as lesões microscópicas no SNC, devido à maior capacidade de estirpes neurotrópicas invadirem e replicarem-se no tecido nervoso. Concordando com Mori et al. (2012), as lesões macroscópicas, observadas nesse estudo, consistiram em aumento de linfonodos mesentéricos e cervicais, esplenomegalia e atrofia do timo.

Do mesmo modo, as alterações histopatológicas encontradas no SNC dos camundongos infectados com as estirpes neuropatogênicas do EHV-1 foram semelhantes às aquelas descritas na literatura (FRAMPTON et al., 2004; GOSZTONYI et al., 2009; KASEM et al., 2010; YU et al., 2010). Outrossim, algumas lesões

microscópicas observadas no SNC de camundongos infectados pelo EHV-1 podem ser comparadas às aquelas causadas pela EHM em cavalos. Lesões como hemorragia, inflamação dos neurônios e células gliais, manguitos perivasculares com presença de infiltrado mononuclear e polimorfonuclear, foram encontradas no SNC dos camundongos infectados com as estirpes A4/72 e A9/92, sendo consistentes com as lesões observadas em cavalos infectados naturalmente pelo EHV-1, acometidos pela EHM (MORI et al., 2011; MORI et al., 2012).

Conforme os dados de literatura, os achados do presente estudo indicam que a migração viral das estirpes neuropatogênicas do EHV-1 ocorreu durante o curso da infecção, atingindo o SNC dos camundongos (GOSZTONYI et al., 2009; EL-HABASHI et al., 2011b). O vírus migrou da mucosa nasal por disseminação neural através do bulbo olfatório e da superfície ventricular, levando à necrose neuronal, edema e gliose nas três linhagens de camundongos (Quadros 8 e 9, e Figuras 18 a 20) e leptomeningite neutrofílica nos camundongos C57BL/6 (Quadros 8 e 9, e Figura 19), principalmente nas áreas corticais. Nos camundongos BALB/c inoculados com ambas as estirpes e camundongos C3H/HeJ inoculados com a estirpe A4/72 as lesões foram observadas também em hipocampo. Lesões em cerebelo rostral foram observadas apenas nos camundongos C57BL/6 inoculados com a estirpe A4/72. Os resultados da análise histopatológica evidenciaram que os camundongos inoculados com a estirpe viral A4/72 apresentaram lesões mais intensas do que os inoculados com A9/92 (Quadro 8). A extensão das lesões histopatológicas nos camundongos estudados, exceto para C3H/HeJ inoculados com a estirpe A4/72 do EHV-1 (Quadros 10 a 12), observadas nesse estudo concorda com o que já foi observado em camundongos BALB/c desafiados com alta dose infectante (7.5×10^7 PFU/animal) da estirpe Ab4 do EHV-1 (genótipo neuropatogênico D₇₅₂) (GOSZTONYI et al., 2009) e em camundongos BALB/c inoculados com a estirpe HH1 (isolada de feto abortado no Japão), conforme descrito por Hasebe et al. (2002b). Nesse mesmo estudo, BALB/c inoculados com a estirpe neuroadaptada NHH1 (obtida por 15 passagens da estirpe HH1 em cérebro de camundongos BALB/c) apresentaram o mesmo padrão de extensão das lesões observado nos camundongos C3H/HeJ inoculados com a estirpe A4/72 do EHV-1 (Quadro 12). Tais achados histopatológicos concordam com Yu et al. (2010), os

quais relataram que isolados de EHV-1 demonstraram variados graus de patogenicidade após inoculação em camundongos CBA.

Assim como observado nos sinais clínicos e alterações histopatológicas dos camundongos BALB/c (H2^d) e C57BL/6 (H2^b) e C3H/HeJ (H2^k), infectados pelo EHV-1, também foram observadas diferenças quando se comparou a quantificação das citocinas e quimiocina no plasma (itens 4.3 a 4.6 e Gráficos 6 a 17) e a expressão gênica do mRNA das citocinas e quimiocina no SNC (item 4.7, Tabela 2 e Gráficos 18 a 20) entre as linhagens BALB/c, C57BL/6 e C3H/HeJ. Tais resultados vão de acordo com Guénet (2005); Sellers et al. (2012) e Van de Walle et al. (2008a,b), os quais descrevem que o fundo genético de uma determinada linhagem de camundongo pode influenciar no desenvolvimento de manifestações clínicas e na progressão da infecção pelo EHV-1 e que as linhagens de camundongos isogênicos são altamente divergentes no seu padrão de resposta imune, como resultado de mutações e polimorfismos.

A partir dos resultados do presente estudo, denotou-se a importância das citocinas IL-6, IFN- γ e TNF- α e da quimiocina CCL2 na resposta imune frente ao EHV-1, e a diferença significativa da concentração dessas citocinas pró-inflamatórias no plasma entre o 2º dpi e o 3º dpi, e dos valores relativos do mRNA dessas citocinas no SNC no 3º dpi, o que culmina na manifestação dos sinais clínicos e morte dos animais. De modo geral, foi observado aumento nas concentrações plasmáticas de IL-6 e diminuição nas concentrações de IFN- γ , TNF- α e CCL2 do 2º dpi para o 3º dpi. No 3º dpi, houve aumento na expressão gênica do mRNA de IL-6, TNF- α e CCL2, e não houve expressão gênica do mRNA de IFN- γ . Os camundongos C57BL/6 demonstraram os maiores valores relativos (número de vezes que a expressão de mRNA está aumentada em relação ao controle) e maior desvio padrão para a estirpe A9/92 em relação às citocinas CCL2, TNF- α e IL-6 (Tabela 2 e Gráficos 18 a 20).

O IFN- γ tem papel importante tanto na imunidade inata como na adaptativa contra infecções virais. Ele é produzido predominantemente pelas células NK, linfócitos CD4 e CD8 e APCs e é um importante ativador de macrófagos (SCHRODER et al., 2004). O TNF- α é produzido por macrófagos durante a inflamação aguda (IDRISS et al., 2000). O CCL2 é uma proteína quimioatratora de monócitos que está envolvida em processos neuroinflamatórios (GERARD et al.,

2001). Além disso, essa quimiocina está envolvida nos mecanismos de eliminação viral atuando diretamente na permeabilidade da BHE e/ou como fator quimiotático para linfócitos e macrófagos no processo inflamatório do SNC (STAMATOVIC et al., 2005; DESHMANE et al., 2009). A IL-6 é secretada por células T e macrófagos, estimulando a resposta imune durante a infecção (VAN DER POLL et al., 1997).

Foi comprovado que os linfócitos T CD4⁺ são primordiais na resposta imune contra a infecção viral aguda do SNC (MANICKAN; ROUSE, 1995); entretanto, a eficácia dessa resposta depende da combinação entre linfócitos T CD4⁺ e B ou linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Pesquisas realizadas *in vitro*, utilizando leucócitos periféricos de equinos, demonstraram que os linfócitos T CD8⁺ são os principais efetores no processo de lise das células infectadas pelo EHV-1, sendo que a citotoxicidade específica para o vírus foi determinada por moléculas de classe I do MHC (ALLEN et al., 1995).

No 2º dpi todas as linhagens de camundongos apresentaram aumento na concentração plasmática de IL-6, IFN- γ , TNF- α e CCL2 quando infectados com a estirpe A4/72 do EHV-1 e comparados ao grupo controle. A exceção foi a linhagem C57BL/6 que, apesar de, visualmente, ter apresentado aumento para CCL2, este não foi significativo. Já os animais inoculados com A9/92 demonstraram aumento apenas de IFN- γ e CCL2 (Gráficos 6 a 9).

Diversos estudos conduzidos em camundongos demonstraram o papel importante do IFN- γ na proteção imunológica em infecções por herpesvírus (SMITH et al., 1994; MILLIGAN; BERNSTEIN, 1997; CANTIN et al., 1999; MIKLOSKA; CUNNINGHAM, 2001). Além disso, a resposta imune do tipo Th1 e a produção de IFN- γ foram associadas com a proteção de suínos do vírus da pseudorraiva (FISCHER et al., 2000) e da infecção contra o herpesvírus tipo 1 em bovinos (WOOLUMS et al., 2003). O aumento da produção de IFN- γ foi reportado por Breathnach et al. (2005) no 10º dpi após a infecção pelo EHV-1 nas células mononucleares do sangue periférico de pôneis. Tais autores utilizaram o método de citometria de fluxo e o IFN- γ foi detectado utilizando um anticorpo monoclonal anti-IFN- γ bovino.

Platt et al. (2010) também demonstraram aumento na produção de IFN- γ em potros infectados via intranasal com EHV-1 por meio do método de citometria de

fluxo multiparamétrica, Tais autores analisaram amostras sanguíneas de potros da 6ª a 7ª semana após a infecção. Também foi demonstrado nesse estudo o aumento da expressão de MHC-II nos linfócitos CD2, CD4 e CD8, sugerindo que os TCRs representam um importante papel no processo de apresentação de antígeno às células em infecções pelo EHV-1.

No 3º dpi todas as linhagens de camundongos apresentaram aumento de IL-6, TNF- α e CCL2 quando inoculados com A4/72 e comparados ao grupo controle. A exceção foi a linhagem C3H/HeJ que não demonstrou aumento significativo de TNF- α . Apesar de todas as linhagens apresentarem diminuição de IFN- γ tanto quando inoculados com a estirpe A4/72 como com a A9/92, houve diminuição significativa dessa citocina apenas na linhagem C3H/HeJ infectada pelo A9/92 (Gráficos 10 a 13).

De um modo geral, a comparação da concentração das citocinas pró-inflamatórias do 2º dpi para o 3º dpi demonstrou aumento significativo de IL-6 e diminuição de IFN- γ , TNF- α e CCL2, havendo algumas variações entre as três linhagens isogênicas estudadas. Vale ressaltar que todas as linhagens apresentaram uma diminuição significativa de IFN- γ e de TNF- α entre os dois dias, exceto a concentração de TNF- α para a linhagem C57BL/6 inoculada com a estirpe A4/72, que apesar de, visualmente, apresentar diminuição, esta não foi significativa. (Gráficos 14 a 17). Observou-se diminuição estatística significativa de CCL2 do 2º dpi para o 3º dpi apenas nos camundongos BALB/c (Gráfico 16). Tal resultado observado nos camundongos BALB/c está de acordo com um relato da literatura, no qual a análise da expressão gênica de quimiocinas, através da PCR em tempo real, nas células mononucleares do sangue periférico demonstrou de um lado, aumento de CCL5, CXCL9 e CXCL10, e do outro, diminuição de CCL2 e CCL3 quando se comparou equinos infectados e não infectados (WIMER et al., 2011). Por outro lado, assim como na infecção por EHV-1, outros alfa herpesvírus, como o herpes simplex (HSV), estimulam a produção de CCL2 (WUEST; CARR, 2008), o qual recruta monócitos para o sistema nervoso (REBENKO-MOLLA et al., 2006; WUEST; CARR, 2008). Em camundongos experimentalmente infectados com o EHV-1, a expressão de CCL2, assim como de CCL3, CCL5, CXCL9 e CXCL10, demonstrou aumento de 8 a 12 horas após a infecção (SMITH et al., 2000, 2005).

Os alfa herpesvírus, como o HSV, têm sido reportados por regular negativamente a expressão de citocinas inflamatórias e quimiocinas pela diminuição do estímulo à expressão de interferon (HAGGLUND; ROIZMAN, 2004; WUEST; CARR, 2008), bloqueando o estímulo à produção de IFN-I pela proteína quinase R e inibindo a ativação de fatores de transcrição, como o transdutor de sinal e fator de transcrição 1 (STAT 1) e o transdutor de sinal e fator de transcrição 2 (STAT 2) (FINBERG et al., 2005). Sarkar et al. (2016b) demonstraram que a infecção pelo EHV-1 (estirpe T953) de células endoteliais de equino induz a degradação do IRF-3, proteína endógena produzida durante a cascata de respostas do sistema imunológico frente à infecção viral. Esses mesmos autores sugerem que o EHV-1 interfere nas vias de sinalização de IRF-3 e inibe a translocação nuclear dessa proteína endógena. De acordo com os dados já descritos, Sarkar et al. (2016a) demonstraram utilizando a mesma estirpe do EHV-1 que o agente viral promove a supressão da fosforilação e da translocação nuclear do STAT 1. Adicionalmente, Pusterla et al. (2006) descreveram que cavalos infectados pelo EHV-1 apresentaram aumento da expressão de IL-8 e, em poucos casos, de TNF- α no tecido nervoso. Entretanto, não houve expressão de IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 ou IL-12p40.

Segundo relatos de literatura, camundongos C3H (H2^k), infectados pelo EHV-1 exibem predominantemente resposta tipo Th1 com produção mais intensa das células T proliferativas e maiores concentrações de anticorpos soroneutralizantes contra o vírus quando comparados aos camundongos BALB/c (H2^d), que desenvolvem uma resposta imune predominantemente do tipo Th2. Nesse sentido, os camundongos da linhagem C3H seriam o melhor modelo para o estudo de potenciais vacinas contra o EHV-1 (ALBER et al., 1995). Ainda comparando essas duas linhagens de camundongos, os autores observaram que a imunização com a glicoproteína D induziu a produção de diferentes isotipos de anticorpos específicos contra o EHV-1. Enquanto os camundongos BALB/c produziram predominantemente o isotipo IgG1 (indicando uma resposta Th2), os camundongos C3H produziram IgG2, indicando uma resposta Th1 (ALBER et al., 2000). Essas diferenças relacionadas ao sistema imunológico entre as linhagens de camundongos estão de acordo com o que foi observado para as quatro citocinas analisadas nesse estudo (IL-6, IFN- γ , TNF- α e CCL2), as quais demonstraram diferenças estatisticamente

significativas na concentração plasmática das diferentes linhagens de camundongos isogênicos.

As linhagens de camundongos com padrão de resposta imune predominantemente Th1, ou seja, C57BL/6 e C3H/HeJ, infectados com estirpes neuropatogênicas do EHV-1, reproduziram de maneira mais fidedigna as lesões encontradas em cavalos acometidos pela EHM. Por sua vez, os camundongos da linhagem BALB/c, com predomínio da resposta imune Th2, apresentaram manifestações respiratórias mais evidentes.

Denotou-se ainda, de um modo geral, aumento na concentração plasmática de IL-6, TNF- α , CCL2 e IFN- γ em todas as linhagens inoculadas com A4/72 quando comparadas àquelas infectadas com A9/92, observando-se significância estatística apenas para TNF- α (Gráfico 12). Esse achado ressalta as características intrínsecas de cada estirpe viral, sugerindo que a infecção causada pelo A4/72 induz resposta imune sistêmica mais efetiva quando comparado ao A9/92.

Os resultados do presente estudo demonstraram que os camundongos C3H/HeJ não apresentaram aumento significativo na expressão gênica das citocinas e quimiocina analisadas em relação ao grupo controle tanto quando inoculados com a estirpe neuropatogênica A4/72 (0,50 vezes para CCL2; 1,49 vezes para TNF- α ; e 0,84 vezes para IL-6), como com a estirpe A9/92 (0,0017 vezes para CCL2; 0,00076 para TNF- α ; e 0,0098 vezes para IL-6). A expressão gênica de TNF- α no SNC dos camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com as estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 evidenciou aumento significativo no 3º dpi, observando-se valores que variaram entre 102,31 (BALB/c infectado com A9/92) e 857,64 (C57BL/6 infectado com A9/92) vezes maiores do que os controles, respectivamente (Tabela 2). Por sua vez, observou-se que houve um aumento significativo na expressão gênica de IL-6 e CCL2 no 3º dpi para os camundongos estudados, exceto para BALB/c inoculado com A4/72. O aumento na expressão gênica de IL-6 variou entre 180,28 (C57BL/6 infectado com A4/72) e 2585,22 (C57BL/6 inoculado com a estirpe A9/92). Já o aumento na expressão gênica de CCL2 variou entre 607,60 (C57BL/6 infectado com A4/72) e 8644,28 (C57BL/6 inoculado com a estirpe A9/92) (Tabela 2 e Gráficos 18 a 20). Concordando com os relatos de Libbey et al. (2011), os achados do presente estudo indicam que o desafio viral com a estirpe neuropatogênica do EHV-1 em camundongos induziu a produção de TNF- α e IL-6 por células residentes (microglia

e astrócitos) e também pelas células inflamatórias circulantes que atravessam a BHE, logo após a infecção viral do tecido nervoso.

Apesar das concentrações plasmáticas de IFN- γ no plasma estarem elevadas no 2º dpi em comparação ao controle, nossos resultados demonstraram uma diminuição da concentração plasmática dessa citocina no 3º dpi e que não houve aumento na expressão de mRNA para IFN- γ no 3º dpi, no tecido nervoso dos camundongos BALB/c, C57BL/6 e C3H/HeJ infectados pelas estirpes neuropatogênicas A4/72 e A9/92 do EHV-1.

Assim como citado anteriormente, a quimiocina CCL2 está envolvida nos mecanismos de eliminação viral atuando diretamente na permeabilidade da BHE e/ou como fator quimiotático para linfócitos e macrófagos no processo inflamatório do SNC (STAMATOVIC et al., 2005; DESHMANE et al., 2009). De acordo com a atuação da quimiocina CCL2, sabe-se que em cavalos acometidos pela EHM ocorrem alterações na permeabilidade da BHE, levando ao aumento da proteína total e xantocromia do líquido cefalorraquidiano, ou seja, coloração amarelada devido à transformação da hemoglobina em pigmentos hematogênicos (PUSTERLA et al., 2009; JOHNSON, 2011). Baseando-se nos resultados do presente estudo e de pesquisas sobre a resposta imune contra outras viroses neurotrópicas, como o vírus da encefalite equina venezuelana (EEV) (SHARMA; MAHESHWARI, 2009) e o HSV-1 em seres humanos e em modelos de infecção que utilizam camundongos (MELCHJORSEN et al., 2003), podemos inferir que a quimiocina CCL2 atua na resposta imune inata contra o EHV-1 (SMITH et al., 2000, 2005).

Infecções virais do SNC podem causar encefalite, ou seja, inflamação no encéfalo que, muitas vezes, está associada a convulsões conforme foi descrito nos camundongos infectados com as estirpes neuropatogênicas A4/72 e A9/92 do EHV-1 no 3º dpi. De modo similar, em um modelo experimental de encefalite viral utilizando o vírus da encefalomielite murina de Theiler (TMEV), os autores observaram que os camundongos infectados apresentavam convulsões agudas no 3º dpi, sugerindo que a resposta imune inata contra a infecção viral, mediada pelas citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6, contribuiu para o desenvolvimento das convulsões (KIRKMAN et al., 2010). Camundongos BALB/c inoculados com a estirpe A9/92 apresentaram convulsões, enquanto que aqueles inoculados com A4/72 demonstraram sinais respiratórios mais evidentes. Sugere-se que tal diferença

nos sinais clínicos possa estar relacionada à maior variação na expressão gênica de IL-6 nos camundongos BALB/c inoculados com A9/92 (aumento de 3,10 para BALB/c infectados com A4/72 e de 451,52 para BALB/c infectados com A9/92) (Tabela 2 e Gráfico 20).

De um modo geral, apesar de não demonstrar significância estatística, descritivamente, camundongos inoculados com a estirpe A9/92 apresentaram maiores aumentos na expressão de mRNA das citocinas TNF- α e IL-6 e quimiocina CCL2 quando comparados àqueles inoculados com a estirpe A4/72, inversamente ao que ocorreu com a concentração plasmática dessas citocinas, onde animais inoculados com A4/72 apresentaram concentrações maiores do que aqueles inoculados com A9/92, conforme já abordado acima. Tais achados afirmam a hipótese de que a estirpe A4/72 induz uma resposta imune sistêmica mais efetiva, enquanto que A9/92 culmina em uma resposta imunológica mais efetiva no SNC.

Soboll Hussey et al. (2014) realizaram um estudo da resposta imune inata em infecções pelo EHV-1 por meio da inoculação da estirpe neuropatogênica Ab4 em cultura primária de células de epitélio respiratório equino (ERECs). A análise do mRNA de citocinas e quimiocina, incluindo IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , TGF- β , IFN- α , IFN- β , IFN- γ e CCL2, foi feita, assim como no estudo em questão, através da reação de PCR em tempo real e a expressão relativa de cada gene determinada pelo cálculo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Da mesma forma, a análise estatística foi feita pelo mesmo método do presente estudo: teste de *Kruskal-Wallis*. Nossos resultados foram consistentes com os achados por esses autores, incluindo aumento na expressão de TNF- α , IL-6 e da quimiocina CCL2. Adicionalmente, tais autores observaram que no terceiro dia após a inoculação das células, as concentrações de IFN- γ foram significativamente menores do que nas células utilizadas como controle.

A redução da expressão do MHC-I também foi demonstrada (SOBOLL HUSSEY et al., 2014). Ela tem sido atribuída à interferência do gene UL49.5 do EHV-1 com a proteína TAP (KOPPERS-LALIC et al., 2005). O MHC-I não é crítico apenas para a indução de respostas de CTL, mas também foi recentemente identificado como um receptor viral por ligação à glicoproteína D do EHV-1 (KURTZ et al., 2010; SASAKI et al., 2011).

Recentemente, Pusterla et al. (2016) analisaram a expressão gênica de citocinas em cérebros parafinizados de 12 cavalos com mieloencefalopatia equina por protozoário e 11 com mieloencefalopatia por EHV-1. O método utilizado foi a PCR em tempo real com a utilização de *primers* e *probes* conforme descrito por Leutenegger et al. (1999) e Colahan et al. (2002) para TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12p40. Posteriormente, utilizou-se o método comparativo do delta Ct (Δ Ct), concordando com os métodos utilizados no presente estudo. Os resultados do estudo de Pusterla et al. (2016) demonstraram que os tecidos do sistema nervoso positivos para EHV-1 não expressaram qualquer IFN- γ , e apenas dois tecidos expressaram níveis baixos de TNF- α . Em concordância com esses resultados, não houve expressão gênica de IFN- γ no tecido nervoso de todos os camundongos infectados com as estirpes neuropatogênicas A4/72 e A9/92 do EHV-1 em relação aos controles no 3º dpi; e os camundongos BALB/c inoculados com a estirpe A9/92, C57BL/6 infectados com o vírus A4/72; e C3H/HeJ inoculados com ambas as estirpes demonstraram baixos níveis de TNF- α também no 3º dpi.

Houve diferença no padrão de resposta das citocinas e quimiocina expressas no SNC entre as linhagens de camundongos estudadas. De modo geral, os valores relativos da expressão de mRNAs para TNF- α , IL-6 e CCL2 foram menores nos camundongos da linhagem C3H/HeJ (H2^k) (valores variaram entre 0,00076 e 1,49 vezes) quando comparados aos camundongos BALB/c (H2^d) (valores entre 3,10 e 748,56 vezes) e C57BL/6 (H2^b) (valores entre 180,28 e 8644,28 vezes) (Tabela 2 e Gráficos 18 a 20).

A indução da produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas ocorre pela ligação dos TLRs a moléculas estranhas, como o EHV-1 (AKIRA et al., 2001; KARIN, 1995). As interações entre os vírus e as células do hospedeiro, o que leva à produção de citocinas inflamatórias, são essenciais para o desenvolvimento das células T e de anticorpos, resultando na defesa contra o agente infeccioso. Contudo, ao mesmo tempo, essas mesmas citocinas ou outros mediadores e quimiocinas estimulam o processo inflamatório, o qual leva a danos teciduais localizados e/ou sistêmicos, colapso circulatório e morte (FINBERG et al., 2005). Vários TLRs têm sido implicados como importantes mediadores da inflamação em resposta à infecção do SNC pelo HSV-1. Especificamente, um dos TLRs mais importantes a mediar a resposta da célula hospedeira contra o HSV-1 é o TLR-2, que é encontrado na

superfície de células da microglia e astrócitos no SNC (KIELIAN, 2006). Foi relatado que camundongos deficientes em TLR-2 têm uma redução na resposta de citocinas e de CCL2 (KURT-JONES et al., 2004). No presente estudo, essa mesma relação entre TLRs e redução de citocinas foi observada nos camundongos C3H/HeJ, os quais, conforme Poltorak et al. (1998), apresentam uma mutação pontual no gene do TLR-4.

A associação entre a infecção viral aguda e TLRs foi observada pela primeira vez quando o papel de TLR4 na resposta para o vírus sincicial respiratório (RSV) foi descrito (KURT-JONES et al., 2000). TLR4 também tem sido associada com a patogênese do vírus do tumor mamário do camundongo (RASSA et al., 2002), vírus da leucemia murino e vírus Coxsackie B4 (TRANTAFILOU; TRIANTAFILOU, 2004). Liu et al. (2013) demonstraram, pela primeira vez após a infecção de células epiteliais cervicais humanas pelo HSV-2, que a expressão de citocinas é dependente de TLR4.

Doyle et al. (2002) relataram que o IRF-3 (item 1.1.4) é ativado unicamente pelo TLR-3 ou TLR-4 e induz a um conjunto específico de genes necessários para a defesa viral, como a transcrição de genes de interferon. De acordo com Marques et al. (2008), a incapacidade de gerar uma resposta imune adaptativa robusta acarreta em uma falha na contenção viral e disseminação do vírus a partir do sistema nervoso periférico para várias áreas do cérebro. Os metabólitos tóxicos de um grande número de células da microglia ativada, incluindo o óxido nítrico, pode causar danos generalizados, como foi observado nos camundongos C3H/HeJ do presente estudo.

Os achados desse estudo sugerem que essas citocinas pró-inflamatórias e quimiocina devem desempenhar um papel importante na fisiopatogenia da EHM, modificando a resposta imune do hospedeiro, no sentido de escapar dos mecanismos de defesa e progredir a infecção.

6 CONCLUSÃO

Em síntese, os resultados do presente estudo possibilitaram as seguintes conclusões:

As diferentes linhagens de camundongos desafiadas com as estirpes neuropatogênicas A4/72 e A9/92 do EHV-1 foram susceptíveis à infecção, exibindo acentuada perda de peso, manifestações respiratórias e neurológicas no 3º dpi.

Constatou-se que as lesões histopatológicas encontradas no encéfalo dos camundongos infectados com as estirpes neuropatogênicas do EHV-1, tais como manguitos perivasculares, degeneração neuronal, necrose, edema, gliose multifocal, hemorragia e leptomeningite neutrofílica foram semelhantes às aquelas observadas em cavalos acometidos pela EHM. As características e a extensão das lesões variaram entre as linhagens de camundongos, sugerindo que elas dependem da resposta imunológica e do hospedeiro infectado. As lesões histopatológicas demonstraram maior grau de severidade nos animais inoculados com a estirpe A4/72 do EHV-1 quando comparados com aqueles inoculados com A9/92, evidenciando que elas dependem também da estirpe viral em questão.

Os resultados indicaram também que as linhagens de camundongos com padrão de resposta imune predominantemente Th1, ou seja, C57BL/6 e C3H/HeJ, infectados com estirpes neuropatogênicas do EHV-1, reproduziram de maneira mais fidedigna as lesões encontradas em cavalos acometidos pela EHM. Por sua vez, os camundongos da linhagem BALB/c, com predomínio da resposta imune Th2, apresentaram manifestações respiratórias mais evidentes.

As citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 e a quimiocina CCL2, produzidas pelas células da glia logo após a infecção viral, são importantes na resposta neuroimune. O aumento da expressão de CCL2 no SNC dos camundongos infectados indica que essa quimiocina desempenha um papel fundamental na resposta imune contra o EHV-1, aumentando a permeabilidade da BHE e atuando como fator quimiotático para leucócitos. O aumento da expressão de TNF- α e IL-6 nos camundongos infectados pelo EHV-1 pode estar relacionado às convulsões observadas nesses camundongos.

A estirpe A4/72 do EHV-1 induz uma resposta imune sistêmica mais efetiva, enquanto que A9/92 culmina em uma resposta imunológica mais efetiva no SNC.

A supressão do IFN-I sugere ser um mecanismo de escape do EHV-1 frente ao sistema imunológico. A baixa expressão de IL-6, TNF- α e da quimiocina CCL2 em camundongos C3H/HeJ se explica pela mutação no gene TLR-4 existente nessa linhagem de camundongo. Infere-se que esse gene seja um dos PRRs de grande importância na resposta do sistema imunológico frente à infecção pelo EHV-1. Adicionalmente, os camundongos C3H/HeJ apresentaram lesões histopatológicas mais severas no SNC quando comparados com BALB/c e C57BL/6. Depreende-se que a baixa expressão gênica das citocinas permite que o EHV-1 cause maiores danos celulares nessa linhagem de camundongo.

Sugere-se que o IFN-I e o gene TLR-4 apresentam importante papel na patogênese do EHV-1 bem como proteínas do agente viral responsáveis pela supressão do interferon e partículas virais que sejam reconhecidas pelo TLR-4 podem ser alvos para o desenvolvimento de novas abordagens para o tratamento da doença viral e para a eficiência de imunógenos.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and molecular immunology**. 4. ed. Philadelphia: Saunders, 2000. 553 p.
- AHMED, R.; BIRON, C. A. Immunity to viruses. In: PAUL, W. E. **Fundamental immunology**. 4. ed. New York: LippincottRaven, 1998. Cap. 39, p. 1295-1334.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nature Immunology**, v. 2, p. 675-680, 2001.
- ALBER, D. G.; GREENSILL, J.; KILLINGTON, R. A.; STOKES, A. Role of T-cells, virus neutralising antibodies and complement-mediated antibody lysis in the immune response against equine herpesvirus type-1 (EHV-1) infection of C3H (H-2k) and BALB/c (H-2d) mice. **Research in Veterinary Science**, v. 59, n. 3, p. 205-213, 1995.
- ALBER, D. G.; KILLINGTON, R. A.; STOKES, A. Solid matrix-antibody-antigen complexes incorporating equine herpesvirus 1 glycoproteins C and D elicit anti-viral immune responses in BALB/c (H-2K(d)) and C3H (H-2K(k)) mice. **Vaccine**, v. 19, n. 7-8, p. 895-901, 2000.
- ALLEN, G. P. Risk factors for development of neurologic disease after experimental exposure to equine herpesvirus-1 in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 69, p. 1595–1600, 2008.
- ALLEN, G. P.; BREATHNACH, C. C. Quantification by real-time PCR of the magnitude and duration of leucocyte-associated viraemia in horses infected with neuropathogenic vs. non-neuropathogenic strains of EHV-1. **Equine Veterinary Journal**, v. 38, n. 3, p. 252-257, 2006.
- ALLEN, G. P.; BRYANS, J. T. Molecular epizootiology, pathogenesis, and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. **Progress in Veterinary Microbiology and Immunology**, v. 2, p. 78-144, 1986.
- ALLEN, G. P.; KYDD, J. H.; SLATER, J. D.; SMITH, K. C. Equid herpesvirus 1 (EHV-1) and -4 (EHV-4) infections. In: COETZER, J. A. W.; TUSTIN, R. C. (Ed.). **Infectious Diseases of Livestock**. [s.l.: s.n.], 2004. p. 829–859.
- ALLEN, G. P.; YEARGAN, M. R.; COSTA, L. R.; CROSS, R. Major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T-lymphocyte responses in horses infected with equine herpesvirus 1. **Journal of Virology**, v. 69, n. 1, p. 606-612, 1995.
- ALLEN, G. P.; YEARGAN, M. R.; TURTINEN, L. W.; BRYANS, J. T.; MCCOLLUM, W. H. Molecular epizootologic studies of equine herpesvirus-1 infections by

restriction endonuclease fingerprinting of viral DNA. **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, n. 2, p. 263-271, 1983.

AMBAGALA, A. P.; GOPINATH, R. S.; SRIKUMARAN, S. Peptide transport activity of the transporter associated with antigen processing (TAP) is inhibited by an early protein of equine herpesvirus-1. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 349–353, 2004.

APHIS. **Equine herpesvirus myeloencephalopathy**: a potentially emerging disease. 2007. Disponível em: <http://www.aphis.usda.gov/animal_health/emergingissues/downloads/ehv1final.pdf>. Acesso em: 12 set. 2015.

AWAN, A. R.; BAXI, M.; FIELD, H. J. EHV-1-induced abortion in mice and its relationship to stage of gestation. **Research in Veterinary Science**, v. 59, n. 2, p. 139-145, 1995.

AWAN, A. R.; CHONG, Y. C.; FIELD, H. J. The pathogenesis of equine herpesvirus type 1 in the mouse: a new model for studying host responses to the infection. **The Journal of General Virology**, v. 71, pt. 5, p. 1131-1140, 1990.

AWAN, A. R.; FIELD, H. J. Effects of phosphonylmethoxyalkyl derivatives studied with a murine model for abortion induced by equine herpesvirus 1. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, p. 2478-2482, 1993.

AZAB, W.; LEHMANN, M. J.; OSTERRIEDER, N. Glycoprotein H and alpha4beta1 integrins determine the entry pathway of alphaherpesviruses. **Journal of Virology**, v. 87, p. 5937–5948, 2013.

AZMI, M.; FIELD, H. J. Cell-mediated antiviral response to equine herpesvirus type 1 demonstrated in a murine infection model by means of adoptive transfer of immune cells. **The Journal of General Virology**, v. 74, pt. 2, p. 275-280, 1993a.

AZMI, M.; FIELD, H. J. Interactions between equine herpesvirus type 1 and equine herpesvirus type 4: T cell responses in a murine infection model. **The Journal of General Virology**, v. 74, p. 2339-2345, 1993b.

BABIUK, L. A.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; TIKOO, S. K. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. **Veterinary Microbiology**, v. 53, n. 1-2, p. 31-42, 1996.

BARTELS, T.; STEINBACH, F.; HAHN, G.; LUDWIG, H.; BORCHERS, K. In situ study on the pathogenesis and immune reaction of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) infections in mice. **Immunology**, v. 93, n. 3, p. 329-334, 1998.

BAXI, M. K.; BORCHERS, K.; BARTELS, T.; SCHELLENBACH, A.; BAXI, S.; FIELD, H. Molecular studies of the acute infection, latency and reactivation of equine herpesvirus-1 (EHV-1) in the mouse model. **Virus Research**, v. 40, p. 33-45, 1996.

- BAXI, M. K.; EFSTATHIOU, S.; LAWRENCE, G.; WHALLEY, J. M.; SLATER, J. D.; FIELD, H. J. The detection of latency-associated transcripts of equine herpesvirus 1 in ganglionic neurons. **The Journal of General Virology**, v. 76, p. 3113-3118, 1995.
- BREATHNACH, C. C.; SOBOLL, G.; SURESH, M.; LUNN, D. P. Equine herpesvirus-1 infection induces IFN-gamma production by equine T lymphocyte subsets. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 103, n. 3-4, p. 207-215, 2005.
- BREDER, C. D.; DINARELLO, C. A.; SAPER, C. B. Interleukin-1 immunoreactive innervation of the human hypothalamus. **Science**, v. 40, n. 4850, p. 321-324, 1988.
- BURGESS, B. A.; TOKATELOFF, N.; MANNING, S.; LOHMANN, K.; LUNN, D. P.; HUSSEY, S. B.; MORLEY, P. S. Nasal shedding of equine herpesvirus-1 from horses in an outbreak of equine herpes myeloencephalopathy in Western Canada. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 26, p. 384-392, 2012.
- CANTIN, E.; TANAMACHI, B.; OPENSHAW, H. Role for gamma interferon in control of herpes simplex virus type 1 reactivation. **Journal of Virology**, v. 73, p. 3418-3423, 1999.
- CARLTON, W. W.; MCGAVIN, M. D. Reproductive system: female. In: CARLTON, W. W.; MCGAVIN, M. D. (Ed.). **Thomson's Special Veterinary Pathology**. 3. ed. St. Louis: Elsevier, 1995. p. 529-530.
- CARRIGAN, M.; COSGROVE, P.; KIRKLAND, P.; SABINE, M. An outbreak of Equid herpesvirus abortion in New South Wales. **Equine Veterinary Journal**, v. 23, p. 108-110, 1991.
- CARVALHO, R. F.; SPILKI, F. R.; CUNHA, E. M.; STOCCO, R. C.; ARNS, C. W. Molecular data of UL24 homolog gene (ORF37) from Brazilian isolates of equine herpesvirus type 1. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 1, p. 494-497, 2012.
- CHRINSIDE, E.; SINCLAIR, R.; MUMFORD, J. A. Doenças respiratórias virais . In: REED, S. M.; BAYLE, W. M. **Medicina interna equina**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000. Cap 2.2, p. 79-85.
- COLAHAN, P. T.; KOLLIAS-BAKER, T. C.; LEUTENEGGER, C. M.; JONES, J. H. Does training affect mRNA transcription for cytokine production in circulating leucocytes? **Equine Veterinary Journal Supplement**, v. 34, p. 154-158, 2002.
- COLLE, C. F.; TARBET, E. B.; GRAFTON, W. D.; JENNINGS, S. R.; O'CALLAGHAN, D. J. Equine herpesvirus-1 strain KyA, a candidate vaccine strain, reduces viral titers in mice challenged with a pathogenic strain. **Virus Research**, v. 43, p. 111-124, 1996.
- COOMBS, D. K.; PATTON, T.; KOHLER, A. K.; SOBOLL, G.; BREATHNACH, C.; TOWNSEND, H. G. G.; LUNN, D. P. Cytokine responses to EHV-1 infection in

immune and non-immune ponies. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 111, n. 1-2, p. 109-116, 2006.

CRABB, B. S.; STUDDERT, M. J. Equine herpesviruses 4 (equine rhinopneumonitis virus) and 1 (equine abortion virus). **Advances in Virus Research**, v. 45, p. 153–90, 1995

CSELLNER, H.; WHALLEY, J. M.; LOVE, D. N. Equine herpesvirus 1 HVS25A isolated from an aborted foetus produces disease in BALB/c mice. The **Australian Veterinary Journal**, v. 72, p. 68-69, 1995.

CUNHA, E. M. S.; PEIXOTO, Z. M. P.; KROEFF, S. S.; QUEIROZ, L. H.; KOTAIT, I. Isolamento e identificação do herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1): confirmação do diagnóstico clínico. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 6., 1993, São Paulo. **Anais... 1993**. p. 15.

CUXSON, J. L.; HARTLEY, C. A.; FICORILLI, N. P.; SYMES, S. J.; DEVLIN, J. M.; GILKERSON, J. R. Comparing the genetic diversity of ORF30 of Australian isolates of 3 equid alphaherpesviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 169, 50–57, 2014.

DESHMANE, S. L.; KREMLEV, S.; AMINI, S.; SAWAYA, B. E. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 29, n. 6, p. 313-326, 2009.

DIXON, R. J.; HARTLEY, W. J.; HUTCHINS, D. R.; LEPHERD, E. E.; FEILEN, C.; JONES, R. F.; LOVE, D. N.; SABINE, M.; WELLS, A. I. Perinatal foal mortality associated with a herpesvirus. **Australian Veterinary Journal**, v. 54, p. 103–105, 1978.

DÖRRIES, R. The role of T-cell-mediated mechanisms in virus infections of the nervous system. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 253, p. 219-245, 2001.

DOYLE, S. E.; VAIDYA, S. A.; O'CONNELL, R.; DADGOSTAR, H.; DEMPSEY, P. W.; WU, T. T.; RAO, G.; SUN, R.; HABERLAND, M. E.; MODLIN, R. L.; CHENG, G. IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. **Immunity**, v. 17, p. 251–263, 2002.

DUNOWSKA, M. A review of equid herpesvirus 1 for the veterinary practitioner. Part B: Pathogenesis and epidemiology. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 62, n. 4, p. 179 - 188, 2014.

EDINGTON, N.; BRIDGES, C. G.; HUCKLE, A. Experimental reactivation of equid herpesvirus 1 (EHV 1) following the administration of corticosteroids. **Equine Veterinary Journal**, v. 17, p. 369–372, 1985.

EDINGTON, N.; BRIDGES, C. G.; PATEL, J. R. Endothelial cell infection and thrombosis in paralysis caused by equid herpesvirus-1: equine stroke. **Archives of Virology**, v. 90, p. 111–24, 1986.

EDINGTON, N.; WELCH, H. M.; GRIFFITHS, L. The prevalence of latent Equid herpesviruses in the tissues of 40 abattoir horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 26, p. 140–142, 1994.

EL-NAHASS, E.; EL-HABASHI, N.; NAYEL, M.; KASEM, S.; FUKUSHI, H.; SUZUKI, Y.; HIRATA, A.; SAKAI, H.; YANAI, T. Kinetics and pathogenicity of equine herpesvirus-9 infection following intraperitoneal inoculation in hamsters. **Journal of Comparative Pathology**, v. 145, n. 2-3, p. 271–281, 2011.

EL-HABASHI, N.; EL-NAHASS, E.; FUKUSHI, H.; NAYEL, M.; HIBI, D.; SAKAI, H.; YANAI, T. Effects of equine herpesvirus-9 infection in pregnant mice and hamsters. **Journal of Comparative Pathology**, v. 144, n. 2-3, p. 103-112, 2011a.

EL-HABASHI, N.; MURAKAMI, M.; EL-NAHASS, E.; HIBI, D.; SAKAI, H.; FUKUSHI, H.; SASSEVILLE, V.; YANAI, T. Study on the infectivity of equine herpesvirus 9 (EHV-9) by different routes of inoculation in hamsters. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 3, p. 558-564, 2011b.

FIELD, H.J.; AWAN, A. R. Effective chemotherapy of equine herpesvirus 1 by phosphonylmethoxyalkyl derivatives of adenine demonstrated in a novel murine model for the disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, p. 709-717, 1990.

FIELD, H. J.; AWAN, A. R.; DE LA FUENTE, R. Reinfection and reactivation of equine herpesvirus-1 in the mouse. **Archives of Virology**, v. 123, n. 3-4, p. 409-419, 1992.

FINBERG, R. W.; KNIPE, D. M.; KURT-JONES, E. A. Herpes simplex virus and toll-like receptors. **Viral Immunology**, v. 18, p. 457-465, 2005.

FISCHER, T.; BUTTNER, M. RZIHA, H. J. T helper 1-type cytokine transcription in peripheral blood mononuclear cells of pseudorabies virus (Suid herpesvirus 1)-primed swine indicates efficient immunization. **Immunology**, v. 101, p. 378-387, 2000.

FOOTE, C. E.; RAIDAL, S. L.; PECENPETELOVSKA, G.; WELLINGTON, J. E.; WHALLEY, J. M. Inoculation of mares and very young foals with EHV-1 glycoproteins D and B reduces virus shedding following respiratory challenge with EHV-1. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, n. 111, p. 97-108, 2006.

FRAMPTON, A. R.; SMITH, P. M; ZHANG, Y.; GRAFTON, W. D.; MATSUMURA, T.; OSTERRIEDER, N.; O'CALLAGHAN, D. J. Meningoencephalitis in mice infected with

an equine herpesvirus 1 strain KyA recombinant expressing glycoprotein I and glycoprotein E. **Virus Genes**, v. 29, n. 1, p. 9-17, 2004.

FRANCO, A. C. ROEHE, P. M. Herpesviridae. In: FLORES, E. F. **Virologia veterinária**. Santa Maria, RS: Ed. EFSM. 2012. Cap. 17. p. 433-477.

FRYMUS, T.; KITA, J.; WOYCIECHOWSKA, S.; GANOWICZ, M. Foetal and neonatal foal losses on equine herpesvirus type 1 (EHV-1) infected farms before and after EHV-1 vaccination was introduced. **Polskie Archiwum Weterynaryjne (Polish Veterinary Archives)**, v. 26, p. 7–14, 1986.

FUKUSHI, H.; TANIGUCHI, A.; YASUDA, K.; YANAI, T.; MASEGI, T.; YAMAGUCHI, T.; HIRAI, K. A hamster model of equine herpesvirus 9 induced encephalitis. **Journal of NeuroVirology**, v. 6, n. 4, p. 314-319, 2000.

FUKUSHI, H.; TOMITA, T.; TANIGUCHI, A.; OCHIAI, Y.; KIRISAWA, R.; MATSUMURA, T.; YANAI, T.; MASEGI, T.; YAMAGUCHI, T.; HIRAI, K. Gazelle herpesvirus 1: a new neurotropic herpesvirus immunologically related to equine herpesvirus 1. **Virology**, v. 227, n. 1, p. 34-44, 1997.

GARDINER, D. W.; LUNN, D. P.; GOEHRING, L. S.; CHIANG, Y. W.; COOK, C.; OSTERRIEDER, N.; MCCUE, P.; DEL PIERO, F.; HUSSEY, S. B.; HUSSEY, G. S. Strain impact on equine herpesvirus type 1 (EHV-1) abortion models: Viral loads in fetal and placental tissues and foals. **Vaccine**, v. 30, p. 6564–6572, 2012.

GERARD, C.; ROLLINS, B. J. Chemokines and disease. **Nature Immunology**, v. 2, n. 2, p. 108–115, 2001.

GIBSON, J. S.; SLATER, J. D.; AWAN, A. R.; FIELD, H. J. Pathogenesis of equine herpesvirus-1 in specific pathogen-free foals: primary and secondary infections and reactivation. **Archives of Virology**, v. 123, p. 351–366, 1992a.

GIBSON, J. S.; SLATER, J. D.; FIELD, H. J. The pathogenicity of Ab4p, the sequenced strain of equine herpesvirus-1, in specific pathogen-free foals. **Virology**, v. 189, p. 317–319, 1992b.

GILKERSON, J. R.; WHALLEY, J. M.; DRUMMER, H. E.; STUDDERT, M. J.; LOVE, D. N. Epidemiological studies of equine herpesvirus 1 (EHV-1) in Thoroughbred foals: a review of studies conducted in the Hunter Valley of New South Wales between 1995 and 1997. **Veterinary Microbiology**, v. 68, p. 15–25, 1999.

GOODMAN, L. B.; LOREGIAN, A.; PERKINS, G. A.; NUGENT, J.; BUCKLES, E. L.; MERCORELLI, B.; KYDD, J. H.; PALU, G.; SMITH, K. C.; OSTERRIEDER, N.; DAVIS-POYNTER, N. A point mutation in a herpesvirus polymerase determines neuropathogenicity. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 11, p. 160, 2007.

GOEHRING, L. S.; SOBOLL HUSSEY, G.; GOMEZ DIEZ, M.; BENEDICT, K.; MAXWELL, L. K.; MORLEY, P. S.; SLOET VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, M. M.; LUNN, D. P. Plasma D-dimer concentrations during experimentalEHV-1 infection of horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, n. 6, p. 1535-1542, 2013.

GOSZTONYI, G.; BORCHERS, K.; LUDWIG, H. Pathogenesis of equine herpesvirus-1 infection in the mouse model. **APMIS Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 117, n. 1, p. 10-21, 2009.

GRAY, W. L.; BAUMANN, R. P.; ROBERTSON, A. T.; CAUGHMAN, G. B.; O'CALLAGHAN, D. J.; STACZEK, J. Regulation of equine herpesvirus type 1 gene expression: characterization of immediate early, early, and late transcription. **Virology**, v. 158, n. 1, p. 79-87, 1987.

GUÉNET, J. L. Assessing the genetic component of the susceptibility of mice to viral infections. **Briefings in functional genomics & proteomics**, v. 4, n. 3, p. 225-240, 2005.

HAGGLUND, R.; ROIZMAN, B. Role of ICP0 in the strategy of conquest of the host cell by Herpes Simplex Virus 1. **Journal of Virology**, v. 78, n. 5, p. 2169-2178, 2004.

HASABE, R.; KIMURA, T.; NAKAMURA, K.; OKAZAKI, K.; OCHIAI, K.; WADA, R.; UMEMURA, T. Passage of equine herpesvirus-1 in suckling mouse brain enhances extraneural virus growth and subsequent hematogenous neuroinvasion. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, n. 10, p. 907-912, 2002a.

HASABE, R.; KIMURA, T.; SATO, E.; OKAZAKI, K.; OCHIAI, K.; WADA, R.; UMEMURA, T. Equine herpesvirus-1-induced encephalomyelitis in mice: a comparative study of neuroadapted virus and its parental strain. **Journal of Comparative Pathology**, v. 127, n. 2-3, p. 118-125, 2002b.

HENNINGER, R. W.; REED, S. M.; SAVILLE, W. J.; ALLEN, G. P.; HASS, G. F.; KOHN, C. W.; SOFALY, C. Outbreak of neurologic disease caused by equine herpesvirus-1 at a university equestrian center. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, p. 157-65, 2007.

HORA, A. S.; TONIETTI, P. O.; TANIWAKI, S. A.; ASANO, K. M.; MAIORKA, P.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDÃO, P. E. Feline Coronavirus 3c Protein: A Candidate for a Virulence Marker? **BioMed Research International**, v. 2016, article ID 8560691, p. 1-9, 2016.

HUSSEY, S. B.; CLARK, R.; LUNN, K. F.; BREATHNACH, C.; SOBOLL, G.; WHALLEY, J. M.; LUNN, D. P. Detection and quantification of equine herpesvirus-1 viremia and nasal shedding by real-time polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, p. 335-342, 2006.

HUSSEY, G. S.; GOEHRING, L. S.; LUNN, D. P.; HUSSEY, S. B.; HUANG, T.; OSTERRIEDER N.; POWELL, C.; HAND, J.; HOLZ, C.; SLATER, J. Experimental infection with equine herpesvirus type 1 (EHV-1) induces chorioretinal lesions. **Veterinary Research**, v. 44, p. 118, 2013.

IDRISS, H. T.; NAISMITH, J. H. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). **Microscopy Research and Technique**, v. 50, n. 3, p. 184-195, 2000.

INAZU, M.; TSUHA, O.; KIRISAWA, R.; KAWAKAMI, Y.; IWAI, H. Equid herpesvirus 1 infection in mice. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 55, n. 1, p. 119-121, 1993.

JACKSON, T. A.; OSBURN, B. I.; KENDRICK, J. W. Equine herpesvirus 1 infection in horses: studies on the experimentally induced neurologic disease. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, p. 709-719, 1977.

JOHNSON, A. L. Update on infectious diseases affecting the equine nervous system. **The Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 27, n. 3, p. 573-587, 2011.

KANITZ, F. A.; CARGNELUTTI, J. F.; ANZILIERO, D.; GONÇALVES, K. V.; MASUDA, E. K.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Respiratory and neurological disease in rabbits experimentally infected with equid herpesvirus 1. **Microbial Pathogenesis**, v. 87, p. 45-50, 2015.

KARIN, M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 28, p. 16483-16486, 1995.

KASEM, S.; YU, M. H. H.; YAMADA, S.; KODAIRA, A.; MATSUMURA, T.; TSUJIMURA, K.; MADBOULY, H.; YAMAGUCHI, T.; OHYA, K.; FUKUSHI, H. The ORF37 (UL24) is a neuropathogenicity determinant of equine herpesvirus 1 (EHV-1) in the mouse encephalitis model. **Virology**, v. 400, n. 2, p. 259-270, 2010.

KIELIAN, T. Toll-like receptors in central nervous system glial inflammation and homeostasis. **Journal of Neuroscience Research**, v. 83, p. 711-730, 2006.

KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. **Virus taxonomy: ninth report of the international committee on taxonomy of viruses**. San Diego, California: Elsevier, 2011.

KIRKMAN, N. J.; LIBBEY, J. E.; WILCOX, K. S.; WHITE, H. S.; FUJINAMI, R. S. Innate but not adaptive immune responses contribute to behavioral seizures following viral infection. **Epilepsia**, v. 51, n. 3, p. 454-464, 2010.

KOPPERS-LALIC, D.; REITS, E. A.; RESSING, M. E.; LIPINSKA, A. D.; ABELE, R.; KOCH, J.; REZENDE, M. M.; ADMIRAAL, P.; VAN LEEUWEN, D.; BIENKOWSKA-

SZEWCZYK, K.; METTENLEITER, T. C.; RIJSEWIJK, F. A.; TAMPE, R.; NEEFJES, J.; WIERTZ, E. J. Varicelloviruses avoid T cell recognition by UL49.5- mediated inactivation of the transporter associated with antigen processing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 5144–5149, 2005.

KOPPERS-LALIC, D.; VERWEIJ, M. C.; LIPINSKA, A. D.; WANG, Y.; QUINTEN, E.; REITS, E. A.; KOCH, J.; LOCH, S.; MARCONDES REZENDE, M.; DAUS, F.; BIENKOWSKA-SZEWCZYK, K.; OSTERRIEDER, N.; METTENLEITER, T. C.; HEEMSKERK, M. H.; TAMPÉ, R.; NEEFJES, J. J.; CHOWDHURY, S. I.; RESSING, M. E.; RIJSEWIJK, F. A.; WIERTZ, E. J. Varicellovirus UL49.5 proteins differentially affect the function of the transporter associated with antigen processing, TAP. **PLoS Pathogens**, v. 4, p. 1000080, 2008

KUKREJA, A.; LOVE, D. N.; WHALLEY, J. M.; FIELD, H. J. Study of protective immunity of coexpressed glycoprotein H and L of equine herpesvirus-1 in a murine intranasal infection model. **Veterinary Microbiology**, v. 60, p. 1-11, 1998a.

KUKREJA, A.; WALKER, C.; FITZMAURICE, T.; AWAN, A.; LOVE, D. N.; WHALLEY, J. M.; FIELD, H. J. Protective effects of equine herpesvirus 1 (EHV-1) glycoprotein B in a murine model of EHV-1-induced abortion. **Veterinary Microbiology**, v. 62, p. 303-311, 1998b.

KURT-JONES, E. A.; CHAN, M.; ZHOU, S.; WANG, J.; REED, G.; BRONSON, R.; ARNOLD, M. M.; KNIPE, D. M.; FINBERG, R. W. Herpes simplex virus 1 interaction with toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 1315–1320, 2004.

KURT-JONES, E. A.; POPOVA, L.; KWINN, L.; HAYNES, L. M.; JONES, L. P.; TRIPP, R. A.; WALSH, E. E.; FREEMAN, M. W.; GOLENBOCK, D. T.; ANDERSON, L. J.; FINBERG, R. W. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. **Nature Immunology**, v. 1, p. 398–401, 2000.

KURTZ, B. M.; SINGLETARY, L. B.; KELLY, S. D.; FRAMPTON, A. R. Jr. *Equus caballus* major histocompatibility complex class I is an entry receptor for equine herpesvirus type 1. **Journal of Virology**, v. 84, 9027–9034, 2010.

KYDD, J. H.; SMITH, K. C.; HANNANT, D.; LIVESAY, G. J.; MUMFORD, J. A. Distribution of equid herpesvirus-1 (EHV-1) in the respiratory tract of ponies - implications for vaccination strategies. **Equine Veterinary Journal**, v. 26, p. 466-469, 1994.

KYDD, J. H.; SLATER, J.; OSTERRIEDER, N.; LUNN, D. P.; ANTCZAK, D. F.; AZAB, W.; BALASURIYA, U.; BARNETT, C.; BROSNAHAN, M.; COOK, C.; DAMIANI, A.; ELTON, D.; FRAMPTON, A.; GILKERSON, J.; GOEHRING, L.; HOROHOV, D.; MAXWELL, L.; MINKE, J.; MORLEY, P.; NAUWYNCK, H.; NEWTON, R.; PERKINS, G.; PUSTERLA, N.; SOBOLL-HUSSEY, G.; TRAUB-

DARGATZ, J.; TOWNSEND, H.; VAN DE WALLE, G. R.; WAGNER, B. Third international Havemeyer workshop on equine herpesvirus type 1. **Equine Veterinary Journal**, v. 44, p. 513–517, 2012.

KYDD, J. H.; TOWNSEND, H. G. G.; HANNANT, D. The equine immune response to equine herpesvirus-1: the virus and its vaccines. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 111, n. 1-2, p. 15-30, 2006.

KYDD, J. H.; WATTRANG, E.; HANNANT, D. Pre-infection frequencies of equine herpesvirus-1 specific, cytotoxic T lymphocytes correlate with protection against abortion following experimental infection of pregnant mares. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 96, p. 207–217, 2003.

LEUTENEGGER, C. M.; VON RECHENBERG, B.; HUDER, J. B.; ZLINSKY, K.; MISLIN, C.; AKENS, M. K.; AUER, J.; LUTZ H. Quantitative real-time PCR for equine cytokine mRNA in nondecalfied bone tissue embedded in methyl methacrylate. **Calcified Tissue International**, v. 65, n. 5, p. 378-383, 1999.

LIBBEY, J. E.; KENNETT, N. J.; WILCOX, K. S.; WHITE, H. S.; FUJINAMI, R. S. Interleukin-6, produced by resident cells of the central nervous system and infiltrating cells, contributes to the development of seizures following viral infection. **Journal of Virology**, v. 85, n. 14, p. 6913-6922, 2011.

LIN, X.; MA, X.; RODRIGUEZ, M.; ROOS, R. P. CD4+ T cells are important for clearance of DA strain of TMEV from the central nervous system of SJL/J mice. **International Immunology**, v. 16, n. 9, p. 1237-1240, 2004.

LIU, H.; CHEN, K.; FENG, W.; WU, X.; LI, H. TLR4-MyD88/Mal-NF-kB axis is involved in infection of HSV-2 in human cervical epithelial cells. **PLOS ONE**, v.8, n. 11, e. 80327, 2013.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LUNN, D. P.; DAVIS-POYNTER, N.; FLAMINIO, M. J.; HOROHOV, D. W.; OSTERRIEDER, K.; PUSTERLA, N.; TOWNSEND, H. G. Equine herpesvirus-1 consensus statement. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, p. 450–461, 2009.

LUNN, D. P.; MAYHEW I. Neurological examination of the horse. **Equine Veterinary Education**, v. 1, p. 94-101, 1989.

MA, G.; AZAB, W.; OSTERRIEDER, K. Equine herpesviruses type 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) – Masters of co-evolution and a constant threat to equids and beyond. **Veterinary Microbiology**, v. 167, n. 1–2, p. 123–34, 2013.

MA, G.; FEINEIS, S.; OSTERRIEDER, N.; VAN DE WALLE, G. R. Identification and characterization of equine herpesvirus type 1 pUL56 and its role in virus-induced downregulation of major histocompatibility complex class I. **Journal of Virology**, v. 86, p. 3554–3563, 2012.

MARQUES, C. P.; CHEERAN, M. C.; PALMQUIST, J. M.; HU, S.; URBAN, S. L.; LOKENSGARD, J. R. Prolonged microglial cell activation and lymphocyte infiltration following experimental herpes encephalitis. **The Journal of Immunology**, v. 181, p. 6417–6426, 2008.

MCCARTAN, C. G.; RUSSELL, M. M.; WOOD, J. L.; MUMFORD, J. A. Clinical, serological and virological characteristics of an outbreak of paresis and neonatal foal disease due to equine herpesvirus-1 on a stud farm. **Veterinary Record**, v. 136, n. 1, p. 7-12, 1995.

MANICKAN, E.; ROUSE, B. T. Roles of different T-cell subsets in control of herpes simplex virus infection determined by using T-cell-deficient mouse-models. **Journal of Virology**, v. 69, n. 12, p. 8178-8179, 1995.

MARSHALL, K. R.; FIELD, H. J. Demonstration of equine herpesvirus-1 neuronal latency in murine olfactory bulbs using a novel combined in situ PCR and protein synthesis method. **Virology**, v. 229, p. 279-282, 1997.

MELCHJORSEN, J.; SØRENSEN, L. N.; PALUDAN, S. R. Expression and function of chemokines during viral infections : from molecular mechanisms to in vivo function. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 74, p. 331-343, 2003.

MIKLOSKA, Z.; CUNNINGHAM, A. L. Alpha and gamma interferons inhibit herpes simplex virus type 1 infection and spread in epidermal cells after axonal transmission. **Journal of Virology**, v. 75, p. 11821-11826, 2001.

MILLIGAN, J. A.; ROSSDALE, P. D.; JESSETT, D. M. GANN, S. J. OUSEY, J.; COOK, R. F. Interferon- γ enhances resolution of herpes simplex virus type 2 infection of the murine genital tract. **Virology**, v. 229, p. 259-268, 1997.

MORI, C. M. C.; MORI, E.; FAVARO, L. L.; SANTOS, C. R.; LARA, M. C. C. S.; VILLALOBOS, E. M. C.; CUNHA, E. M. S.; BRANDÃO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J.; MAIORKA, P. C. Equid herpesvirus type-1 exhibits neurotropism and neurovirulence in a mouse model. **Journal of Comparative Pathology**, v. 146, n. 2-3, p. 202-210, 2012.

MORI, C. M. C.; MORI, E.; FERNANDES, W. R.; LARA, M. C. C. S. H.; MASSIRONI, S. M. G.; CUNHA, E. M. S.; VILLALOBOS, E. M.; MAIORKA, P. C. Brazilian Isolates of Equid Herpesvirus Type 1 Show Neurotropism and Neurovirulence in Mouse Model. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 45, p. 130, 2006.

MORI, E. **Infecção experimental em cavalos pelo herpesvírus equino tipo 1: aspectos clínicos e detecção do agente pela reação em cadeia pela polimerase.** 2005. 159 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MORI, E.; BORGES, A. S.; DELFIOL, D. J. Z.; OLIVEIRA FILHO, J. P.; GONÇALVES, R. C.; CAGNINI, D. Q.; LARA, M. C. C. S. H.; CUNHA, E. M. S.; VILLALOBOS, E. M. C.; NASSAR, A. F. C.; CASTRO, A. M. M. G.; BRANDAO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J. First detection of the equine herpesvirus 1 neuropathogenic variant in Brazil. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 30, n. 3, p. 949-954, 2011.

MOSSMAN, K. L.; ASHKAR, A. A. Herpesviruses and the innate immune response. **Viral Immunology**, v. 18, p. 267-281, 2005.

MOSSMAN, K. L.; MACGREGOR, P. F.; ROZMUS, J. J.; GORYACHEV, A. B.; EDWARDS, A. M.; SMILEY, J. R. Herpes simplex virus triggers and then disarms a host antiviral response. **Journal of Virology**, v. 75, p. 750-758, 2001.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Guide for the care and use of laboratory animals.** 8th ed. Washington D.C: National Academies Press, 2010.

NORONHA, L. E.; ANTCZAK, D. F. Modulation of T-cell reactivity during equine pregnancy is antigen independent. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 68, p. 107-115, 2012.

NOWOTNY, N.; BURTSCHER, H.; BURKI, F. Neuropathogenicity for suckling mice of equine herpesvirus 1 from the Lipizzan outbreak 1983 and of selected other EHV 1 strains. **Zentralbl Veterinarmed B**, v. 34, p. 441-448, 1987.

NUGENT, J.; SMITH, K. C.; MUMFORD, J. A.; SWANN, Z.; NEWTON, J. R.; BOWDEN, R. J.; ALLEN, G. P.; IROL, J. V. Analysis of Equid Herpesvirus 1 Strain Variation Reveals a Point Mutation of the DNA Polymerase Strongly Associated with Neuropathogenic versus Nonneuropathogenic Disease Outbreaks. **Journal of Virology**, v. 80, n. 8, p. 4047-4060, 2006.

OIE. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. Equine rhinopneumonitis (equine herpesvirus-1 and -4). In: ----- **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2015.** 2015. Cap 2.5.9, p. 894-903. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.09_EQUINE_RHI_NO.pdf. Acesso em 24 jul. 2016.

OSTERRIEDER, N.; WAGNER, R.; BRANDMULLER, C.; SCHMIDT, P.; WOLF, H.; KAADEN, O. R. Protection against EHV-1 challenge infection in the murine model after vaccination with various formulations of recombinant glycoprotein gp14 (gB). **Virology**, v. 208, p. 500-510, 1995.

OSTLUND, E. N. The equine herpesviruses. **Veterinary Clinics of North America: equine practice**, v. 9, n. 2, p. 283-294, 1993.

PACKIARAJAH, P.; WALKER, C.; GILKERSON, J.R.; WHALLEY, J .M.; LOVE, D. N. Immune responses and protective efficacy of recombinant baculovirus expressed glycoproteins of equine herpesvirus 1 (EHV-1) gB gC and gD alone or in combinations in BALB/c mice. **Veterinary Microbiology**, v. 61, p. 261-278, 1998.

PAGAMJAV, O.; SAKATA, T.; MATSUMURA, T.; YAMAGUCHI, T.; FUKUSHI, H. Natural recombinant between equine herpesviruses 1 and 4 in the ICP4 gene. **Microbiology and Immunology**, v. 49, n. 2, p. 167-179, 2005.

PAILLOT, R.; CASE, R.; ROSS, J.; NEWTON, R.; NUGENT, J. Equine Herpes Virus-1: Virus, Immunity and Vaccines. **The Open Veterinary Science Journal**, v. 2, n. 1, p. 68-91, 2008.

PAILLOT, R.; DALY, J. M.; LUCE, R.; MONTESSO, F.; DAVIS-POYNTER, N.; HANNANT, D.; KYDD, J. H. Frequency and phenotype of EHV-1 specific, IFN-gamma synthesising lymphocytes in ponies: the effects of age, pregnancy and infection. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 31, n. 2, p. 202-214, 2007.

PATEL, J. R.; EDINGTON, N. The pathogenicity in mice of respiratory, abortion and paresis isolates of equine herpesvirus-1. **Veterinary Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 301-305, 1983.

PATEL, J. R.; EDINGTON, N.; MUMFORD, J. A. Variation in cellular tropism between isolates of equine herpesvirus-1 in foals. **Archives of Virology**, v. 74, p. 41-51, 1982.

PATEL, J. R.; HELDENS, J. Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4)--epidemiology, disease and immunoprophylaxis: a brief review. **Veterinary Journal**, v. 170, n. 1, p. 14-23, 2005.

PERKINS, G. A.; GOODMAN, L. B.; DUBOVI, E. J.; KIM, S. G.; OSTERRIEDER, N. Detection of equine herpesvirus-1 in nasal swabs of horses by quantitative real-time PCR. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, p. 1234-1238, 2008.

PERKINS, G. A.; GOODMAN, L. B.; TSUJIMURA, K.; VAN DE WALLE, G. R.; KIM, S. G.; DUBOVI, E. J.; OSTERRIEDER, N. Investigation of the prevalence of neurologic equine herpes virus type 1 (EHV-1) in a 23-year retrospective analysis (1984-2007). **Veterinary Microbiology**, v. 139, p. 375-378, 2009.

PICHLMAIR, A.; REIS E SOUSA, C. Innate recognition of viruses. **Immunity**, v. 27, p. 370-383, 2007.

POLTORAK, A.; HE, X.; SMIRNOVA I.; LIU, M. Y.; VAN HUFFEL, C.; DU, X.; BIRDWELL, D.; ALEJOS, E.; SILVA, M.; GALANOS, C.; FREUDENBERG, M.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; LAYTON, B.; BEUTLER, B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. **Science**, v. 282, p. 2085–2088, 1998.

PUSTERLA, N.; DAVID WILSON, W.; MADIGAN, J. E.; FERRARO, G. L. Equine herpesvirus-1 myeloencephalopathy: A review of recent developments. **The Veterinary Journal**, v. 180, n. 3, p. 279–289, jun. 2009.

PUSTERLA, N.; HUSSEY, G. S. Equine herpesvirus 1 myeloencephalopathy. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 30, n. 3, p. 489-506, 2014.

PUSTERLA, N.; HUSSEY, S. B.; MAPES, S.; JOHNSON, C.; COLLIER, J. R.; HILL, J.; LUNN, D. P.; WILSON, W. D. Molecular investigation of the viral kinetics of equine herpesvirus-1 in blood and nasal secretions of horses after corticosteroid-induced recrudescence of latent infection. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, n. 5, p. 1153-1157, 2010.

PUSTERLA, N.; HUSSEY, S. B.; MAPES, S.; LEUTENEGGER, C. M.; MADIGAN, J. E.; FERRARO, G. L.; WILSON, W. D.; LUNN, D. P. Comparison of four methods to quantify Equid herpesvirus 1 load by real-time polymerase chain reaction in nasal secretions of experimentally and naturally infected horses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, p. 836–840, 2009a.

PUSTERLA, N.; MAPES, S.; WILSON, W. D. Use of viral loads in blood and nasopharyngeal secretions for the diagnosis of EHV-1 infection in field cases. **Veterinary Record**, v. 162, n. 22, p. 728-729, 2008.

PUSTERLA, N.; WILSON, W. D.; MAPES, S.; FINNO, C.; ISBELL, D.; ARTHUR, R. M.; FERRARO, G. L. Characterization of viral loads, strain and state of equine herpesvirus-1 using real-time PCR in horses following natural exposure at a racetrack in California. **Veterinary Journal**, v. 179, n. 2, p. 230-239, 2009b.

PUSTERLA, N.; WILSON, W. D.; CONRAD, P. A.; BARR, B. C.; FERRARO, G. L.; DAFT, B. M.; LEUTENEGGER, C. M. Cytokine gene signatures in neural tissue of horses with equine protozoal myeloencephalitis or equine herpes type 1 myeloencephalopathy. **Veterinary Record**, v. 159, p. 341-346, 2006.

RAPPOCCIOLO, G.; BIRCH, J.; ELLIS, S. A. Down-regulation of MHC class I expression by equine herpesvirus-1. **Journal of General Virology**, v. 84, n. 2, p. 293-300, 2003.

RASSA, J. C.; MEYERS, J. L.; ZHANG, Y.; KUDARAVALLI, R.; ROSS, S. R. Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. **Proceedings of**

the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 99, p. 2281–2286, 2002.

REBENKO-MOLLA, N.; LIUA, L.; CARDONAA, A.; RANSOHOLF, R. Chemokines, mononuclear cells, and the nervous system: heaven (or hell) is in the details. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, n. 6, p. 683-689, 2006.

REINER, U. R.; LUCCA NETO, D.; NILSSON, M. R.; NILSSON, T. T.; KOTAIT, I. Isolamento do vírus do aborto equino em Campinas, Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 13., 1972, Brasília, DF. **Anais**. 1972. p. 283-284.

RUITENBERG, K.; WALKER, C.; WELLINGTON, J.; LOVE, D. N.; WHALLEY, J. M. DNA-mediated immunization with glycoprotein D of equine herpesvirus 1 (EHV-1) in a murine model of EHV-1 respiratory infection. **Vaccine**, v. 17, p. 237-244, 1998.

SARKAR, S.; BALASURIYA, U. B. R.; HOROHOV, D. W.; CHAMBERS, T. M. Equine herpesvirus-1 infection disrupts interferon regulatory factor-3 (IRF-3) signaling pathways in equine endothelial cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 173, p.1–9, 2016a.

SARKAR, S.; BALASURIYA, U. B. R.; HOROHOV, D. W.; CHAMBERS, T. M. The neuropathogenic T953 strain of equine herpesvirus-1 inhibits type-I IFN mediated antiviral activity in equine endothelial cells. **Veterinary Microbiology**, v. 183, p. 110–118, 2016b.

SASAKI, M.; HASEBE, R.; MAKINO, Y.; SUZUKI, T.; FUKUSHI, H.; OKAMOTO, M.; MATSUDA, K.; TANIYAMA, H.; SAWA, H.; KIMURA, T. Equine major histocompatibility complex class I molecules act as entry receptors that bind to equine herpesvirus-1 glycoprotein D. **Genes to Cells**, v. 16, p. 343–357, 2011.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008.

SCHRODER, K.; HERTZOG, P. J.; RAVASI, T.; HUME, D. A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, n. 2, p. 163 -189, 2004.

SELLERS, R. S.; CLIFFORD, C. B.; TREUTING, P. M.; BRAYTON, C. Immunological variation between inbred laboratory mouse strains: points to consider in phenotyping genetically immunomodified mice. **Veterinary Pathology**, v. 49, n. 1, p. 32-43, 2012.

SHARMA, A.; MAHESHWARI, R. K. Oligonucleotide array analysis of Toll-like receptors and associated signalling genes in Venezuelan equine encephalitis virus-infected mouse brain. **The Journal of General Virology**, v. 90, pt. 8, p. 1836-1847, 2009.

SHELLAM, G.R.; FLEXMAN, J.P. Genetically determined resistance to murine cytomegalovirus and herpes simplex virus in newborn mice. **Journal of Virology**, v. 58, n. 1, p. 152-156, 1986.

SLATER, J. Equine herpesviruses. *In*: SELLON, D. C.; LONG, M. T. (Ed.). **Equine infectious diseases**. [s.l.: s.n.], 2007. p. 134–53.

SLATER, J. D.; GIBSON, J. S.; FIELD, H. J. Pathogenicity of a thymidine kinase-deficient mutant of equine herpesvirus 1 in mice and specific pathogen-free foals. **The Journal of General Virology**, v. 74, pt. 5, p. 819-828, 1993.

SMITH, K. C.; MUMFORD, J. A.; HANNANT, D.; WHITWELL, K. E. A comparison between the pathogenicity of EHV-1 isolates of high and low abortigenic potential in the natural host and in the mouse model. *In*: INTERNATIONAL CONFERENCE ON EQUINE INFECTIOUS DISEASES, 6., 1998, Dubai, United Arab Emirates, 1998a. p. 209.

SMITH, P. M.; ZHANG, Y. F.; O'CALLAGHAN, D. J. Characterization of the cytolytic T-lymphocyte response to a candidate vaccine strain of equine herpesvirus 1 in CBA mice. **Journal of Virology**, v. 72, p. 5366-5372, 1998b.

SMITH, K. C.; WHITWELL, K. E.; MUMFORD, J. A.; HANNANT, D.; BLUNDEN, A. S.; TEARLE, J. P. Virulence of the V592 isolate of equine herpesvirus-1 in ponies. **Journal of Comparative Pathology**, v. 122, n. 4, p. 288-297, 2000.

SMITH, P. M.; KAHAN, S. M.; ROREX, C. B.; VON EINEM, J.; OSTERRIEDER, N.; O'CALLAGHAN, D. J. Expression of the full-length form of gp2 of equine herpesvirus 1 (EHV-1) completely restores respiratory virulence to the attenuated EHV-1 strain KyA in CBA mice. **Journal of Virology**, v. 79, n. 8, p. 5105-5115, 2005.

SMITH, K. C.; WHITWELL, W. E.; BINNS, M. M.; DOLBY, C. A.; HANNANT, D.; MUMFORD, J. A. Abortion of virologically negative foetuses following experimental challenge of pregnant pony mares with Equine herpesvirus 1. **Equine Veterinary Journal**, v. 24, p. 256-259, 1992.

SMITH, P. M.; WOLCOTT, R. M.; CHERVENAK, R.; JENNINGS, S. R. Control of acute cutaneous herpes simplex virus infection: T cell-mediated viral clearance is dependent upon interferon- γ (INF- γ). **Virology**, v. 202, p. 76-88, 1994.

SOBOLL HUSSEY, G.; ASHTON, L. V.; QUINTANA, A. M.; LUNN, D. P.; GOEHRING, L. S.; ANNIS, K.; LANDOLT, G. Innate immune responses of airway epithelial cells to infection with equine herpesvirus-1. **Veterinary Microbiology**, v. 170, n. 1-2, p. 28-38, 2014.

SOBOLL, G.; HUSSEY, S. B.; WHALLEY, J. M.; ALLEN, G. P.; KOEN, M. T.; SANTUCCI, N.; FRASER, D. G.; MACKLIN, M. D.; SWAIN, W. F.; LUNN, D. P.; Antibody and cellular immune responses following DNA vaccination and EHV-1

infection of ponies. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 111, p. 81–95, 2006.

SPELLBERG, B.; EDWARDS, J. E. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 1, p. 76-102, 2001.

STAMATOVIC, S. M.; SHAKUI, P.; KEEP, R. F.; MOORE, B. B.; KUNKEL, S. L.; VAN ROOIJEN, N.; ANDJELKOVIC, A. V. Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 25, n. 5, p. 593-606, 2005.

STOKES, A.; ALLEN, G. P.; PULLEN, L. A.; MURRAY, P. K. A hamster model of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) infection; passive protection by monoclonal antibodies to EHV-1 glycoproteins 13, 14 and 17/18. **Journal of General Virology**, v. 70, 1173-1183, 1989.

STOKES, A.; ALBER, D. G.; CAMERON, R. S.; MARSHALL, R. N.; ALLEN, G. P.; KILLINGLON, R. A. The production of a truncated form of baculovirus expressed EHV-1 glycoprotein C and its role in protection of C3N (H-2Kk) mice against virus challenge. **Virus Research**, v. 44, p. 97-109, 1996.

STOKES, A.; CAMERON, R. S.; MARSHALL, R. N.; KILLINGTON, R. A. High level expression of equine herpesvirus 1 glycoproteins D and H and their role in protection against virus challenge in the C3N (H-2Kk) murine model. **Virus Research**, v. 50, p. 159-173, 1997.

STOKES, A.; WARDLEY, R. C. ADCC and complement-dependent lysis as immune mechanisms against EHV-1 infection in the horse. **Research in Veterinary Science**, v. 44, p. 295–302, 1988.

TEARLE, J. P.; SMITH, K. C.; BOYLE, M. S.; BINNS, M. M.; LIVESAY, G. J.; MUMFORD, J. A. Replication of equid herpesvirus-1 (EHV-1) in the testes and epididymides of ponies and venereal shedding of infectious virus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 115, p. 385–397, 1996.

TEARLE, J. P.; SMITH, K. C.; PLATT, A. J.; HANNANT, D.; DAVIS-POYNTER, N. J.; MUMFORD, J. A. In vitro characterisation of high and low virulence isolates of equine herpesvirus-1 and -4. **Research in Veterinary Science**, v. 75, p. 83–86, 2003.

TELFORD, E. A.; WATSON, M. S.; MCBRIDE, K.; DAVISON, A. J. The DNA sequence of equine herpesvirus-1. **Virology**, v. 189, n. 1, p. 304-316, 1992.

TEWARI, D.; WHALLEY, I. M.; LOVE, D. N.; FIELD, N. J. Characterization of immune responses to baculovirus-expressed equine herpesvirus type 1 glycoproteins D and H in a murine model. **Journal of General Virology**, v. 75, p. 1735-1741, 1994.

THORMANN, N.; VAN DE WALLE, G. R.; AZAB, W.; OSTERRIEDER, N. The role of secreted glycoprotein G of equine herpesvirus type 1 and type 4 (EHV-1 and EHV-4) in immune modulation and virulence. **Virus Research**, v. 169, p. 203–211, 2012.

TRAUB-DARGATZ, J. L.; PELZEL-MCCLUSKEY, A. M.; CREEKMORE, L. H.; GEISER-NOVOTNY, S.; KASARI, T. R.; WIEDENHEFT, A. M.; BUSH, E. J.; BJORK, K. E. Case-control study of a multistate equine herpesvirus myeloencephalopathy outbreak. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, n. 2, p. 339–346, 2013.

TRANTAFILOU, K.; TRIANTAFILOU, M. Cocksackievirus B4–induced cytokine production in pancreatic cells is mediated through toll-like receptor 4. **Journal of Virology**, v. 78, p. 11313–11320, 2004.

VAN DE WALLE, G. R.; JAROSINSKI, K. W.; OSTERRIEDER, N. Alphaherpesviruses and chemokines: pas de deux not yet brought to perfection. **Journal of Virology**, v. 82, n. 13, p. 6090–6097, 2008b.

VAN DE WALLE, G. R.; MAY, M. A.; PETERS, S. T.; METZGER, S. M.; ROSAS, C. T.; OSTERRIEDER, N. A vectored equine herpesvirus type 1 (EHV-1) vaccine elicits protective immune responses against EHV-1 and H3N8 equine influenza virus. **Vaccine**, v. 28, p. 1048–1055, 2010.

VAN DE WALLE, G. R.; SAKAMOTO, K.; OSTERRIEDER, N. CCL3 and viral chemokine-binding protein gg modulate pulmonary inflammation and virus replication during equine herpesvirus 1 infection. **Journal of Virology**, v. 82, n. 4, p. 1714–1722, 2008a.

VAN DER MEULEN, K. M.; FAVOREEL, H. W.; PENZAERT, M. B.; NAUWYNCK, H. J. Immune escape of equine herpesvirus 1 and other herpesviruses of veterinary importance. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 111, p. 31–40, 2006.

VAN DER POLL, T.; COYLE, S. M.; LEVI, M.; JANSEN P. M.; DENTENER, M.; BARBOSA, K.; BUURMAN, W. A.; HACK, C. E.; TEN CATE, J. W.; AGOSTI, J. M.; LOWRY, S. F. Effect of a recombinant dimeric tumor necrosis factor receptor on inflammatory responses to intravenous endotoxin in normal humans. **Blood**, v. 89, n. 10, p. 3727 - 3724, 1997.

VANDEKERCKHOVE, A. P.; GLORIEUX, S.; GRYSPEERDT, A C; STEUKERS, L.; DUCHATEAU, L.; OSTERRIEDER, N.; VAN DE WALLE, G. R.; NAUWYNCK, H. J. Replication kinetics of neurovirulent versus non-neurovirulent equine herpesvirus type 1 strains in equine nasal mucosal explants. **The Journal of General Virology**, v. 91, pt. 8, p. 2019–2028, 2010.

VAN MAANEN, C.; VREESWIJK, J.; MOONEN, P.; BRINKHOF, J.; DE BOER-LUIJTZE, E.; TERPSTRA, C. Differentiation and genomic and antigenic variation

among fetal, respiratory, and neurological isolates from EHV1 and EHV4 infections in The Netherlands. **Veterinary Quarterly**, v. 22, p. 88–93, 2000.

VAN WOENSEL, P. A.; GOOVAERTS, D.; MARKX, D.; VISSER, N. A mouse model for testing the pathogenicity of equine herpes virus-1 strains. **Journal of Virological Methods**, v. 54, n. 1, p. 39-49, 1995.

VISSANI, M. A.; THIRY, E.; DAL POZZO, F.; BARRANDEGUY, M. Antiviral agents against equid alphaherpesviruses: Current status and perspectives. **The Veterinary Journal**, v. 207, p. 38-44, 2016.

WALKER, C.; PACKIARAJAH, P.; GILKERSON, J. R.; LOVE, D. N.; WHALLEY, J. M. Primary and secondary infection of mice with equine herpesvirus 1, strain HVS25A. **Virus Research**, v. 57, p. 151-162, 1998a.

WALKER, C.; PEROTTI, V. M.; LOVE, D. N.; WHALLEY, I. M. Infection with equine herpesvirus 1 (EHV-1) strain HVS25A in pregnant mice. **Journal of Comparative Pathology**, v. 120, p. 15-27, 1998b.

WATZINGER, F.; EBNER, K.; LION, T. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2-3, p. 254-298, 2006.

WEINBERG, J. B.; LUTZKE, M. L.; ALFINITO, R.; ROCHFORD, R. Mouse strain differences in the chemokine response to acute lung infection with a murine gammaherpesvirus. **Viral Immunology**, v. 17, n.1, p. 69-77, 2004.

WEST, T.; CARR, D. J. The role of chemokines during herpes simplex virus-1 infection. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, p. 4862-4872, 2008.

WHITWELL, K. E.; BLUNDEN, A. S. Pathological findings in horses dying during an outbreak of the paralytic form of Equid herpesvirus type 1 (EHV-1) infection. **Equine Veterinary Journal**, v. 24, p. 13-19, 1992.

WILKS, C. R.; COGGINS, L. Protective, immunity in equine herpesvirus type-1 infection of hamsters. **The Cornell Veterinarian**, v. 67, p. 385-403, 1977.

WILSON, W. D. Equine herpesvirus 1 myeloencephalopathy. **Veterinary Clinics of North America: equine practice**, v. 13, n. 1, p. 53-72, 1997.

WIMER, C. L.; DAMIANI, A.; OSTERRIEDER, N.; WAGNER, B. Equine herpesvirus type-1 modulates CCL2, CCL3, CCL5, CXCL9, and CXCL10 chemokine expression. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 140, n. 3-4, p. 266-274, 2011.

WOOLUMS, A. R.; SIGER, L.; JOHNSON, S.; GALLO, G.; CONLON, J. Rapid onset of protection following vaccination of calves with multivalent vaccines containing modified-live or modified-live and killed BHV-1 is associated with virus-specific interferon gamma production. **Vaccine**, v. 21, p. 1158-1164, 2003.

YU, M. H. H.; KASEM, S. G. A.; TSUJIMURA, K.; MATSUMURA, T.; YANAI, T.; YAMAGUCHI, T.; OHYA, K.; FUKUSHI, H. Diverse pathogenicity of equine herpesvirus 1 (EHV-1) isolates in CBA mouse model. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 72, n. 3, p. 301-306, 2010.

ANEXO A

Hindawi Publishing Corporation
BioMed Research International
Volume 2016, Article ID 8560691, 9 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2016/8560691>

Research Article

Feline Coronavirus 3c Protein: A Candidate for a Virulence Marker?

A. S. Hora,^{1,2} P. O. Tonietti,² S. A. Taniwaki,² K. M. Asano,^{1,2} P. Malorka,³
L. J. Richtzenhain,^{1,2} and P. E. Brandão^{1,2}

¹Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health, School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, Avenida Professor Dr. Orlando Marques de Paiva 87, Cidade Universitária, 05508-270 São Paulo, SP, Brazil

²Coronavirus Research Group, School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, Avenida Professor Dr. Orlando Marques de Paiva 87, Cidade Universitária, 05508-270 São Paulo, SP, Brazil

³Department of Pathology, School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, Avenida Professor Dr. Orlando Marques de Paiva 87, Cidade Universitária, 05508-270 São Paulo, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to A. S. Hora; alineshora@gmail.com

Received 11 February 2016; Revised 1 April 2016; Accepted 10 April 2016

Academic Editor: Nikolai V. Ravin

Copyright © 2016 A. S. Hora et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Feline infectious peritonitis virus (FIPV) is highly virulent and responsible for the highly fatal disease feline infectious peritonitis (FIP), whereas feline enteric coronavirus (FECV) is widespread among the feline population and typically causes asymptomatic infections. Some candidates for genetic markers capable of differentiating these two pathotypes of a unique virus (feline coronavirus) have been proposed by several studies. In the present survey, in order to search for markers that can differentiate FECV and FIPV, several clones of the 3a-c, E, and M genes were sequenced from samples obtained from cats with or without FIP. All genes showed genetic diversity and suggested the presence of FCoV mutant spectrum capable of producing a virulent pathotype in an individual-specific way. In addition, all the feline coronavirus FIPV strains demonstrated a truncated 3c protein, and the 3c gene was the only observed pathotypic marker for FCoVs, showing that 3c gene is a candidate marker for the distinction between the two pathotypes when the mutant spectrum is taken into account.

1. Introduction

Feline coronavirus (FCoV) (*Nidovirales*; *Coronaviridae*; *Coronavirinae*; *Alphacoronavirus 1*) is a widespread pathogen among the domestic cat population. FCoV occurs as two pathotypes, feline enteric coronavirus (FECV) and feline infectious peritonitis virus (FIPV), both of which with strains of serotypes I and II [1].

Phenotypically, the main difference between the pathotypes is that FIPV is able to infect monocytes and macrophages, causing systemic infection and fatal disease, while FECV is limited to replication in the mature intestinal epithelium, which mainly results in asymptomatic infection. However, FECV may undergo a short systemic viremia phase that also involves monocytes [2, 3].

The FCoV genome (single-stranded positive-sense linear RNA, 29 kb) encodes proteins directly involved in viral

replication (ORF1), the structural spike protein (S), envelope protein (E), membrane protein (M), and nucleocapsid protein (N), as well as the accessory proteins 3a-c and 7a-b [4].

There is a major controversy regarding the existence of genetic markers to differentiate between FECV and FIPV pathotypes [5, 6]. Numerous markers that correlate with the manifestation of FIP have been proposed for S [7–12], 3a-c [8, 13–16], 7a-b [16–18], and M [5] genes.

The most studied gene is 3c [7, 9, 13–15, 19, 20], which is present in the truncated form in the majority of all strains obtained from animals with FIP. However, previous studies on 3c genes focused only on the dominant sequence and not on the mutant spectrum or the clonal diversity and the information obtained from a dominant sequence may not be suitable to detect mutations [10], with the exception of a study [7] in which clones were used to assess the presence of alterations in the gene 3c in ascites and/or faeces from FIP and

healthy cats, and again 3c truncated protein was not observed in 100% of FIPV samples.

Considering (i) the current discussion on molecular markers capable of distinguishing the pathotypes of FCoV and (ii) the lack of knowledge of the diversity of such markers in the mutant spectrum of RNA, the present study was designed to investigate the clonal diversity of the 3a-c, E, and M genes in FCoV strains present in tissue and/or faecal samples from cats with and without FIP.

2. Materials and Methods

2.1. Animals and Samples. From 2010 to 2013, tissue (eye, cerebrum, cerebellum, lung, heart muscle, thoracic lymph node, thymus, liver, spleen, stomach, mesenteric lymph node, peripancreatic lymph node, kidneys, large and small intestines, and urinary bladder), abdominal, thoracic, and pericardial effusions, aqueous humor, and faecal samples were collected during the necropsies of 6 cats with clinical manifestations and histopathological changes consistent with FIP, such as localized inflammation with macrophages, neutrophils, lymphocytes, and plasma cells. Vascular lesions were found surrounded by a proliferation of inflammatory cells in heart, lung, omentum, kidneys, cerebrum, and cerebellum. Focal accumulations of inflammatory cells and necrotic-proliferative lesions were observed in granulomatous lesions. Intestinal samples were collected including mucosa, submucosa, muscular layer, and serosa. Only 2 animals (USP6, and USP7) showed signs of dry-form FIP (neurological changes), while the remaining 4 (USP8, USP16, USP17, and USP18) showed an accumulation of effusion in body cavities (effusive FIP).

All FIP-positive cats were sampled from different geographic locations, with the exception of 2 cats (USP17 and USP18) that lived in the same house. USP17 was euthanized 1 month prior to USP18 due to FIP related reasons.

In parallel, faecal samples were also obtained from 2 cats (USP2, and USP14) without clinical signs of FIP and from two different locations not related to the locations from the FIP+ cats.

This study has been approved by Commission on Ethics on Animal Use from School of Veterinary Medicine, University of São Paulo (CEUA N. 205521113).

2.2. Messenger RNA Detection for the M Gene of FCoVs. All tissues were complete homogenized after tissue maceration and before RNA extraction. Total RNA extraction and RT-PCR to detect mRNA of the M gene of FCoVs were performed in all samples as previously described [21] as a screening test for FCoV replication.

2.3. Amplification of the 3a-c, E, and M Genes of FCoVs. All samples from 6FIP+ and 2FIP- cats were submitted to amplification of the 3a-c, E, and M genes of FCoVs, even if the mRNA detection was negative. To amplify all these five genes of FCoVs in only one amplicon, a single pair of previously described primers [14] was used (nucleotides

TABLE 1: Primers used to obtain full coverage of genes 3a-c, E, and M.

Primers	Sequence (5'-3')	Position ^a
2B	YATYACWGTCTAYRABTT	487-505
3B	ACRACWYTNAKKTTTGTA	1058-1075
4B	AATAGCATTGCTAAATRT	1479-1496
5B	CGGCTTTAGTTRTYGCAGG	1999-2008

^aPosition defined according to genome FCoV-WSU 79-1146 (DQ010921).

24,380 to 26,996 corresponding to the FCoV-WSU 79-1146; genome GenBank DQ010921).

cDNA synthesis was performed with 6 µL total RNA extracted with TRIzol[®] Reagent (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) and ThermoScript[™] (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) using Random Primers[™] (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

For PCR, 5 µL of cDNA was added to 1x PCR buffer (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), 2 mM MgSO₄, 0.2 mM of each dNTP, 0.25 µM of each primer, 1.5 U Platinum[™] Taq DNA Polymerase High Fidelity (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), and DEPC water for a final reaction volume of 50 µL. The cycling conditions were as follows: 94°C/2 min; 10 cycles of 94°C/15 s, 50°C/15 s with an increase of 0.5°C per cycle, and 68°C/4 min; 10 cycles of 94°C/15 s, 55°C/15 s, and 68°C/4 min; 25 additional cycles of 94°C/15 s, 55°C/15 s, and 68°C/4 min with an increase of 10 s per cycle; and a final extension of 72°C/10 min.

Specific bands were excised from the gels and purified using the Gene Jet[™] Gel Extraction kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Vilnius, Lithuania) according to the manufacturer's instructions.

2.4. Molecular Cloning. The purified amplicons (2,617 bp containing 3abc-E-M) were cloned using pGEM[™]-T Easy Vector Systems (Promega Madison, WI, USA) and *E. coli* JM109 competent cells according to the manufacturer's recommendations. After the transformation protocol, transformation culture was plated onto duplicate LB/ampicillin/IPTG/X-Gal plates and the plates were incubated overnight (16 hours) at 37°C. Then, the transformed colonies were transferred to LB liquid medium and were incubated overnight (16 hours) at 37°C and 180 rpm. Recombinant plasmid extraction was performed with the Illustra[™] plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) as per manufacturer's recommendations.

For an easier identification of the clones, the following nomenclature was used: cat identification/sample source/presence (+) or absence (-) of FIP/cat origin/clone number.

2.5. DNA Sequencing. Sense primers were designed at approximately every 500 nucleotides to obtain full coverage of genes 3a-c, E, and M (Table 1). Primers for the plasmid (pUC/M13F and R) were also used to reach the full length of the amplicon sequence.

TABLE 2: Identification, sorting according to the presence of FIP detection of mRNA FCoV_s, and the number of clones obtained from cats.

ID	Location	FIP	Sample	mRNA	Number of clones obtained from each gene					Total
					E 249nt	M 792nt	3a 213nt	3b 222nt	3c 714nt	
USP2	1	Absent	Faeces	Pos	4	6	6	6	4	26
USP6	7	Non-effusive	Stomach	Pos	10	11	10	9	6	46
			Faeces	Neg	0	3	8	7	5	23
USP7	3	Non-effusive	Cerebrum	Neg	5	5	5	5	2	22
			Faeces	Pos	3	7	10	10	5	35
USP8	6	Effusive	Stomach	Pos	1	1	1	1	1	5
			Urinary bladder	Pos	0	0	3	3	2	8
USP17	2	Effusive	Cerebrum	Neg	3	5	8	8	8	32
			Large intestine	Pos	3	1	4	4	2	14
USP14	4	Absent	Faeces	Pos	1	1	12	12	9	35
USP16	5	Effusive	Cerebrum	Pos	6	0	9	9	9	33
USP18	2	Effusive	Cerebrum	Pos	2	3	3	3	2	13
Total of clones (n = 292)					38	43	79	77	55	292

ID: identification; Pos: positive; Neg: negative.

DNA sequencing with each primer in duplicate was performed using the BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) with a Genetic Analyzer 3500[®] capillary sequencer (Applied Biosystems Foster City, CA, USA), according to the manufacturers' instructions.

2.6. Sequence Editing. Chromatograms were generated in duplicate for each segment and evaluated for their base quality using the online application Phred (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phred/>). Only those chromatograms with scores greater than 20 (probability lower than 1 error per 100 nucleotides) were used. The chromatograms were analyzed and manually edited with the software FinchTV version 1.4 (<http://www.geospiza.com/Products/finchtlv.shtml>). The final sequences of each sample were obtained using the CAP contig application with the software BioEdit version 7.0.9.0 [22].

2.7. Phylogenetic Analyses. The nucleotides and amino acids corresponding to the 3a-c, E, and M genes were aligned using the application Clustal/W in BioEdit 7.0.9.0 [22]. Clones were classified in serotypes based on comparative analysis of the amino acid sequences encoded by the 3a gene with the sequences available in GenBank (serotype I: DQ160294 and DQ848678 and serotype II: DQ010921). Nucleotide phylogenetic trees (neighbor-joining, MCL model, 1,000 bootstrap replicates) were constructed using the computer software Mega version 5.05 [23].

3. Results

3.1. Messenger RNA Detection for the M Gene and Amplification, Sequencing, and Cloning of the 3a-c, E, and M Genes of FCoV_s. mRNA was not obtained from all samples;

nevertheless sequences for the 3a-c, E, and M amplicons were obtained from a total of 292 clones originating from 8 animals [6FIP+ (USP6, USP7, USP8, USP17, USP16, and USP18) and 2FIP- (USP2 and USP14)]. Sequences from extraintestinal tissue samples and faecal/intestines samples were obtained simultaneously for 3 animals (USP6, USP7, and USP17) with FIP (Table 2). Due to poor sequence quality for some clones and/or regions in a clone, not all full length amplicons could be sequenced or used in the analyses. The sequences obtained in the present study were deposited in GenBank under access numbers KJ879334 to KJ879438.

3.2. Phylogenetic Analysis of the 3a-c, E, and M Genes of FCoV_s. All sequences of the 3a genes obtained from a total of 79 clones belong to serotype I. Phylogenetic trees generated for the 3a, 3c, E, and M genes showed similar topologies and thus only the 3c and 3b trees are shown (Figures 1 and 2, resp.). Sample from cat USP14 (non-FIP) showed a remarkable clonal diversity as their clones are present in five different clusters of the 3b tree. High clonal diversity was observed in samples from FIP+ (USP8, USP16, USP17, and USP18) and FIP- cat (USP14); however FIP+ cats USP6 and USP7 and USP2 FIP- cat showed a lower clonal diversity. In the 3c gene tree, for cats USP6 and USP7, differences can be noticed between the FCoV strains obtained from tissue and faecal clones; that is, for each animal, there was a distinction between systemic (FIPV) and enteric (FECV) strains. However, no generic grouping per pathotype (FECV or FIPV) was observed for all samples and trees generated from this study.

Conversely, in the 3b gene tree samples obtained from cat USP7 (FIP+) could not be separated into systemic (cerebrum) and enteric (faeces) strains.

The overall nucleotide identity of all clones (FIP+ and FIP-) obtained from the 5 genes was $\geq 92.09\%$ for faecal

FIGURE 1: Phylogenetic tree constructed using the neighbor-joining method and the maximum composite likelihood substitution model for the FCoV 3c gene. The numbers next to each node represent the values of 1,000 bootstrap repetitions, and only those above 50% are shown. The scale represents the number of substitutions per site. For easy identification of the samples, the following nomenclature was used: cat identification/sample source/presence (+) or absence (-) of FIP/cat origin/clone number.

FIGURE 2: Phylogenetic tree constructed using the neighbor-joining method and the maximum composite likelihood substitution model for the FCoV 3b gene. The numbers next to each node represent the values of 1,000 bootstrap repetitions, and only those above 50% are shown. The scale represents the number of substitutions per site. For easy identification of the samples, the following nomenclature was used: cat identification/sample source/presence (+) or absence (-) of FIP/cat origin/clone number.

samples and $\geq 90.09\%$ for tissue samples (Table 3). The greatest nucleotide diversity when all available sequences for each gene were compared together was observed for the 3b gene, for which a 90.09% identity was found, with the exception of comparisons between cats living in the same house, for which the identity between the 3b gene sequences was 97.09%.

For tissue and faecal samples, 3a was the most conserved gene (nucleotide identities of 99.38% and 97.70%, resp.) considering each individual cat. The mean identity between clones from the two cohabitating FIP+ cats (USP17 and USP18) ranged from 96.17% (3c gene) to 99.83% (E gene).

Premature stop codons were observed in the 3a (USP18, 3/3 cerebrum clones), 3b (USP17, 1/8 cerebrum; USP7, 1/10 faeces), 3c (USP17, 8/8 cerebrum and 2/2 large intestine; USP18, 2/2 cerebrum; USP7, 2/2 cerebrum; USP16, 1/9 cerebrum; USP8, 1/1 stomach; USP6, 6/6 stomach), and M (USP7, 1/5 cerebrum) genes from FIP+ cats. No premature stop codon in the 3a-c or E genes was observed in faecal samples from cats without FIP, with exception of M gene (USP2, 1/6 faeces).

Stop codons in 3c were evident in at least one of the clones from tissue samples from cats with FIP. The faecal samples from cats with or without FIP did not demonstrate this truncated gene in any of the clones, and no other molecular marker capable of differentiating the biotypes (FECV and FIPV) was observed in the sequenced genes.

4. Discussion and Conclusions

The existence of genetic markers to differentiate these two biotypes is currently a topic of the highest interest on the FIP field not only from the clinical and epidemiological points of view but also as a basis for an in-deep comprehension of the pathogenesis of this highly complex disease. Considering that, in the present study, clones of structural (E and M) and accessory (3a-c) genes were obtained from cats with and without FIP, and the results demonstrate a highly likely candidate FCoV pathotypic marker in the 3c gene.

Amplicons obtained from the cerebrum and large intestine of the cat USP17 (FIP+) were also cloned and sequenced. When assessing the 46 clones (32 clones from cerebrum and 14 from large intestine) obtained from this cat, the nucleotide identity among the five genes was greater than 99%, and according to the phylogenetic trees generated, clones from this cat resulted in a single cluster. In the 3c gene, a single nucleotide transversion (G $\rightarrow$ T) was observed at position 10 in all clones from samples from this cat, resulting in premature stop codons and truncated proteins. The observation of truncated proteins in large intestine observed herein is in contrast to what has been observed for FECV in other studies [13, 14, 20].

Possibly because it serves as a preferential organ for viral replication and therefore for pathological changes in FIP cases, the intestine of the cat USP17 (FIP+) was also affected by the systemic strain. Chang et al. [20] suggested that viruses with an inactivated 3c gene rarely replicate in the intestine, which helps to explain the rare incidence of FIP outbreaks due to a less frequent faecal-oral transmission. A premature stop codon in the 3c gene was previously reported in a strain

of FCoV from the jejunum of a cat with FIP, and the same intestinal strain showed 100% identity with a strain obtained from a liver sample of the same cat [6].

In recent studies [13, 15], 3c genes with premature termination were detected in faecal and extraintestinal samples from cats with FIP, although it was not determined whether the viruses were replicating. Also, after an experimental inoculation of cats with truncated and complete 3abc, the role of the truncation in this region on FIP pathogenesis could not be clearly determined, despite it led to lower viral replication in the gut [24]. However, in the present study, the sample from the large intestine of the cat USP17 (FIP+), from which the studied clones originated and which demonstrated a truncated 3c gene, was positive for FCoV mRNA. This result indicated the presence of viral replication in that sample.

When comparing the sequences obtained from the extraintestinal organs and faeces of the FIP+ cats USP7 and USP6, the presence of a premature stop codon in the 3c gene was not observed in faecal clones from both cats, in contrast to what was observed for tissue clones. Moreover, the nucleotide identity of the 3c gene for tissue and faecal samples was 99.09% and 95.58% for the cats USP7 and USP6, respectively. In a study comparing FCoV from extraintestinal FIP lesions and the faeces of the same cat, the identity between the sequences of the structural and accessory genes evaluated (S, M, N, E, 3a-c and 7a-b) was always higher than 99%, corroborating the hypothesis of *in vivo* mutation [14].

As FIPV lineages may be derived from FECV mutations, it was expected that nucleotide diversity between faecal and tissue samples from the cat USP6 (FIP+) would be lower. However, the difference was 8.84% for the 3b genes, consisting exclusively in point mutations, indicating that this cat could be coinfecting with an FCoV strain that is distinct from the systemic strain. Furthermore, the high nucleotide identity between samples from the cerebrum and faeces of the cat USP7 (FIP+), along with the topology of the generated trees, showed that the intestinal viral replication of the enteric pathotype may be maintained even during FIP in some cases, as demonstrated by the presence of mRNA.

As previously described and according with results from the present study, FIPV can both emerge endogenously and be transmitted to different cats as a "ready" virulent pathotype, which has major implications for the understanding of the dynamics of viral transmission [5, 15, 21].

Among the structural proteins genes (E and M) studied herein, premature stop codons were detected only in the M gene. The M protein of FCoVs is the most abundant structural protein [25]. The presence of a premature stop codon in a constitutive gene such as the M gene is incompatible with the functionality of the virion. However, this defective virus is no less important than the others, as it provides genetic background for recombination with other FCoVs, resulting in greater genetic diversity and possibly increased virulence of some viral quasispecies. Recent studies suggest that the 3c gene, which encodes a small protein (238aa) of unknown function, is associated with most FIPV isolates when present in truncated form, although not all FCoV strains in FIP+ samples present this 3c form [13, 14, 20]. In the present study, the 3c truncated protein was observed in all clones obtained

TABLE 3: Mean, maximum, and minimum nucleotide identities of 3a-c, E, and M FCoV genes from different clones.

Identification	3a gene			3b gene			3c gene			E gene			M gene		
	Mean (%)	Max (%)	Min (%)	Mean (%)	Max (%)	Min (%)	Mean (%)	Max (%)	Min (%)	Mean (%)	Max (%)	Min (%)	Mean (%)	Max (%)	Min (%)
USP2/Faeces/PIF-/local1	99.83	100.00	99.50	100.00	100.00	100.00	99.45	99.50	99.40	99.75	100.00	99.50	99.52	99.80	99.30
USP6/Stomach/PIF+/local7	99.67	100.00	99.50	100.00	100.00	100.00	99.92	100.00	99.80	99.90	100.00	99.50	99.77	99.80	99.70
USP6/Faeces/PIF+/local7	100.00	100.00	100.00	99.03	99.50	98.60	99.20	99.20	99.20	*	*	*	99.77	99.80	99.70
USP7/Cerebrum/PIF+/local3	99.02	100.00	98.10	96.39	100.00	88.10	95.79	100.00	95.70	99.53	100.00	99.10	99.48	100.00	99.40
USP7/Faeces/PIF+/local3	99.42	100.00	97.10	92.16	100.00	83.30	97.29	100.00	95.50	100.00	100.00	100.00	99.54	100.00	99.10
USP8/UB/PIF+/local6	98.70	99.50	98.10	99.89	100.00	99.50	99.73	100.00	99.20	*	*	*	*	*	*
USP4/Faeces/PIF-/local4	95.86	100.00	91.50	98.96	100.00	97.70	99.48	100.00	98.80	*	*	*	*	*	*
USP6/Cerebrum/PIF+/local5	99.42	100.00	99.00	99.33	99.50	99.00	100.00	100.00	100.00	99.83	100.00	99.50	99.70	100.00	99.40
USP7/Cerebrum/PIF+/local2	99.25	100.00	98.50	97.92	100.00	94.50	99.33	100.00	98.50	99.67	100.00	99.50	99.18	99.60	98.70
USP7/LI/PIF+/local2	99.50	100.00	99.00	99.03	99.50	98.60	99.50	99.50	99.50	99.67	100.00	99.50	*	*	*
USP8/Cerebrum/PIF+/local2	98.70	99.50	98.10	98.68	100.00	98.10	99.80	99.80	99.80	100.00	100.00	100.00	99.53	99.60	99.40
Intestinal samples	97.70	100.00	91.50	92.09	100.00	81.50	95.64	100.00	93.20	93.87	100.00	91.10	99.59	100.00	99.10
Extraintestinal samples	99.38	100.00	98.10	90.09	100.00	75.60	95.37	100.00	92.70	95.19	100.00	89.90	99.53	100.00	98.70

Max: maximum; Min: minimum; LI: large intestine; UB: urinary bladder.

* Samples that only one clone was obtained or no clone was obtained at all.

from tissue samples from FIP+ cats, with the exception of those obtained from the cat USP16, where only 11% (1/9) of the clones demonstrated the truncated protein.

It is essential to note that if the predominant viral population in the present study had been assessed by direct amplicon sequencing only, as in studies conducted by other authors [13–15, 19, 20], without using the previous cloning step, the truncated 3c gene could have been undetected as it was only present in a minority of the sequences observed in the cerebrum of the cat USP16 (FIP+).

The transversions observed at position 10 of the 3c gene, which resulted in premature stop codons, were the same as those observed in the clone sequences obtained from the cerebrum and stomach of the FIP+ cats USP17 and USP6, respectively. With the exception of this finding and in agreement with the results of Pedersen et al. [14, 15], the 3c gene mutations were unique to each cat, including the sequences obtained from the cohabitating FIP+ cats (USP17 and USP18).

It can be concluded that the presence of a truncated 3c protein is a suggestive factor for differentiation between the FECV and FIPV pathotypes and therefore serves as a genetic marker of virulence. It still remains to be answered whether 3c is expendable for FCoV replication in phagocytic cells and a nontruncated 3c is thus selected against during the FECV/FIPV transition. Moreover, the 3a-c, E, and M genes showed a level of genetic diversity indicative of the constitution of FCoV quasispecies or mutant spectrum and the likelihood of emergence of a highly virulent, individual-specific biotype.

Competing Interests

None of the authors has any financial or personal relationships that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgments

Funding for this study was provided by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil (Grants nos. 09/17535-9 and 10/07492-8), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Grant no. 300513/2010-0), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROEX 2327/2015). The authors are also grateful to the veterinarians and cat owners who provided FIP cases and cat faecal samples for this study.

References

- [1] N. C. Pedersen, "A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963–2008," *Journal of Feline Medicine and Surgery*, vol. 11, no. 4, pp. 225–258, 2009.
- [2] A. Kipar, M. L. Meli, K. E. Baptiste, L. J. Bowker, and H. Lutz, "Sites of feline coronavirus persistence in healthy cats," *Journal of General Virology*, vol. 91, no. 7, pp. 1698–1707, 2010.
- [3] L. Vogel, M. van der Lubben, E. G. te Lintelo et al., "Pathogenic characteristics of persistent feline enteric coronavirus infection in cats," *Veterinary Research*, vol. 41, no. 5, article 71, 2010.
- [4] P. S. Masters, "The molecular biology of coronaviruses," *Advances in Virus Research*, vol. 65, pp. 193–292, 2006.
- [5] M. A. Brown, J. L. Troyer, J. Pecon-Slattery, M. E. Roelke, and S. J. O'Brien, "Genetics and pathogenesis of feline infectious peritonitis virus," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 15, no. 9, pp. 1445–1452, 2009.
- [6] C. Dye and S. G. Siddell, "Genomic RNA sequence of feline coronavirus strain FCoV Clje," *Journal of Feline Medicine and Surgery*, vol. 9, no. 3, pp. 202–213, 2007.
- [7] B. R. Bank-Wolf, I. Stallkamp, S. Wiese, A. Moritz, G. Tekes, and H.-J. Thiel, "Mutations of 3c and spike protein genes correlate with the occurrence of feline infectious peritonitis," *Veterinary Microbiology*, vol. 173, no. 3–4, pp. 177–188, 2014.
- [8] H.-W. Chang, H. F. Egberink, R. Halpin, D. J. Spiro, and P. J. M. Rottier, "Spike protein fusion peptide and feline coronavirus virulence," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 18, no. 7, pp. 1089–1095, 2012.
- [9] C. S. Lewis, E. Porter, D. Matthews et al., "Genotyping coronaviruses associated with feline infectious peritonitis," *Journal of General Virology*, vol. 96, pp. 1358–1368, 2015.
- [10] B. N. Licitra, J. K. Millet, A. D. Regan et al., "Mutation in spike protein cleavage site and pathogenesis of feline coronavirus," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 19, no. 7, pp. 1066–1073, 2013.
- [11] A. D. Regan, R. Shraybman, R. D. Cohen, and G. R. Whittaker, "Differential role for low pH and cathepsin-mediated cleavage of the viral spike protein during entry of serotype II feline coronaviruses," *Veterinary Microbiology*, vol. 132, no. 3–4, pp. 235–248, 2008.
- [12] P. J. M. Rottier, K. Nakamura, P. Schellen, H. Volders, and B. J. Haijema, "Acquisition of macrophage tropism during the pathogenesis of feline infectious peritonitis is determined by mutations in the feline coronavirus spike protein," *Journal of Virology*, vol. 79, no. 22, pp. 14122–14130, 2005.
- [13] L.-E. Hsieh, W.-P. Huang, D.-J. Tang, Y.-T. Wang, C.-T. Chen, and L.-L. Chueh, "3C protein of feline coronavirus inhibits viral replication independently of the autophagy pathway," *Research in Veterinary Science*, vol. 95, no. 3, pp. 1241–1247, 2013.
- [14] N. C. Pedersen, H. Liu, K. A. Dodd, and P. A. Pesavento, "Significance of coronavirus mutants in feces and diseased tissues of cats suffering from feline infectious peritonitis," *Viruses*, vol. 1, no. 2, pp. 166–184, 2009.
- [15] N. C. Pedersen, H. Liu, J. Scarlett et al., "Feline infectious peritonitis: role of the feline coronavirus 3c gene in intestinal tropism and pathogenicity based upon isolates from resident and adopted shelter cats," *Virus Research*, vol. 165, no. 1, pp. 17–28, 2012.
- [16] H. Vennema, A. Poland, J. Foley, and N. C. Pedersen, "Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses," *Virology*, vol. 243, no. 1, pp. 150–157, 1998.
- [17] A. Dedeurwaerder, D. A. J. Olyslaegers, L. M. B. Desmarests, I. D. M. Roukaerts, S. Theuns, and H. J. Nauwynck, "ORF7-encoded accessory protein 7a of feline infectious peritonitis virus as a counteragent against IFN- α -induced antiviral response," *Journal of General Virology*, vol. 95, no. 2, pp. 393–402, 2014.
- [18] M. Kennedy, N. Boedeker, P. Gibbs, and S. Kania, "Deletions in the 7a ORF of feline coronavirus associated with an epidemic of feline infectious peritonitis," *Veterinary Microbiology*, vol. 81, no. 3, pp. 227–234, 2001.
- [19] C. M. Borschensky and M. Reinacher, "Mutations in the 3c and 7b genes of feline coronavirus in spontaneously affected FIP

- cats," *Research in Veterinary Science*, vol. 97, no. 2, pp. 333–340, 2014.
- [20] H.-W. Chang, R. J. de Groot, H. F. Egberink, and P. J. M. Rottier, "Feline infectious peritonitis: Insights into feline coronavirus pathobiogenesis and epidemiology based on genetic analysis of the viral 3c gene," *Journal of General Virology*, vol. 91, no. 2, pp. 415–420, 2010.
- [21] A. S. Hora, K. M. Asano, J. M. Guerra et al., "Intrahost diversity of feline coronavirus: a consensus between the circulating virulent/avirulent strains and the internal mutation hypotheses?" *The Scientific World Journal*, vol. 2013, Article ID 572325, 8 pages, 2013.
- [22] T. A. Hall, "Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT," in *Nucleic Acids Symposium Series*, vol. 41, pp. 95–98, 1999.
- [23] K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar, "MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 28, no. 10, pp. 2731–2739, 2011.
- [24] Á. Bálint, A. Farsang, Z. Zádori, and S. Belák, "Comparative *in vivo* analysis of recombinant type II feline coronaviruses with truncated and completed ORF3 region," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 2, Article ID e88758, 2014.
- [25] P. J. M. Rottier, "The coronavirus membrane glycoprotein," in *The Coronaviridae*, S. G. Siddell, Ed., pp. 115–140, Plenum Press, New York, NY, USA, 1995.