Claudia Madalena Cabrera Mori

**Avaliação da etiopatogenia da encefalite
causada pelo herpesvírus equino tipo 1
utilizando um modelo murino de neuroinfecção**

**São Paulo
2012**

CLAUDIA MADALENA CABRERA MORI

Avaliação da etiopatogenia da encefalite 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
2012

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2675
FMVZ

Mori, Claudia Madalena Cabrera
Avaliação da etiopatogenia da encefalite causada pelo herpesvírus equino tipo 1 utilizando
um modelo murino de neuroinfecção / Claudia Madalena Cabrera Mori. -- 2012.
125 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientadora: Prof. Dr. Paulo César Maiorka.

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

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Infecção experimental com estirpes neuropatogênicas do Herpesvírus Equino Tipo 1 em diferentes linhagens de camundongos como modelo de estudo da Encefalite Viral", protocolado sob o nº 2664/2012, utilizando 50 (cinquenta) camundongos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Paulo César Maiorka, 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 e foi aprovado em reunião de 20/6/2012.

We certify that the Research "Experimental infection with neuropathogenic strains of Equine Herpesvirus Type 1 in different mouse strains as model for the study of Viral Encephalitis", protocol number 2664/2012, utilizing 50 (fifty) mice, under the responsibility Prof. Dr. Paulo César Maiorka, 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 and was approved in the meeting of day 6/20/2012.

São Paulo, 21 de junho de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Comissão de Ética no uso de animais

PARECER

Interessado: **Claudia Madalena Cabrera Mori**

Assunto: **Protocolo de experimentação adotado em experimento animal**

A Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo analisou o projeto intitulado: "Hespervírus Equino Tipo 1 promovendo o Neurotropismo e a Neurovirulência em um modelo de infecção em camundongo", protocolado sob o número 2665/2012, utilizando 64 (sessenta e quatro) camundongos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Paulo César Maiorka, e constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de ética adotados por esta Comissão.

The "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo has analyzed the research entitled: "Equid Herpesvirus Type 1 exhibits Neurotropism and Neurovirulence in a mouse model", protocol number 2665/2012, utilizing 64 (sixty four) mice, under the responsibility Prof. Dr. Paulo César Maiorka, and found that it was conducted in accordance with the principles of ethics adopted by the committee.

São Paulo, 21 de junho de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni

Presidente

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CETEA-IB

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 18/05, sobre o Projeto de Pesquisa *Infecção experimental com diferentes estirpes nacionais do herpesvírus equino tipo 1 (HVE-1) em camundongos Balb/c*, sob a responsabilidade da Dra. Maria do Carmo Custódio de Souza Hunold Lara, está de acordo com os princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Protocolo aprovado pela CETEA-IB em 19 de outubro de 2005.

São Paulo, 19 de outubro de 2005.

Dra. Vera Cecília Annes Ferreira
Coordenadora da CETEA-IB

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CETEA-IB

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 70/08, sobre o Projeto: Infecção experimental com estirpes nacionais do herpesvírus eqüino tipo 1 (EHV-1) com alta e baixa virulência em camundongos isogênicos BALB/c (H2d) e C57BL(H2b), sob a responsabilidade de Maria do Carmo C.S.H. Lara está de acordo com os princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Protocolo aprovado pela CETEA-IB em 15 de outubro de 2008.

São Paulo, 15 de outubro de 2008.

Dra. Vera Cecília Annes Ferreira
Coordenadora da CETEA-IB

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Mori, Claudia Madalena Cabrera

Título: Avaliação da etiopatogenia da encefalite 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: _____

Dedico este trabalho às duas pessoas mais importantes na minha vida:

*Ao meu pai, **Alcides**, cujos ensinamentos e sabedoria motivaram minhas conquistas até o presente.*

*Ao meu companheiro, **Enio**, pelo amor, amizade e confiança em todas as horas; sobretudo, nos momentos mais difíceis quando juntos conseguimos força para vencer qualquer obstáculo.*

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Paulo César Maiorka**, pela orientação, amizade e confiança.

À **Profa. Dra. Silvana Gorniak**, minha segunda orientadora, pela amizade, incentivo e por ter abraçado a causa de produzir modelos animais com qualidade para a pesquisa.

Ao Instituto Biológico de São Paulo, em nome das pesquisadoras **Elenice M. S. Cunha, Maria do Carmo C. S. H. Lara e Eliana M.C.Villalobos** pela valiosa colaboração em todas as etapas deste trabalho e pela oportunidade de realizar parte dos experimentos no Laboratório de Raiva e Encefalites.

Aos professores do Departamento de Patologia **Maria Lúcia Zaidan Dagli, Luciano Freitas Felício, Helenice Souza Spinosa e João Palermo Neto** pelos ensinamentos transmitidos, incentivo e apoio durante todos esses anos de convívio e pela oportunidade da realização deste trabalho.

Aos demais docentes do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pelos ensinamentos, apoio e agradável convivência por todos esses anos.

À todos os funcionários do biotério do Departamento de Patologia, das gerações passadas e atuais, **Ademir, Luizinho, Rosires, Magali, Herculano, Idalina, Nelsinho, Mauro, Luciana e Aline** pela amizade, dedicação e apoio incondicional, que possibilitou a concretização deste trabalho.

Aos funcionários do CEPTOX **Paulo César, Ester e Elaine** pela amizade, receptividade e apoio nos projetos de biotério.

Às funcionárias da Biblioteca da FMVZ/USP, **Elza, Solange, Fernanda e Helena** pela amizade e pelo imprescindível auxílio na realização do presente trabalho.

Aos demais funcionários da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela amizade e agradável convivência por todos esses anos.

Aos professores **Paulo Eduardo Brandão e Leonardo Richtzenhain** pela utilização das instalações e equipamentos do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, que tornaram possível a realização deste trabalho.

À **Emily Baskerville, Aline Aparecida da Silva e Larissa Favaro**, pelo auxílio nas várias etapas dos experimentos.

À **Samantha Miyashiro, Caio Rodrigues, Viviane de Paula e Alisson Ribeiro**, pelas sugestões e auxílio na realização dos experimentos.

À **Silvia Massironi**, minha grande amiga e incentivadora, quem despertou meu interesse pelo fascinante mundo da genética de camundongos.

Às amigas bioteristas **Thaís, Regina, Sandra, Silvânia, Renaide, Luci, Gui Mi Ko, Renata, Flávia e Ana Tada** pela agradável convivência em todos esses anos e a constante troca de conhecimentos.

À **Márcia Olivato** pelo precioso auxílio e dedicação no estudo dos camundongos mutantes, vislumbrando projetos futuros.

À minha grande amiga **Adriana Margarido** pela agradável convivência e breves momentos de descontração em meio das inúmeras atribuições diárias.

À **Milena Oliveira** pela agradável convivência e valiosa colaboração nas intermináveis requisições de compras.

À **Cristina Aurichi** pelo constante auxílio enquanto secretária do Departamento e, atualmente, como secretária da Pós-Graduação.

Aos amigos **Vagner e Nicolle** pelo precioso auxílio na disciplina Fundamentos para Pesquisa em Patologia Experimental e Comparada.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP)** e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, que proporcionaram o suporte financeiro necessário para a realização deste projeto.

Aos animais de laboratório, em especial aos camundongos, pela sua importância na realização desta e de tantas outras pesquisas e pela sua inestimável contribuição com a Ciência.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Deves aprender as regras do jogo.
E depois deves jogar melhor que todo mundo.”*

Albert Einstein

RESUMO

MORI, C. M. C. **Avaliação da etiopatogenia da encefalite causada pelo herpesvírus equino tipo 1 utilizando um modelo murino de neuroinfecção.** [Evaluation of the encephalitis etiopathogenesis caused by equine herpesvirus type 1 using a mouse model of neuroinfection]. 2012. 125 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1) é um importante patógeno que causa doença respiratória, abortamento e distúrbios neurológicos em equinos. O presente estudo foi realizado visando estabelecer um modelo murino de infecção pelo EHV-1 para investigar a resposta do hospedeiro frente à infecção viral e as alterações neurológicas causadas por esse agente. Camundongos das linhagens BALB/c, BALB/c nude, C3H/HeJ, C57BL/6, C57BL/6 CD4^{-/-} e C57BL/6 CD8^{-/-} foram inoculados por via intranasal com as estirpes brasileiras A4/72, A9/92 e A3/97 do EHV-1. Neste estudo, associou-se a histopatologia, a imunoistoquímica e o método de transcrição reversa seguida pela PCR quantitativa em tempo real para investigar a relação entre a infecção pelo vírus com o desenvolvimento de lesões e a resposta de citocinas pró-inflamatórias no SNC de camundongos das diferentes linhagens. 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, descarga nasal e ocular, dispnéia, desidratação e sialorréia apareceram entre o 2º e 3º dpi. Essas manifestações foram acompanhadas pelo aumento da sensibilidade a estímulos externos, convulsões, recumbência e morte. O vírus foi consistentemente isolado do SNC, pulmões, fígado, baço e timo de todos os camundongos com sinais neurológicos. As alterações histopatológicas consistiram de leptomeningite, hemorragia focal, ventriculite, degeneração e necrose neuronal, neuronofagia, inflamação não supurativa, gliose multifocal e infiltração perivascular de células polimorfonucleares e mononucleares. A análise imunoistoquímica demonstrou que as estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 replicaram-se nos neurônios do bulbo olfatório, córtex cerebral e no hipocampo. Ao contrário, os camundongos inoculados com a estirpe A3/97 do EHV-1 não apresentaram perda de peso ou quaisquer sinais clínicos ou neurológicos; entretanto, o vírus foi isolado dos pulmões no 3º dpi. As estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 apresentaram tropismo pelo tecido nervoso com capacidade de neuroinvasão e neurovirulência. A estirpe A3/97 do EHV-1 não foi neurovirulenta, apesar de ter sido reisolada do SNC de camundongos BALB/c nude infectados. Detectou-se aumento da expressão de mRNA para TNF- α , IL-6 e CCL2 no SNC dos camundongos infectados pelo EHV-1 com 2 e 3 dpi; entretanto, não houve expressão de mRNA para IFN- γ . Os camundongos com o fundo genético C57BL/6, que apresentam predominantemente resposta do tipo Th1, mostraram níveis mais altos de expressão de mRNA para TNF- α , IL-6 e CCL2, quando comparados com os BALB/c. A gravidade dos sinais observados em camundongos infectados pode ser correlacionada com o pico destas 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 a infecção por estirpes neuropatogênicas do EHV-1 e poderiam servir como modelo para o estudo da patogênese e dos mecanismos que contribuem no desenvolvimento da mieloencefalopatia herpética equina.

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

ABSTRACT

MORI, C. M. C. **Evaluation of the encephalitis etiopathogenesis caused by equine herpesvirus type 1 using a mouse model of neuroinfection.** [Avaliação da etiopatogenia da encefalite causada pelo herpesvírus equino tipo 1 utilizando um modelo murino de neuroinfecção]. 2012. 125 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Equid herpesvirus type 1 (EHV-1) is a major pathogen which causes respiratory disease, abortions and neurological disorders in horses. The present study was carried out to establish a murine model of EHV-1 infection and investigate host response against the virus and neurological disorders caused by this pathogen. BALB/c, BALB/c nude, C3H/HeJ, C57BL/6, C57BL/6 CD4^{-/-} and C57BL/6 CD8^{-/-} mice were intranasally inoculated with EHV-1 A4/72, A9/92 and A3/97 Brazilian strains. In this study, we combined histopathology, immunohistochemistry, and a quantitative real-time RT-PCR method to investigate the relationship between virus infection and the development of lesions and cytokine responses in the CNS of different strains of mice. Intranasal inoculation of EHV-1 A4/72 and A9/92 induced acute and lethal meningoencephalitis in mice. Clinical and neurological signs appeared between the 2nd and 3rd dpi and included weight loss, ruffled fur, a hunched posture, crouching in corners, nasal and ocular discharges, dyspnoea, dehydration and increased salivation. These signs were followed by increased reactivity to external stimulation, seizures, recumbency and death. The virus was consistently recovered from the CNS and visceral organs of all mice with neurological symptoms. Histopathological changes consisted of leptomeningitis, focal hemorrhage, ventriculitis, neuronal degeneration and necrosis, neuronophagia, non-suppurative inflammation, multi-focal gliosis and perivascular infiltration of polymorphonuclear and mononuclear cells. Immunohistochemical examination demonstrated that EHV-1 strains A4/72 and A9/92 replicated in neurons of the olfactory bulb, cortical regions and hippocampus. In contrast, mice inoculated with the EHV-1 strain A3/97 showed neither weight loss nor apparent clinical or neurological signs of the disease; however, the virus was recovered from their lungs at 3 dpi. While EHV-1 strains A4/72 and A9/92 exhibited a high degree of tropism for the CNS with robust neuroinvasiveness and neurovirulence, the EHV-1 strain A3/97 was not neurovirulent despite being detected in the CNS of infected BALB/c nude mice. Increased mRNA levels of TNF- α , IL-6 and CCL2 were detected in the nervous tissue of EHV-1 infected mice at 2 and 3 dpi; however, IFN- γ mRNA was not consistently expressed. Mice with the background C57BL/6, which exhibit predominantly Th1-type responses, showed the highest levels of TNF- α , IL-6 and CCL-2 mRNA in the CNS, when compared to BALB/c mice. The severity of signs observed in infected mice could be correlated with the peak of these proinflammatory cytokines (TNF- α and IL-6) and the chemokine CCL2, which are produced early after viral infection by both cells infiltrating into the CNS from the periphery and/or glial resident cells. These findings indicate that several inbred mouse strains are susceptible to neuropathogenic EHV-1 strains and should be useful models for studying the pathogenesis and mechanisms contributing to equine herpes myeloencephalopathy in horses.

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1 -	Mini-isoladores de polisulfona medindo 20×32×21 cm (422 cm ²) para alojamento dos camundongos (a) e enriquecimento ambiental utilizando canudos de papel (b) - São Paulo – 2009	45
Figura 2 -	Inoculação por via intranasal com 25 µL da suspensão viral do EHV-1 das estirpes A4/72, A9/92, A3/97 ou EMEM. O procedimento foi realizado com o camundongo anestesiado dentro de cabine de segurança biológica classe II - São Paulo – 2009....	46
Figura 3 -	Perfusão transcardíaca utilizando a bomba peristáltica para perfusão de camundongos (MasterFlex - Cole-Parmer®) - São Paulo – 2009	47
Figura 4 -	Peso médio dos camundongos das quatro linhagens isogênicas (BALB/c, BALB/c nude, C57BL/6 e C3H/HeJ) infectados com as estirpes A4/72, A9/92 e A3/97 do EHV-1, comparados ao grupo controle - São Paulo – 2009	53
Figura 5 -	Camundongos infectados com as estirpes neuropatogênicas A4/72 e A9/92 do EHV-1 no 3º dpi - São Paulo – 2009	55
Figura 6 -	Camundongo BALB/c nude infectado com a estirpe A3/97 do EHV-1 no 3º dpi apresentando conjuntivite - São Paulo – 2009	56
Figura 7 -	Ganho de peso (média ± desvio padrão) das diferentes linhagens de camundongos (BALB/c, BALB/c nude, C57BL/6 e C3H/HeJ) infectados com a estirpe A3/97 do EHV-1 no 3º dpi - São Paulo – 2009	56
Figura 8 -	Ganho de peso (média ± desvio padrão) das diferentes linhagens de camundongos (BALB/c, BALB/c nude, C57BL/6 e C3H/HeJ) infectados com as estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 no 3º dpi -São Paulo - 2009	57
Figura 9	Ganho de peso (média ± desvio padrão) de camundongos das quatro linhagens isogênicas (BALB/c, BALB/c nude, C57BL/6 e C3H/HeJ) infectados com as estirpes A4/72, A9/92 e A3/97 do EHV-1 no 3º dpi, comparados ao grupo controle - São Paulo - 2009	58
Figura 10 -	(a) Cultivo de células E-Dermal antes da inoculação viral. (b) Cultivo de células E-Dermal 48 horas após a inoculação das amostras de tecido dos camundongos infectados pelo EHV-1, mostrando células arredondas, aumento da refração, desprendimento de células, presença de agregados citoplasmáticos semelhantes a cachos de uva e formação de sincícios. (c) Identificação viral pela PCR: amplicons (410 pares de bases [bp]), que correspondem ao gene ORF64 visualizado em gel de agarose corado pelo brometo de etídio. Amostras: EHV-1 A3/97 (coluna 1), EHV-1 A9/92 (coluna 2), EHV-1 A4/72 (coluna 3) e um marcador de 100 pb (M) (coluna 4) - São Paulo - 2009	60
Figura 11 -	Cortes histológicos de encéfalo representativos dos camundongos infectados com as estirpes neuropatogênicas A4/72 e A9/92 do EHV-1 no 3º dpi, corados por hematoxilina-eosina - São Paulo - 2009	63

Figura 12 -	Cortes histológicos de encéfalo representativos dos camundongos infectados com as estirpes neuropatogenicas A4/72 e A9/92 do EHV-1 no 3º dpi, corados por hematoxilina-eosina - São Paulo - 2009	64
Figura 13 -	Cortes histológicos de encéfalo representativos dos camundongos infectados com as estirpes neuropatogenicas A4/72 e A9/92 do EHV-1 no 3º dpi, corados por hematoxilina-eosina - São Paulo – 2009	65
Figura 14 -	Cortes histológicos de pulmão representativos dos camundongos infectados com as estirpes A4/72, A9/92 e A3/97 do EHV-1 no 3º dpi, corados por hematoxilina-eosina - São Paulo - 2009	66
Figura 15 -	Marcação imunoistoquímica com o anticorpo anti-ERV/EHV-1 no encéfalo de camundongos infectados com as estirpes neuropatogenicas A4/72 e A9/92 do EHV-1 - São Paulo - 2009	67
Figura 16 -	Gral e pistilo utilizados para macerar os encéfalos dos camundongos, congelados em vapor de nitrogênio, para extração de RNA - São Paulo – 2011 e 2012	72
Figura 17 -	Representação esquemática das etapas de extração de RNA total a partir de amostras de encéfalos dos camundongos dos grupos controle e inoculados com a estirpe A9/92 do EHV-1, utilizando o kit RNAspin Mini RNA isolation (GE HealthCare) - São Paulo – 2012	73
Figura 18 -	Representação esquemática do princípio de funcionamento da PCR quantitativa em tempo real utilizando sonda Taqman® tipo MGB. Uma sonda de fita simples marcada com duas moléculas, uma fluorescente ligada na extremidade 5' da sonda (FAM ou VIC) e a outra não fluorescente na extremidade 3'-terminal (<i>quencher</i>), é adicionada à reação de PCR. A sonda é clivada na extremidade 5' devido à atividade de exonuclease da enzima Taq DNA polimerase separando as moléculas quando sintetiza a fita nova. A fluorescência da molécula <i>reporter</i> é detectada pelo sistema óptico do equipamento de PCR em tempo real - São Paulo –2012	77
Figura 19 -	Concentrações em pg/mL (média ± desvio padrão) de IL-6, IL-10, CCL2, IFN- γ , TNF- α e IL-12p70 no plasma de camundongos BALB/c no 2º dia pós-infecção com a estirpe A9/92 do EHV-1, comparadas ao grupo controle - São Paulo – 2011 e 2012 ..	81
Figura 20 -	Variação em número de vezes da expressão gênica da quimiocina CCL2 no SNC dos camundongos de diferentes linhagens inoculados com a estirpe neuropatogênica A9/92 do EHV-1, calculada pelo método $\Delta\Delta Ct$. Os valores relativos (mediana ± erro padrão) representam o número de vezes que a expressão de mRNA no SNC dos camundongos infectados está aumentada em relação ao controle - São Paulo – 2011 e 2012	84

Figura 21 -	Variação em número de vezes da expressão gênica de IL-6 no SNC dos camundongos de diferentes linhagens inoculados com a estirpe neuropatogênica A9/92 do EHV-1, calculada pelo método $\Delta\Delta Ct$. Os valores relativos (mediana $\pm$ erro padrão) representam o número de vezes que a expressão de mRNA no SNC dos camundongos infectados está aumentada em relação ao controle - São Paulo – 2011 e 2012	85
Figura 22 -	Variação em número de vezes da expressão gênica de TNF- α no SNC dos camundongos de diferentes linhagens inoculados com a estirpe neuropatogênica A9/92 do EHV-1, calculada pelo método $\Delta\Delta Ct$. Os valores relativos (mediana $\pm$ erro 10padrão) representam o número de vezes que a expressão de mRNA no SNC dos camundongos infectados está aumentada em relação ao controle - São Paulo – 2011 e 2012	86

QUADROS

Quadro 1 -	Principais herpesvírus de alguns membros da família <i>Equidae</i> - São Paulo – 2012	24
Quadro 2 -	Alterações genéticas relacionadas aos fatores de neuropatogenicidade do EHV-1 - São Paulo - 2012	29
Quadro 3 -	Complexo de histocompatibilidade principal (MHC) do camundongo. Haplotipos do complexo H2 nas principais linhagens isogênicas - São Paulo – 2012	36
Quadro 4 -	Distribuição dos camundongos BALB/c (H2 ^d), BALB/c <i>nude</i> (H2 ^d), C57BL/6 (H2 ^b) e C3H/HeJ (H2 ^k) nos grupos controle e inoculados por via intranasal com as estirpes A4/72, A9/92 e A3/97 do EHV-1 na dose infectante de 10 ³ DICT ₅₀ /25 μ L - São Paulo – 2009	45
Quadro 5 -	Numero de camundongos inoculados por via intranasal com o a estirpe neuropatogênica A9/92 do EHV-1 na dose infectante de 10 ³ DICT ₅₀ /25 μ L - São Paulo – 2011 e 2012	70
Quadro 6 -	Assays [Oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>) senso e anti-senso 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 – 2011 e 2012	76

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, BALB/c nude, C57BL/6 e C3H/HeJ - São Paulo – 2009	54
Tabela 2 -	Isolamento viral a partir de amostras de tecido dos camundongos infectados com as estirpes A4/72, A9/92 e A3/97 do EHV-1 no 3º dpi. São Paulo – 2009	61
Tabela 3 -	Manifestações clínicas da infecção pela estirpe A9/92 do EHV-1 em camundongos das linhagens BALB/c, C57BL/6, CD4 ^{-/-} e CD8 ^{-/-} . São Paulo – 2011 e 2012	80
Tabela 4 -	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 a estirpe neuropatogênica A9/92 do EHV-1, calculada pelo método $\Delta\Delta Ct$. Os valores relativos foram expressos em mediana $\pm$ erro padrão. São Paulo – 2011 e 2012	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHV	herpesvírus asinino
APCs	células apresentadoras de antígenos
CCL2 (MCP-1)	proteína quimiotática de monócitos 1
CCL3 (MIP-1 α)	proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa
CD4	molécula de superfície de linfócitos T com função auxiliadora
CD4 $-/-$	<i>knockout</i> CD4
CD8	molécula de superfície de linfócitos T com função citotóxica
CD8 $-/-$	<i>knockout</i> CD8
cDNA	DNA complementar
CEUA	comissão de ética no uso de animais
CMV	citomegalovírus humano
cm	centímetro
cm ²	centímetro quadrado
CO ₂	gás carbônico
DAB	3, 3'-diaminobenzidina
DAMPs	padrões moleculares associados aos danos celulares
DEPC	diethylpyrocarbonate
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	nucleotídeos trifosfatados
dpi	dias pós infecção
ECP	efeito citopático
EDTA	ácido etilenodiaminatetracético
EEV	vírus da encefalite equina venezuelana
EHM	mieloencefalopatia herpética equina
EHV	herpesvírus equino
EHV-1	herpesvírus equino tipo 1
EMEM	meio essencial de Eagle
EUA	Estados Unidos da América
EzebGHV	<i>Equus zebra</i> gammaherpesvirus
FMVZ/USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
g	grama
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HCl	ácido clorídrico
HE	hematoxilina e eosina
HSV	herpesvírus simplex

IFN- γ	interferon gama
IHQ	imunoistoquímica
IL	interleucina
KCl	cloreto de potássio
kg	kilograma
LPS	lipopolissacarídeo da membrana exterior de bactérias gram-negativas
M	molar
mg	miligrama
MGB	do inglês: <i>minor groove binder</i>
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MHC	complexo de histocompatibilidade principal
mL	mililitro
mM	milimolar
mm ³	milímetro cúbico
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
NK	do ingles: <i>natural killer</i>
ng	nanograma
ORF	do inglês: <i>open reading frame</i>
PAMPs	padrões moleculares associados ao patógeno
pb	pares de bases
PBS	tampão fosfato salino (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	reação em cadeia da polimerase
PE	fluorocromo ficoeritrina.
PFU	unidades formadoras de placas
pH	potencial hidrogeniônico
PRRs	receptores de reconhecimento de padrões
RFLP	do inglês: <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	ácido ribonucleico
rRNA	ácido ribonucleico ribossomal
RT	transcrição reversa
RT-qPCR	transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
SNC	sistema nervoso central
SNP	do inglês: <i>single nucleotide polymorphism</i>

TCID ₅₀	dose infectante 50% em cultura de tecidos
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
VERO	cultivo de células de rim de macaco verde
WAHV	herpesvírus de jumento selvagem
ZHV	herpesvírus de zebra
$\pm$	mais ou menos
<	menor que
%	por cento
°C	grau Celcius
μ g	micrograma
μ L	microlitro
μ m	micrometro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	HISTÓRICO.....	25
1.2	HISTÓRICO NO BRASIL	30
1.3	MODELOS ANIMAIS	31
1.4	RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO CONTRA A INFECÇÃO VIRAL.....	34
1.5	RESPOSTA IMUNE NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	38
2	OBJETIVOS	40
2.1	OBJETIVO GERAL.....	41
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
3	MATERIAIS E MÉTODOS: EXPERIMENTO 1.....	42
3.1	HERPESVÍRUS EQUINO TIPO I	43
3.2	CAMUNDONGOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	43
3.3	PERFUSÃO TRANSCARDÍACA	46
3.4	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA	47
3.5	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO VIRAL	49
3.6	ANÁLISE DOS RESULTADOS	50
4	RESULTADOS: EXPERIMENTO 1	51
4.1	SINAIS CLÍNICOS	52
4.2	ISOLAMENTO VIRAL E IDENTIFICAÇÃO DO EHV-1.....	59
4.3	EXAMES ANÁTOMO E HISTOPATOLÓGICOS.....	62
4.4	IMUNOISTOQUÍMICA	67
5	MATERIAIS E MÉTODOS: EXPERIMENTO 2.....	68
5.1	HERPESVÍRUS EQUINO TIPO I	69
5.2	CAMUNDONGOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	69
5.3	COLETA DO ENCÉFALO PARA RT-PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL	70
5.4	QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINA NO PLASMA	71
5.5	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RNA TOTAL.....	71
5.6	TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT)	74
5.7	EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS E QUIMIOCINA PRÓ-INFLAMATÓRIAS.....	74
5.8	ANÁLISE DOS RESULTADOS	78
6	RESULTADOS: EXPERIMENTO 2	79
6.1	SINAIS CLÍNICOS	80
6.2	QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINA NO PLASMA	81
6.3	EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS E QUIMIOCINA PRÓ-INFLAMATÓRIAS.....	82
7	DISCUSSÃO	87
8	CONCLUSÕES	100
	REFERÊNCIAS	102
	APÊNDICE	116

1. INTRODUÇÃO

O herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1) foi descrito pela primeira vez pelos pesquisadores Willian W. Dimock e Philip R. Edwards na Estação de Agricultura Experimental de Kentucky, Estados Unidos da América (EUA), no início da década de 30 (DIMOCK; EDWARDS, 1933). Desde então, inúmeras publicações tiveram o objetivo de investigar a infecção causada por esse agente viral relacionando-a à imunidade do hospedeiro (ALLEN; BRYANS, 1986; PATEL; HELDENS, 2005; KYDD et al., 2006). No entanto, ainda no século XXI, cerca de 80 anos depois de sua primeira descrição, o EHV-1 continua sendo um patógeno de suma importância capaz de ocasionar perdas significativas sob o ponto de vista econômico aos plantéis, fato que o torna uma ameaça potencial à criação mundial de equinos, uma vez que sua distribuição é cosmopolita. Esse agente tem sido identificado como a causa de abortamentos, mortalidade neonatal, doença respiratória e manifestações neurológicas em cavalos (ALLEN; BRYANS, 1986; GRYSPEERDT et al., 2010). A mieloencefalopatia herpética equina (EHM) é menos comum do que as outras formas de doença determinadas pelo EHV-1; entretanto, 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 EUA (APHIS, 2007; VANDEKERCKHOVE et al., 2010).

Até o momento já foram identificadas 14 espécies de herpesvírus que acometem os equídeos (KLEIBOEKER et al., 2004; EHLERS et al., 2008; PAILLOT et al., 2008; OSTERRIEDER et al., 2010; KING et al., 2011), das quais as mais relevantes para os cavalos são os herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1) e o tipo 4 (EHV-4). A nomenclatura taxonômica desses agentes foi determinada pela ordem de descoberta ou de classificação como herpesvírus, porém nem todos estão relacionados com a manifestação de enfermidades em cavalos. Os principais herpesvírus responsáveis por infecções em alguns membros da família *Equidae* estão descritos no quadro 1.

Quadro 1 - Principais herpesvírus de alguns membros da família *Equidae* - São Paulo - 2012

Vírus	Sinônimos	Subfamília	Gênero	Hospedeiro natural	Doença
EHV-1	Vírus do abortamento equino (antigo EHV-1 subtipo 1)	α	<i>Varicellovirus</i>	<i>Equus caballus</i>	Respiratória, abortamento, neurológica
EHV-2	Antigo citomegalovírus equino	γ	<i>Percavirus</i>	<i>Equus caballus</i>	Rinite e conjuntivite
EHV-3	Vírus do exantema coital equino	α	<i>Varicellovirus</i>	<i>Equus caballus</i>	Exantema coital
EHV-4	Vírus da rinopneumonite equina (antigo EHV-1 subtipo 2)	α	<i>Varicellovirus</i>	<i>Equus caballus</i>	Respiratória
EHV-5	Antigo citomegalovírus equino	γ	<i>Percavirus</i>	<i>Equus caballus</i>	NA
EHV-6	Herpesvírus asinino tipo 1 (AHV-1 ou AsHV-1)	α	<i>Varicellovirus</i> (?)	<i>Equus asinus</i>	Exantema coital
EHV-7	Herpesvírus asinino tipo 2 (AHV-2 ou AsHV-2)	γ	NC	<i>Equus asinus</i>	NA
EHV-8	Herpesvírus asinino tipo 3 (AHV-3 ou AsHV-3)	α	<i>Varicellovirus</i>	<i>Equus asinus</i>	Rinite
EHV-9	Herpesvírus de gazela (GHV) Herpesvírus de zebra	α	<i>Varicellovirus</i>	<i>Equus grevyi</i>	Neurológica
AHV-4	Herpesvírus asinino tipo 4 (AHV-4 ou AsHV-4)	γ	NC	<i>Equus asinus</i>	Pneumonia
AHV-5	Herpesvírus asinino tipo 5 (AHV-5 ou AsHV-5)	γ	NC	<i>Equus asinus</i>	Pneumonia
AHV-6	Herpesvírus asinino tipo 6 (AHV-6 ou AsHV-6)	γ	NC	<i>Equus asinus</i>	Pneumonia
ZHV ou EzebGHV-1	Herpesvírus de zebra tipo 1 ou <i>Equus zebra gammaherpesvirus 1</i> (antigo <i>Equus zebra rhadinovirus 1</i>)	γ	NC	<i>Equus zebra</i>	NA
WAHV	Herpesvírus de jumento selvagem	γ	NC	<i>Equus somalicus</i>	NA

α : Alphaherpesvirinae; γ : Gammaherpesvirinae; NC: não classificado; NA: não associado.

Fonte dos dados brutos: King et al. (2011)

Conforme já foi citado, o EHV-1 é o agente causador de diferentes formas de doença em cavalos, das quais as mais comuns são a rinopneumonite, caracterizada por manifestações respiratórias no trato superior em animais jovens; o abortamento a vírus, responsável pelo abortamento em éguas no terço final da gestação (entre o 8º e o 11º meses) e mortalidade perinatal em potros e a EHM, caracterizada por manifestações neurológicas em cavalos adultos. Além disso, e ainda que com menor frequência, o EHV-1 pode provocar doenças oculares e infecção pulmonar vasculotrópica. Essas enfermidades podem ocorrer de forma isolada ou conjunta. Já o EHV-4 está relacionado também à ocorrência de rinopneumonite em potros e mais raramente ao abortamento ou a EHM em cavalos adultos (MORI, 2005; PUSTERLA et al., 2010).

Até recentemente, relatos de infecções causados pelo EHV-1 estavam restritas a espécie equina, existindo raras descrições de manifestações causadas por esse agente em outras espécies animais como abortamentos em vacas ou encefalites em antílopes, alpacas e lhamas (CRANDELL et al., 1979; CHOWDHURY et al., 1986; REBHUN et al., 1988). No entanto, relatos recentes da ocorrência de infecções naturais fatais causadas pelo EHV-1 em animais selvagens em zoológicos, como por exemplo, gazelas e ursos, sugerem que a quebra das barreiras naturais entre espécies não seja um evento tão incomum (WOHLSEIN et al., 2011; GREENWOOD et al., 2012).

1.1 HISTÓRICO

Dimock e Edwards, em 1932, foram os pioneiros a citar a ocorrência de surtos epizooticos de abortamentos em éguas no estado de Kentucky-EUA causado por agente de provável etiologia viral (DIMOCK; EDWARDS, 1933). Dimock et al. (1947) realizaram um estudo retrospectivo em Kentucky-EUA abrangendo o período de 1921 a 1947, concluindo que 26% dos casos de abortamento do total de 1150 fetos foram de etiologia viral.

Inicialmente, diversos estudos experimentais foram conduzidos em éguas prenhes infectadas com material biológico (macerado, filtrado e bacteriologicamente negativo), proveniente dos órgãos de fetos abortados, resultando na reprodução dos

casos de abortamento (DIMOCK; EDWARDS, 1933; WESTERFIELD; DIMOCK, 1946; DIMOCK et al., 1947). Os autores relataram lesões necróticas e presença de corpúsculos de inclusão intranucleares acidofílicos no baço, timo, fígado e pulmões dos fetos equinos abortados; contudo, não puderam relacionar esses abortamentos em éguas com qualquer manifestação clínica prévia.

Em 1941, na Hungria, Manninger e Csontos demonstraram que esse agente etiológico viral causava abortamento em éguas e doença respiratória em cavalos, inferindo que o abortamento seria uma sequela da influenza equina. A seguir, nos EUA, Doll et al. (1959), apoiando-se nos achados histopatológicos no trato respiratório de potros e em órgãos de fetos abortados, concluíram que o vírus causador do aborto equino deveria ser renomeado para vírus da rinopneumonite equina. Os autores verificaram que a doença respiratória que precedia o abortamento em éguas não estaria relacionada com o vírus causador da influenza, pois as lesões determinadas pelo vírus da rinopneumonite eram distintas daquelas observadas na gripe em equinos.

Os primeiros estudos *in vitro* foram realizados por Randall et al., em 1953, demonstrando que o vírus causador do abortamento em éguas poderia ser cultivado com sucesso em células fetais equinas (pulmão e baço). Além da reprodução de alterações normalmente observadas na infecção natural, tais como a presença de corpúsculos de inclusão intranucleares, observou-se também aumento considerável do título de antígeno viral após passagens seriadas em cultivo celular, o qual foi evidenciado pela atividade fixadora de complemento.

Somente em 1963, Plummer e Waterson classificaram o vírus da rinopneumonite e do abortamento em equinos como pertencente à família *Herpesviridae*, adotando o nome de herpesvírus equino (EHV), devido à similaridade morfológica com o *Herpes simplex* evidenciada por meio da microscopia eletrônica.

A primeira associação entre o EHV e a enfermidade neurológica ocorreu em 1966, quando Saxegaard isolou o vírus a partir do encéfalo e da medula de um cavalo com paralisia nos membros posteriores.

Devido às similaridades morfológicas e antigênicas, até 1981 o EHV-1 e o EHV-4 eram considerados um único agente, classificados como subtipos 1 e 2 do EHV-1. Com base nos diferentes padrões eletroforéticos do DNA viral obtidos pela endonuclease de restrição (RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*),

Studdert et al. (1981) reclassificaram essa divisão do EHV-1 em subtipos 1 e 2 para EHV-1 e EHV-4, respectivamente.

Allen et al. (1983) foram os pioneiros no estudo da diversidade molecular entre as estirpes do EHV-1, pesquisando cinco endonucleases de restrição (*Bam*HI, *Eco*RI, *Bgl*II, *Sal*I e *Sst*I). A partir de 272 isolados do EHV-1 derivados de casos de abortamento em éguas no Estado de Kentucky, EUA, no período entre 1960 e 1982, os autores identificaram a existência de pelo menos 16 padrões eletroforéticos distintos do DNA viral, denominados de variantes, as quais foram classificadas como protótipo EHV-1P e EHV-1A até EHV-1O. Entretanto, mais de 90% dos isolados, provenientes de animais não vacinados, apresentaram a predominância de somente duas variantes do EHV-1 denominadas de P e B, determinadas pela clivagem do DNA genômico com a enzima *Bam*HI, sugerindo assim, uma variação molecular viral limitada na população estudada.

De forma semelhante, alguns pesquisadores encontraram pouca diversidade molecular e predomínio da variante P em isolados do EHV-1 provenientes de outras regiões geográficas, como no Brasil (MORI et al., 2012) na Argentina (GALOSI et al., 1998), no Canadá (NAGY et al., 1997), na Dinamarca (PALFI; CHRISTENSEN 1995) na França (ZIENTARA et al., 1993), na Holanda (VAN MAANEN et al., 2000), no Japão (KIRISAWA et al., 1993; PAGAMJAV et al., 2005), na Oceania (STUDDERT et al., 1992), no Reino Unido (MCCANN et al., 1995) e na Índia (GUPTA et al., 2005).

Allen et al. (1985) observaram que a variante P do EHV-1 era predominante e responsável por mais de 80% dos abortamentos em éguas no Estado de Kentucky, EUA, nas décadas de 1960 e 1970. No início da década de 1980, a variante B começou a ser encontrada com maior frequência e posteriormente tornou-se o isolado mais comum em fetos abortados. Esse fenômeno de emergência de novas estirpes virais em substituição das mais antigas sugere que pressões biológicas e antigênicas, como por exemplo, a imunidade vacinal, poderiam selecionar o crescimento e a sobrevivência das variantes do EHV-1 encontradas inicialmente com menor frequência na população. Por outro lado, as distintas estirpes virais isoladas de cavalos com manifestações neurológicas têm sido classificadas como sendo do tipo P do EHV-1, incluindo aquelas encontradas na Argentina e no Brasil (GALOSI et al., 1998; MORI et al., 2012).

Após o sequenciamento completo do genoma do EHV-1 concluído por Telford et al. (1992), diversos autores pesquisaram variações moleculares que pudessem estar relacionadas com as propriedades biológicas, tais como infectividade e neuropatogenicidade, e com a distribuição geográfica das distintas estirpes virais (MCCANN et al., 1995; GUPTA et al., 2005; PAGAMJAV et al., 2005; NUGENT et al., 2006).

Até recentemente, encontravam-se relatos esporádicos de manifestações neurológicas em cavalos ocasionadas pelos herpesvírus equídeos (EHV), sendo que os surtos dessa forma de doença eram raramente notificados. No entanto, a partir de 2001, tem ocorrido crescimento expressivo no número de casos de EHM na Europa e na América do Norte, sugerindo assim um aumento na prevalência e/ou morbidade e mortalidade causada por esses vírus em decorrência de possíveis mutações (APHIS, 2007).

Sabe-se que variações genéticas entre o EHV-1 tipo P e B estão relacionadas a mutações do gene da região ORF (*open reading frame*) 64. Este gene codifica a ICP4 (proteína da célula infectada 4) que pode estar relacionada com a neuropatogenicidade do EHV-1 (PAGAMJAV et al., 2005).

Nugent et al. (2006) demonstraram diferenças moleculares relevantes em regiões variáveis específicas do genoma viral ao analisarem 132 isolados do EHV-1 originários de casos de EHM e de abortamento de diversas regiões do mundo, identificando uma mutação por substituição nucleotídica não sinônima de base única (SNP - *single nucleotide polymorphism*) no gene codificador da DNA polimerase (ORF30) nas amostras neuropatogênicas. Tal mutação (A₂₂₅₄/G₂₂₅₄ na sequência de nucleotídeos e N₇₅₂/D₇₅₂ nos segmentos de aminoácidos) provavelmente estaria relacionada com a ocorrência de doença neurológica decorrente da infecção pelo EHV-1, sugerindo a existência de um provável marcador genético de neuropatogenicidade. Os autores observaram também variabilidade na ORF68 em isolados do EHV-1 originários de oito países localizados na Europa, Américas do Sul e do Norte e Oceania, o que permitiu classificá-los em seis grupos geograficamente restritos, indicando um provável marcador filogenético.

Segundo Allen e Breathnach (2006), a estrutura da enzima DNA polimerase foi modificada devido à mutação na ORF30, ocasionando maior agressividade na replicação viral, e conseqüentemente, levando ao aumento da carga viral e da duração da viremia associada aos leucócitos. De acordo com os autores, essa

exposição mais intensa da superfície endotelial dos vasos sanguíneos do sistema nervoso central (SNC) ao EHV-1 pode contribuir para o elevado risco de desenvolvimento de doença neurológica. Por outro lado, de acordo com Borchers et al. (2006), além da lesão vascular, a doença neurológica pode ocorrer também decorrente da multiplicação viral nos neurônios por fatores relacionados ao vírus e/ou ao hospedeiro.

Estudos recentes indicam que a deleção da ORF37 seria um dos fatores de neuropatogenicidade relacionado ao desenvolvimento de encefalite no modelo murino (KASEM et al., 2010). Por outro lado, de acordo com relatos de literatura, não houve correlação entre variações moleculares de diferentes estirpes do EHV-1 e a neurovirulência em camundongos (CHOWDHURY et al., 1986; PALFI; CHRISTENSEN, 1995; GALOSI et al., 1998; MORI et al., 2012). Além disso, os autores observaram diferenças de patogenicidade das distintas estirpes do EHV-1 em camundongos e cavalos. As mutações do EHV-1 que foram identificadas como fatores de neuropatogenicidade em cavalos e animais de laboratório estão resumidas no quadro 2.

Quadro 2 - Alterações genéticas relacionadas aos fatores de neuropatogenicidade do EHV-1 - São Paulo - 2012

Gene	Função	Mutação	Neuropatogenicidade	Autores
ORF30	Subunidade catalítica da DNA polimerase	SNP N752→D752	86% D752 (42/46) e 14% N752 (4/46) em cavalos	Nugent et al. (2006)
ORF64	ICP4 (regulador da transcrição)	Recombinação 900 pb entre EHV-1 e EHV-4 (genótipo P→B)	78% P (14/18) e 22% B (4/18) em hamsters	Pagamjav et al. (2005)
ORF37	NC	Deleção no gene	Não observada em camundongos CBA	Kasem et al. (2010)

NC: não conhecida; pb: pares de bases

1.2 HISTÓRICO NO BRASIL

O primeiro relato de doença herpética em cavalos no Brasil remonta a 1964, e registra os achados anatomopatológicos de Correa e Nilsson em dois fetos abortados, que apresentaram lesões pulmonares e hepáticas características. No entanto, mais dois anos foram necessários para que os autores isolassem o vírus, em hamsters lactentes inoculados pela via intraperitoneal, a partir da suspensão de fígado de feto equino abortado originário da cidade de Botucatu, SP. A identidade com a amostra Ky-D do EHV-1 foi estabelecida pela técnica de soroneutralização viral (NILSSON; CORREA, 1966). Após esse primo isolamento do EHV-1 em 1966, somente obteve-se novos isolados em 1972 a partir da inoculação em hamsters e em cultivo celular de rim de coelho neonato. Reiner et al. (1972) isolaram o EHV-1 pela inoculação em hamsters da suspensão de fígado, baço e pulmão de feto equino abortado originário de Campinas, SP. Os autores relataram sinais neurológicos, tais como convulsões tônico-clônicas e paralisia, em hamsters lactentes após a inoculação com esse vírus, o qual foi denominado A4/72. Posteriormente, ainda foram realizados alguns isolamentos do EHV-1 em camundongos e hamsters; porém, após 1980, a maior parte dos diagnósticos desse agente foi realizada pela inoculação em cultivo de células VERO (KOTAIT, 1991).

No ano de 1992, foi isolada a estirpe denominada A9/92 do EHV-1, em cultivo de células VERO, a partir de fragmentos do fígado, baço e pulmão de um potro com 10 dias de idade proveniente de uma propriedade localizada no município de Araçariguama, SP. A identidade viral como EHV-1 foi confirmada pela técnica de imunofluorescência direta (CUNHA et al., 1993). Por sua vez, a estirpe denominada A3/97 foi isolada somente no ano de 2004, em cultivo de células de origem equina E-Dermal, a partir de fragmentos de fígado de feto equino abortado no município de Porto Feliz, SP, no ano de 1997 (CARVALHO et al., 2012). Sabe-se que tentativas anteriores de isolamento viral desse espécime, em cultivo de células VERO, não foram bem sucedidas devido à dificuldade de adaptação do vírus em células de origem não equina (comunicação pessoal)¹.

¹ Informação fornecida por CUNHA E.M.S., São Paulo, 2005.

O EHV-1 encontra-se amplamente disseminado na população equina em todo o território nacional. Diversos isolados originários de casos de doença neurológica (COSTA et al., 2008; LARA et al., 2008; MORI et al., 2011) e de abortamento ou mortalidade perinatal (REINER et al., 1972; CUNHA et al., 1993; WEIBLEN et al., 1994; CARVALHO et al., 2000; MORI et al., 2009; MORI et al., 2012; CARVALHO et al., 2012) já foram extensivamente estudados. Ao contrário, não existem relatos de isolamento de outros tipos de herpesvírus que acometem os equídeos no território nacional.

1.3 MODELOS ANIMAIS

Tentativas iniciais de reproduzir a doença causada pelo EHV-1 por meio de inoculações experimentais em animais de laboratório, como cobaias, coelhos e camundongos não foram bem sucedidas. O agente viral foi replicado com êxito somente em hamsters neonatos inoculados por via intraperitoneal com suspensões de fragmentos dos órgãos de fetos equinos abortados, fato esse evidenciado pela observação de corpúsculos de inclusão intranucleares acidofílicos nas células hepáticas desses animais (ANDERSON; GOODPASTURE 1942; DOLL et al., 1953). No entanto, os autores afirmaram que a patogênese da infecção viral no hamster difere daquela observada no cavalo, sendo o fígado e o trato respiratório os locais de replicação viral primária nessas espécies animais, respectivamente. Além do que, o modelo de infecção pelo EHV-1 em hamsters seria limitado ao estudo da infecção aguda, pois sua sobrevivência é de somente três a cinco dias após a inoculação do agente pela via intraperitoneal, em decorrência da hepatite viral. Por sua vez, no Brasil, Nilsson e Correa (1966) relataram que o isolamento viral em hamsters lactentes era difícil e trabalhoso, devido à prática de canibalismo dos neonatos inoculados pela mãe, o que era corriqueiro. Mais tarde, identificou-se alta sensibilidade no isolamento viral em camundongos neonatos inoculados pela via intracerebral com suspensões de fígado e pulmões de fetos equinos abortados (NILSSON, 1980).

Os cavalos foram utilizados como hospedeiro natural para estudo da infecção pelo EHV-1 por muitos anos. Entretanto, esses estudos foram limitados pela

natureza endêmica desse agente nas populações de equinos, com consequente dificuldade de identificar cavalos que não tenham sido previamente infectados pelo vírus. Além do mais, as pesquisas com cavalos são custosas e geralmente utilizam um número reduzido de indivíduos devido às dificuldades de execução dos experimentos e manejo desses animais (SLATER et al., 1993; SMITH, K. C. et al., 2000). Por outro lado, 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; BAXI et al., 1996; BARTELS et al., 1998; MORI et al., 2012).

Os primeiros estudos utilizando o modelo murino foram realizados com camundongos neonatos, inoculados pela via intracerebral, que demonstraram susceptibilidade a infecção pelo EHV-1; contudo, esse modelo não reproduzia as manifestações respiratórias ou abortamento que ocorrem em equinos naturalmente infectados por esse vírus (PLUMMER; COLEMAN, 1973; PATEL; EDINGTON, 1983). Awan et al. (1990) descreveram um novo modelo animal para o estudo da resposta imune e patogênese do EHV-1. A reprodução das manifestações respiratórias, abortamento e mortalidade perinatal causadas por esse agente foi estabelecida após inoculação do vírus pela via intranasal em camundongos da linhagem BALB/c (AWAN et al., 1990; AWAN et al., 1991). Estudos posteriores confirmaram que camundongos BALB/c, inoculados por via intranasal, apresentaram alterações semelhantes às aquelas observadas na infecção pelo EHV-1 em cavalos. Tais alterações incluem manifestações respiratórias, replicação viral local na mucosa do trato respiratório, viremia associada à célula e estabelecimento de latência (FIELD et al., 1992; BAXI et al., 1996; WALKER et al., 1999).

A ocorrência de abortamentos tem sido relatada no modelo murino; entretanto, os sinais neurológicos geralmente não são descritos (AWAN et al., 1995; WALKER et al., 1999; GALOSI et al., 2004). Além disso, camundongos C3H apresentaram resposta imune similar aos cavalos com a detecção de anticorpos neutralizantes após uma simples exposição ao EHV-1 (ALBER et al., 1995) e camundongos CBA apresentaram lesões no SNC semelhantes às aquelas observadas

em cavalos acometidos pela EHM (FRAMPTON et al., 2004; KASEM et al., 2010; YU et al., 2010).

O modelo de infecção experimental pelo EHV-1 também foi amplamente explorado em estudos sobre o potencial de diferentes imunógenos no desenvolvimento de vacinas (RUITENBERG et al., 1999; WALKER; PEROTTI et al., 1999; ZHANG et al., 2000) e os possíveis efeitos de agentes antivirais contra a infecção pelo EHV-1 (DE LA FUENTE et al., 1992).

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 SNC. Existe uma vasta literatura abordando esse assunto, destacando-se alguns modelos bem estabelecidos em camundongos que avaliam o papel da resposta imune na defesa e patogenia da infecção pelo herpesvírus simplex (HSV-1) (CONRADY et al., 2010; KASTRUKOFF et al., 2010).

Diversos autores demonstraram que o EHV-1 é um agente potencialmente neurotrópico produzindo encefalite em camundongos, quando inoculado por via intracerebral, a qual caracteriza-se pela replicação viral em neurônios e células gliais (PLUMMER; COLEMAN, 1973; CHOWDHURY et al., 1986; PALFI; CHRISTENSEN, 1995; HASEBE et al., 2002). Apesar de não terem sido realizados estudos mais detalhados, observou-se que isolados brasileiros do EHV-1 foram capazes de causar manifestações neurológicas em camundongos inoculados com suspensões virais preparadas a partir de tecidos de fetos equinos abortados (KOTAIT et al., 1989). Outras pesquisas com modelos murinos demonstraram neuroinvasão após inoculação do EHV-1 por via intranasal, indicando assim a habilidade desse vírus penetrar no SNC após replicação em tecidos externos como, por exemplo, no trato respiratório (AWAN et al., 1990). Relatos de literatura demonstraram que camundongos inoculados por via intranasal com o EHV-1 apresentaram lesões no SNC, as quais foram observadas mesmo sem a ocorrência de manifestações neurológicas (GOSZTONYI et al., 2009; YU et al., 2010). No experimento realizado por Gosztonyi et al. (2009) observou-se que para os isolados do EHV-1 de menor patogenicidade, o vírus permaneceu restrito no bulbo olfatório; enquanto que, estirpes mais virulentas migraram ascendentemente infectando neurônios em todo o cérebro após infecção pela via intranasal.

Outro membro da subfamília α -herpesviridae, o EHV-9, tem sido apontado como responsável por causar encefalite fatal em diferentes espécies animais. A análise filogenética dos genes das glicoproteínas B e G dos herpesvírus equinos tipo 1 e 9 confirmou a estreita relação entre esses agentes, havendo inclusive relatos da ocorrência de recombinações em regiões do gene da ORF30 (FUKUSHI et al., 1997; KASEM et al., 2008; SCHRENZEL et al., 2008; GREENWOOD et al., 2012). Vários estudos realizados em camundongos e hamsters inoculados com o EHV-9 evidenciaram o surgimento de alterações neurológicas agudas, compatíveis com as lesões observadas no SNC desses animais (FUKUSHI et al., 1997; FUKUSHI et al., 2000; EL-HABASHI et al., 2011 a,b; EL-NAHASS et al., 2011).

A infecção experimental em camundongos com as estirpes nacionais A4/72 e A9/92 do EHV-1 demonstrou ser um excelente modelo para o estudo das alterações no SNC causadas pela encefalite viral. O neurotropismo e a neuroinvasividade desses agentes em camundongos foram caracterizados pela evolução aguda da doença com aparecimento de manifestações neurológicas, tais como diminuição na propriocepção, hiperexcitabilidade e convulsões. As lesões histopatológicas observadas no SNC foram: leptomeningite, hemorragia focal, ventriculite, gliose multifocal, neuronofagia, degeneração e necrose dos neurônios, principalmente na região do hipocampo. Também foram observadas infiltrações perivasculares por polimorfonucleares e mononucleares. A taxa de letalidade foi de 100% dos animais inoculados por via intranasal, obtendo-se isolamento viral nos tecidos (SNC, fígado, baço, pulmão e timo) no terceiro dia pós-inoculação (MORI, 2005; MORI et al., 2012).

1.4 RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO CONTRA A INFECÇÃO VIRAL

A resposta imune foi conceitualmente classificada em imunidade inata e adaptativa. A imunidade inata refere-se genericamente às defesas relativamente imediatas e não específicas; à medida que, a imunidade adaptativa é específica ou adquirida, da qual fazem parte a resposta humoral, que atua na defesa contra os patógenos extracelulares e a resposta celular, principal mecanismo de defesa contra

os patógenos intracelulares. A resposta inicial inata a patógenos é mediada principalmente por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Os PRRs reconhecem o não próprio por meio de estruturas microbianas conservadas denominadas padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs); células danificadas, por sua vez, são reconhecidas por meio de padrões moleculares associados aos danos celulares (DAMPs). Os PRRs estão presentes em ambas as células imunes e não imunes. Na maioria dos casos, a sinalização através dos PRRs induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias, interleucinas (ILs), quimiocinas, e proteínas antimicrobianas, como por exemplo, opsoninas e defensinas (SELLERS et al., 2012).

As linhagens isogênicas de camundongos são altamente divergentes no seu padrão de resposta imune, como resultado de mutações e polimorfismos, que podem influenciar na resposta à patógenos e, conseqüentemente, nos danos celulares. Conhecer e explorar essas diferenças facilitam a nossa compreensão dos mecanismos envolvidos na patogenia das doenças (SELLERS et al., 2012). Por sua vez, os camundongos geneticamente modificados, com deficiência na ontogênese das células T e B e na produção de citocinas, são modelos importantes que auxiliam no estudo dos componentes da resposta imune contra as infecções (ROTHS et al., 1999; VIDAL et al., 2008).

O uso do modelo murino para investigar o componente genético da suscetibilidade a infecções virais é vantajoso porque é possível testar populações homogêneas, ou seja, linhagens puras, utilizando diferentes vias de inoculação, doses infectantes ou estirpes do vírus. Em levantamentos de literatura, encontramos inúmeros estudos de infecção por patógenos humanos e de outras espécies animais, que reproduzem fielmente vários aspectos da doença. Além disso, os fatores ambientais e as variáveis associadas ao hospedeiro e ao patógeno podem ser rigorosamente controlados (GUÉNET, 2005; RITCHEY et al., 2005; KIELCZEWSKA; VIDAL, 2006; VIDAL et al., 2008).

A resistência ou a susceptibilidade das diferentes linhagens de camundongos frente à infecção viral esta relacionada a fatores genéticos, particularmente aos genes do complexo de histocompatibilidade principal (MHC), determinando assim linhagens susceptíveis (haplotipo H2^d) ou resistentes (haplotipos H2^b e H2^k) a infecção herpética (GUÉNET, 2005). O MHC está localizado no cromossomo 17 do camundongo codificando glicoproteínas da superfície celular altamente polimórficas

que são reconhecidas pelos linfócitos T juntamente com antígenos estranhos. Em geral, as moléculas do MHC de classe I (K, D e L) apresentam antígenos para os linfócitos T citotóxicos, enquanto os linfócitos T auxiliares utilizam as moléculas de classe II (A e E). Os genes de classe I e II do MHC são designados como complexo H2 de histocompatibilidade e classificados em aloantígenos. O conjunto de alelos presentes no complexo H2 do MHC de uma determinada linhagem de camundongo é denominado de haplotipo e representado por letras minúsculas como, por exemplo, no haplotipo H2^d da linhagem BALB/c, que possui os seguintes genes de classe I: K^d, D^d e L^d (STEINMETZ et al., 1986; BENAVIDES; GUÉNET 2003). Geralmente as linhagens isogênicas são identificadas por um único haplotipo do MHC, o qual desempenha um papel importante na resposta imune frente aos patógenos (SELLERS et al., 2012). Os haplotipos do MHC nas principais linhagens de camundongos isogênicos foram representados no quadro 3.

Quadro 3 - Complexo de histocompatibilidade principal (MHC) do camundongo. Haplotipos do complexo H2 nas principais linhagens isogênicas - São Paulo - 2012

Linhagem	Haplotipo H2	Linhagem	Haplotipo H2	Linhagem	Haplotipo H2
A	a	C57BL/10	b	FVB	q
AKR	k	C58	k	NZB	d
BALB/c	d	C3H	k	NZW	z
CBA	k	DBA/1	q	SJL	s
C57BL/6	b	DBA/2	d	129	b

Fonte: Benavides e Guénet (2003)

Classicamente, os linfócitos Th1 (T auxiliar 1) são importantes na depuração de patógenos intracelulares, enquanto os linfócitos Th2 (T auxiliar 2) estão geralmente associados com as respostas às infecções parasitárias. A segregação dos linfócitos T CD4⁺ em células Th1 ou Th2 depende primariamente das citocinas liberadas por células apresentadoras de antígenos (APCs) que respondem aos agentes patogênicos por meio dos PRRS (SELLERS et al., 2012). Sabe-se que as linhagens de camundongos resistentes com os haplotipos H2^b e H2^k do complexo de histocompatibilidade principal, como o C57BL/6, C3H/HeJ e CBA/J tendem a exibir

predominantemente resposta Th1, caracterizada pela produção de citocinas como a interleucina (IL)-2, interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral beta (TNF- β), que estão associadas com a imunidade mediada por células. Além dessas citocinas, os linfócitos Th1 são responsáveis pela produção de IL-1, IL-6 e TNF- α . Em contraste, camundongos BALB/c, haplotipo H2^d, desenvolvem uma resposta imune predominantemente Th2, caracterizada pela produção de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 que está relacionada a produção de anticorpos (CARUSO et al., 1996; ALBER et al., 2000; DÖRRIES, 2001; SPELLBERG; EDWARDS 2001).

Considerando-se que mutações e recombinações relacionadas aos fatores de patogenicidade do EHV-1 tem sido extensivamente estudadas, pouco se conhece sobre as características genéticas em equinos que contribuam para a resistência ou susceptibilidade da EHM, pois tais elementos são muito difíceis de serem estudados no hospedeiro natural. Desta forma, o camundongo representa o modelo ideal para averiguar possíveis fatores genéticos do hospedeiro que influenciam na patogenia da doença.

Nesse sentido, levantamentos de literatura revelam uma série de publicações sobre o assunto. 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 à semelhança das lesões encontradas no cavalo. SMITH et al. (2005) relataram maior susceptibilidade a infecção pelo EHV-1 em camundongos CBA, quando comparados aos C57BL/6 ou BALB/c, sugerindo uma possível influência genética na resposta ao agente. No estudo realizado por nosso grupo de pesquisa (Apêndice), comprovou-se que camundongos das linhagens C3H/HeJ e C57BL/6, infectados com estirpes neuropatogênicas do EHV-1, mimetizam as lesões no SNC observadas em cavalos acometidos pela EHM (MORI et al., 2012).

1.5 RESPOSTA IMUNE NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O sistema imune intrínseco no SNC é composto basicamente por células da glia, ou seja microglia e astrócitos, as quais atuam na defesa inata contra agentes infecciosos, juntamente com os leucócitos periféricos ativados que migram para o tecido nervoso infectado. A microglia e os astrócitos ativados produzem e respondem a diversos mediadores imunes, incluindo citocinas e quimiocinas, fundamentais na harmonização da resposta imune local no SNC durante a inflamação, sendo capazes de participar tanto na defesa quanto causar danos ao tecido nervoso. Os astrócitos são o tipo celular mais abundante no SNC e são capazes de reagir a uma variedade de distúrbios como, por exemplo, as infecções virais, produzindo mediadores imunes. A microglia, ou seja, os macrófagos residentes do SNC, encontra-se distribuída por todo o parênquima cerebral, plexo coróide e meninges. Em seu estado de repouso, a microglia exibe uma morfologia ramificada; no entanto, essas células podem rapidamente assumir morfologia amebóide e migrarem para o local da lesão, em resposta a distúrbios do SNC, incluindo a invasão por agentes infecciosos (LOKENS GARD et al., 2002; KAUSHIK et al., 2011).

Embora as interações específicas entre as células da glia residentes e os linfócitos que infiltram o tecido nervoso infectado ainda não tenham sido bem definidas, a presença de fatores quimiotáticos para os linfócitos T em sobrenadantes de células da microglia, após a infecção pelo citomegalovírus humano (CMV) ou o herpesvírus simplex (HSV-1), direcionou os pesquisadores a inferirem que as quimiocinas são responsáveis por iniciar a cascata da resposta neuroimune, resultando na defesa do SNC contra as herpesvírozes (LOKENS GARD et al., 2002). Por sua vez, enquanto as quimiocinas desempenham um papel de defesa, atraindo as linfócitos T citotóxicos para o local da infecção, o acúmulo anormal desses linfócitos também pode induzir danos no tecido nervoso (DÖRRIES, 2001).

A CCL2 ou MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos 1) é uma das principais quimiocinas que atuam no processo inflamatório e no controle das infecções virais do SNC, sendo secretada pelos astrócitos e microglia em resposta a lesão tecidual e/ou infecção. De acordo com relatos de literatura, a CCL2 estimula a microglia aumentando a síntese de citocinas pró-inflamatórias (RANKINE et al.,

2006). Segundo os autores, camundongos deficientes em CCL2 apresentaram baixa expressão de IL-1 β e TNF- α no tecido nervoso em um modelo agudo de encefalite induzida por LPS (lipopolissacarídeo da membrana exterior de bactérias gram-negativas). Sabe-se que a CCL2 também está envolvida no recrutamento de monócitos, macrófagos e linfócitos ativados para o SNC e no aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica. A superexpressão de CCL2 em determinados tecidos pode causar infiltração localizada de monócitos e macrófagos (DESHMANE et al., 2009; YADAV et al., 2010).

Infecções virais no SNC podem causar encefalite, a qual muitas vezes está associada a convulsões, como observado por Mori et al. (2012) em camundongos infectados por estirpes neuropatogênicas do EHV-1. Provavelmente, a resposta imune inata a infecção viral contribuiu para o desenvolvimento dessas convulsões. Foi descrito que a microglia sofre ativação logo após a infecção do SNC, liberando citocinas pro-inflamatórias como o TNF- α e IL-6. A produção de IL-6 também é induzida por outras citocinas, incluindo TNF- α e IL-1. Por sua vez, as células inflamatórias que infiltram o SNC contribuem para o aumento da produção dessas citocinas, as quais atuam na modulação da homeostase do glutamato, regulando seus receptores e transportadores nos astrócitos. O controle deficiente das concentrações extracelulares de glutamato pelos astrócitos ativados pode resultar em níveis excessivos desse mediador químico ao redor dos neurônios; consequentemente, ocorre neuroexcitabilidade e dano neuronal levando à convulsões (KIRKMAN et al., 2010; LIBBEY et al., 2011).

O papel dos linfócitos T, em especial 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 no desenvolvimento da doença (DÖRRIES, 2001).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- 1) Estabelecer um modelo, em animal de laboratório, para o estudo da patogênese da mieloencefalopatia herpética equina (EHM) 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 herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Investigar a susceptibilidade das linhagens isogênicas de camundongos BALB/c (H2^d), BALB/c *nude* (H2^d), C57BL/6 (H2^b) e C3H/HeJ (H2^k), com diferentes haplotipos H2 do complexo de histocompatibilidade principal, frente à infecção viral pelo EHV-1.
- 2) Avaliar o papel dos linfócitos T, tanto na defesa do hospedeiro quanto no desencadeamento de danos ao tecido nervoso utilizando-se camundongos C57BL/6 *knockout* CD4 (CD4^{-/-}), C57BL/6 *knockout* CD8 (CD8^{-/-}) e BALB/c *nude* (atímicos), deficientes de linfócitos T funcionais, infectados pelo EHV-1.
- 3) Quantificar a expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α , IL-6) e da quimiocina MCP-1 (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 geneticamente modificados C57BL/6 *knockout* CD4 (CD4^{-/-}) e C57BL/6 *knockout* CD8 (CD8^{-/-}), infectados pelo EHV-1.

3. MATERIAIS E MÉTODOS: EXPERIMENTO 1

3.1 HERPESVÍRUS EQUINO TIPO I

As estirpes A4/72, A9/92 e A3/97 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 reação em cadeia da polimerase (PCR), e posterior sequenciamento nucleotídico do DNA do gene regulador transcricional (números de acesso no GenBank: EU094655 a EU094657). Além disso, as estirpes A4/72 e A3/97 foram caracterizadas por meio do sequenciamento do gene da enzima DNA polimerase (ORF30) do EHV-1, apresentando o genótipo não neuropatogênico (N₇₅₂) (números de acesso no GenBank: EU410444 e EU410445). 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) suplementado com 10% de soro fetal bovino, incubado a 37°C em câmara úmida com atmosfera de 5% de CO₂. As estirpes A9/92 e A3/97 do EHV-1 foram submetidas à no máximo três passagens *in vitro* e, consequentemente, classificadas como estirpes virais de baixa passagem. 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

Sessenta e quatro camundongos com oito semanas de idade, fêmeas, das linhagens BALB/c (H2^d), BALB/c *nude* (H2^d), C57BL/6 (H2^b) e C3H/HeJ (H2^k) foram provenientes do biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP). Os camundongos foram alojados no biotério do Laboratório de Raiva e Encefalites do Instituto Biológico de São Paulo, permanecendo em aclimação por uma semana antes do início dos experimentos. 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 grupos de 4 animais, em mini-isoladores de polisulfona medindo 20×32×21 cm (422 cm²), com canudos de papel dispostos dentro das gaiolas para o enriquecimento ambiental (Figura 1). 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 pelas comissões de ética no uso de animais (CEUA) do Instituto Biológico de São Paulo e da FMVZ/USP (número do protocolos: 18/05 e 70/08 CEUA IB; 2664/2012 e 2665/2012 CEUA FMVZ/USP).

As suspensões das estirpes virais A4/72, A9/92 e A3/97 do EHV-1 utilizadas para a infecção dos camundongos por via intranasal foram preparadas em EMEM para fornecer 25 µL de inóculo contendo 10³ TCID₅₀ (dose infectante 50% em cultura de tecidos) de cada vírus. Os camundongos foram anestesiados pela administração intraperitoneal de uma associação anestésica contendo 100mg/kg de quetamina (Dopalen®, Sespo Indústria e Comércio Ltda., Divisão Vetbrands Saúde Animal, Paulínia, SP) e 20mg/kg de cloridrato de xilazina (Anasedan®, Sespo Indústria e Comércio Ltda., Divisão Vetbrands Saúde Animal, Paulínia, SP) e foram inoculados por via intranasal com 25 µL da suspensão viral (Figura 2). Para cada vírus testado, 16 camundongos foram divididos em grupos de quatro animais de cada linhagem. Quatro camundongos adicionais de cada linhagem foram tratados de forma idêntica com EMEM e utilizados como controles (Quadro 4). Os camundongos foram avaliados duas vezes ao dia, até sete dias após a infecção (dpi), quando os experimentos foram encerrados. 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.

Quadro 4 - Distribuição dos camundongos BALB/c (H2^d), BALB/c *nude* (H2^d), C57BL/6 (H2^b) e C3H/HeJ (H2^k) nos grupos controle e inoculados por via intranasal com as estirpes A4/72, A9/92 e A3/97 do EHV-1 na dose infectante de 10³ DICT₅₀/25μL. São Paulo – 2009

Linhagens	Número de Animais			
	Controle	Inoculados		
		EHV/1 A4/72	EHV/1 A9/92	EHV/1 A3/97
BALB/c (H2 ^d)	4	4	4	4
BALB/c <i>nude</i> (H2 ^d)	4	4	4	4
C57BL/6 (H2 ^b)	4	4	4	4
C3H/HeJ (H2 ^k)	4	4	4	4

Figura 1 - Mini-isoladores de polisulfona medindo 20×32×21 cm (422 cm²) para alojamento dos camundongos (a) e enriquecimento ambiental utilizando canudos de papel (b) - São Paulo - 2009

Fonte: Mori, C.M.C. (2012)

Figura 2 - Inoculação por via intranasal com 25 µL da suspensão viral do EHV-1 das estirpes A4/72, A9/92, A3/97 ou EMEM. O procedimento foi realizado com o camundongo anestesiado dentro de cabine de segurança biológica classe II - São Paulo - 2009

Fonte: Mori, C.M.C. (2012)

3.3 PERFUSÃO TRANSCARDÍACA

Visando uma adequada preservação do tecido nervoso realizou-se a perfusão transcardíaca em dois camundongos do grupo controle e de cada grupo experimental, os quais tiveram seus órgãos internos (SNC, fígado, pulmão, baço, linfonodos e timo) destinados para o exame histopatológico e imunoistoquímica. Para tanto, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com a associação de quetamina e xilazina, conforme descrito no item 3.2. 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 (26G×½”), 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 3). 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 50mL de solução salina (NaCl) 0,9% 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 NaCl 0,9%) 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 à 10% como fixador. O sistema de perfusão contou com bomba peristáltica com velocidade regulável, específica para a perfusão de camundongos (MasterFlex - Cole-Parmer®).

Figura 3 - Perfusão transcardíaca utilizando a bomba peristáltica para perfusão de camundongos (MasterFlex - Cole-Parmer®) - São Paulo - 2009

Fonte: Mori, C.M.C. (2012)

Fonte: <http://www.coleparmer.com>

3.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA

Após a perfusão transcardíaca, amostras de tecido das vísceras e SNC foram coletadas e fixadas em formol a 10% por 24 horas. Posteriormente, fragmentos de aproximadamente 6mm dos tecidos fixados em formol foram processados pela desidratação em soluções alcoólicas com concentrações crescentes até o álcool absoluto, diafanização em banhos de xilol, banhos de parafina líquida e, finalmente,

inclusão em blocos de parafina. Os blocos foram submetidos à microtomia, sendo produzidos cortes de 5µm de espessura em lâminas de vidro. Utilizou-se a coloração por hematoxilina e eosina (HE).

Para a reação de imunoistoquímica (IHQ), os cortes de 5µm de espessura do cérebro e cerebelo foram desparafinizados em xilol e reidratados em gradações decrescentes de álcool até a água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito pela incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% em água destilada por 15 minutos em temperatura ambiente, sendo posteriormente lavadas em água destilada três vezes por dois minutos. A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato a 10mM (2,1g de ácido cítrico em 1 litro de água destilada, ajustando o pH em 6,0 com NaOH a 0,5%) por aquecimento em um forno de microondas (750 watts) por 12 minutos. Para diminuição das ligações inespecíficas realizou-se o bloqueio com leite desnatado (Molico®) 5% diluído em água destilada durante 15 minutos. Posteriormente, os cortes foram cobertos com solução contendo o anticorpo primário produzido em cabra específico para o EHV-1 (ERV/EHV-1, VMRD, Pullman, Washington, EUA) na diluição de um 1:2000 em PBS e incubados em câmara úmida por 12 a 14 horas (*overnight*) a 4°C. Após o período de incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas em água destilada e incubadas com o anticorpo secundário biotinilado anti-coelho, anti-camundongo e anti-cabra (DAKO LSAB + Kit, HRP, K0679, DakoCytomation, Carpinteria, Califórnia, EUA) por 30 minutos em câmara úmida e temperatura ambiente. Em seguida, essas lâminas foram lavadas em água destilada e incubadas com o conjugado estreptavidina-biotina (DakoCytomation, Carpinteria, Califórnia, EUA) por mais 30 minutos em câmara úmida e temperatura ambiente, sendo lavadas novamente em água destilada. A revelação foi realizada pela exposição ao cromógeno 3, 3'-diaminobenzidina (DAB), observando-se a coloração. Após a exposição ao cromógeno, as lâminas foram lavadas em água destilada e contra coradas com hematoxilina de Mayer por 2 minutos. Finalmente, as lâminas foram lavadas em água corrente por 1 a 2 minutos e os cortes foram desidratados em gradações crescentes de álcool e diafanizados em xilol. As lâminas foram montadas com lamínula de vidro utilizando resina sintética.

3.5 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO VIRAL

Para confirmar a presença do agente etiológico, o isolamento viral foi realizado a partir de amostras de tecido dos pulmões, timo, fígado, baço e SNC, coletadas durante a necropsia de dois camundongos por grupo, no 3º dpi, conforme descrito por Lara et al. (2008). As amostras foram cortadas em fragmentos de 1 mm³ e imediatamente após a remoção foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C. Homogeneizados de tecidos congelados foram preparados por maceração e diluídos a 20% peso/volume em EMEM sem a adição de soro. Após centrifugação (1200×g por 10 minutos), o sobrenadante foi removido e um volume de 1 mL foi inoculado em monocamadas de células E-Dermal a 37°C por 1 hora. No final do período de adesão, as monocamadas de células foram lavadas, re-alimentadas com 6 mL de EMEM contendo 5% de soro fetal bovino e incubadas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Os cultivos celulares foram examinados diariamente por sete dias, procurando sinais de efeito citopático (ECP) característico do herpesvirus, ou seja, células arredondadas, aumento da refração, desprendimento de células, presença de agregados citoplasmáticos semelhantes a cachos de uva e formação de sincícios. Uma passagem foi usada rotineiramente para todas as amostras e passagens adicionais (máximo de três) foram utilizadas quando o isolamento primário foi negativo. Ausência de ECP após três passagens nestas culturas foi interpretada como um isolamento negativo. Quando estas células apresentaram ECP, a identificação dos isolados foi realizada pela PCR usando um par de *primers* específicos (senso 5'-ACGCCCCCTTCGTTCCTC-3' e anti-senso 5'-CGCTCCACCTCGGTCCTG-3') derivados da região do gene da ORF64 do EHV-1, que amplificam um fragmento de DNA com 410 pares de bases (pb) (BORCHERS et al., 1999).

A extração de DNA das amostras de cultura foi conduzida conforme descrito por (CHOMCZYNSKI et al., 1993). A reação de amplificação foi realizada em uma mistura de 50 µL contendo 0,5 mg de amostra de DNA, 0,5 mM de cada *primer*, 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo (dNTP), 2,5 unidades de Taq DNA polimerase Platinum. (LifeTechnologies, Brasil), tampão de PCR 1× (20 mM de Tris-HCl pH 8,4, 50 mM de KCl), 1,5 mM de MgCl₂ e água ultra-pura QS.

A amplificação foi realizada em um termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) nas seguintes condições: o fragmento de DNA foi inicialmente desnaturado a 94°C por 4 minutos, seguido por 35 ciclos com 30 segundos de desnaturação a 94°C, 1 minuto de anelamento dos *primers* a 56°C e 2 minutos de extensão a 72°C. Finalmente, a reação foi concluída com uma etapa de extensão final por 10 minutos a 72°C. Os produtos amplificados da PCR foram analisados por eletroforese horizontal (100 Volts por 25 minutos) em gel de agarose 1,5% corado pelo brometo de etídio 0,5 mg/mL e visualizados sob luz ultravioleta.

3.6 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. Cada variável foi testada para normalidade, aplicando o método de Kolmogorov e Smirnov. A diferença nos valores médios de ganho de peso foi comparada utilizando a análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste múltiplo de comparação Tukey-Kramer. O nível de significância estatística foi estabelecido em $p < 0,05$.

4. RESULTADOS: EXPERIMENTO 1

4.1 SINAIS CLÍNICOS

A inoculação por via intranasal das estirpes A4/72 e A9/92 causou manifestações clínicas semelhantes nos camundongos BALB/c, BALB/c nude, C57BL/6 e C3H/HeJ, observando-se apenas discretas variações no aparecimento dos primeiros sintomas e na evolução da doença de acordo com a linhagem dos camundongos. No primeiro dia pós-inoculação (dpi), observou-se apenas perda de peso em todos os camundongos inoculados com as estirpes A4/72 e A9/92, com diferença significativa ($p < 0,001$) quando comparados com os controles (Figura 4). Já com 48 horas pós-inoculação, além da perda de peso com diferença significativa ($p < 0,001$) quando comparados com os controles e com os camundongos inoculados com a estirpe A3/97, foi possível observar o aparecimento dos primeiros sinais clínicos da doença nos camundongos das linhagens BALB/c e BALB/c nude inoculados com as estirpes A4/72 e A9/92, tais como: apatia, hipofagia e falta de interesse pelos atrativos dispostos nas gaiolas. Os camundongos das linhagens C57BL/6 e C3H/HeJ apresentaram somente perda de peso, sem qualquer tipo de alteração comportamental. Após 60 horas da inoculação viral, os camundongos BALB/c apresentaram acentuada perda de peso, pêlos arrepiados, diminuição dos reflexos, tremores, apatia intensa, olhar fixo para um único ponto (normalmente a parede lateral da gaiola), diminuição da propriocepção e anorexia. As alterações respiratórias como dispneia e taquipneia foram bastante pronunciadas nos camundongos BALB/c e BALB/c nude. Os camundongos C57BL/6 e C3H/HeJ apresentaram perda de peso, apatia discreta e pêlos arrepiados. No terceiro d.p.i, todos os camundongos inoculados das quatro linhagens tiveram os sintomas agravados apresentando apatia intensa, postura arqueada, fraqueza, conjuntivite seropurulenta, desidratação, sialorréia, decúbito lateral e morte. Observaram-se também manifestações neurológicas caracterizadas por hiperexcitabilidade em resposta aos estímulos sonoros, andar em círculos, perda da propriocepção, ataxia, perda de equilíbrio e convulsões. Os camundongos das linhagens C57BL/6 e C3H/HeJ, além das alterações neurológicas descritas, também exibiram paralisia espástica dos membros posteriores e da cauda (Tabela 1 e Figura 5).

Os camundongos BALB/c, C57BL/6 e C3H/HeJ inoculados pela via intranasal com a estirpe A3/97 do EHV-1 não apresentaram perda de peso ou sinais clínicos

aparentes da doença. Já a linhagem de camundongos imunodeficientes (BALB/c nude) apresentou conjuntivite entre o 3º e 4º dpi (Figura 6).

As análises estatísticas não mostraram diferenças significativas na perda de peso entre os camundongos das linhagens BALB/c, BALB/c *nude*, C57BL/6 e C3H/HeJ infectados com as diferentes estirpes do EHV-1 (Figuras 7 e 8). No 3º dpi, os camundongos inoculados com as estirpes A4/72 e A9/92 EHV-1 mostraram perda de peso significativa ($p < 0,001$) quando comparados com o grupo controle e com aqueles infectados com a estirpe A3/97 do EHV-1 (Figura 9).

Figura 4 - Peso médio dos camundongos das quatro linhagens isogênicas (BALB/c, BALB/c *nude*, C57BL/6 e C3H/HeJ) infectados com as estirpes A4/72, A9/92 e A3/97 do EHV-1, comparados ao grupo controle - São Paulo - 2009

* $p < 0,001$ versus controle; • $P < 0,001$ versus A3/97.

Fonte: Mori, C.M.C. (2012)

Tabela 1 - Manifestações clínicas da infecção pelas estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 em camundongos das linhagens BALB/c, BALB/c nude, C57BL/6 e C3H/HeJ - São Paulo - 2009

		BALB/c			BALB/c nude			C57BL/6			C3H/HeJ		
		24h*	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
EHV-1 A4/72	Perda de Peso (%)	1,1	5,2	18,8	0,5	0,1	18,6	4,3	6,9	21,5	3,0	2,6	18,8
	Apatia	0	+1	+3	0	+1	+3	0	0	+2	0	0	+2
	Pelos arrepiados	0	+1	+3	0	–	–	0	0	+1	0	0	+1
	Postura arqueada	0	+1	+3	0	+1	+2	0	0	+1	0	0	+1
	Sintomas respiratórios	0	+1	+2	0	0	+2	0	0	+1	0	0	+1
	Sintomas neurológicos	0	+1	+2	0	+1	+2	0	+1	+3	0	+1	+3
EHV-1 A9/92	Perda de Peso (%)	3,7	4,0	19,6	1,8	1,7	19,7	4,6	5,1	21,8	4,5	3,0	20,8
	Apatia	0	+1	+3	0	+1	+3	0	0	+2	0	0	+2
	Pelos arrepiados	0	+1	+3	0	–	–	0	0	+1	0	0	+1
	Postura arqueada	0	+1	+3	0	+1	+2	0	0	+1	0	0	+1
	Sintomas respiratórios	0	+1	+2	0	0	+2	0	0	+1	0	0	+1
	Sintomas neurológicos	0	+1	+2	0	+1	+2	0	+1	+3	0	+1	+3

* 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 taquipnéia e dispnéia leves; + 2 taquipnéia e dispnéia 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 5 - Camundongos infectados com as estirpes neuropatogênicas A4/72 e A9/92 do EHV-1 no 3º dpi - São Paulo – 2009

Fonte: Mori, C.M.C. (2012)

Fonte: Mori, C.M.C. (2012)

- a Observa-se que os camundongos BALB/c apresentaram pêlos arrepiados, postura arqueada e permaneciam encolhidos nos cantos da gaiola
- b Camundongo BALB/c nude apresentando sinais de apatia e postura arqueada
- c e d Os camundongos C57BL/6 e C3H/HeJ apresentaram paralisia espástica dos membros posteriores e da cauda

Figura 6 - Camundongo BALB/c nude infectado com a estirpe A3/97 do EHV-1 no 3º dpi apresentando conjuntivite - São Paulo - 2009

Fonte: Mori, C.M.C. (2012)

Figura 7 - Ganho de peso (média $\pm$ desvio padrão) das diferentes linhagens de camundongos (BALB/c, BALB/c nude, C57BL/6 e C3H/HeJ) infectados com a estirpe A3/97 do EHV-1 no 3º dpi - São Paulo - 2009.

Fonte: Mori, C.M.C. (2012)

Figura 8 - Ganho de peso (média $\pm$ desvio padrão) das diferentes linhagens de camundongos (BALB/c, BALB/c nude, C57BL/6 e C3H/HeJ) infectados com as estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 no 3º dpi - São Paulo – 2009

Fonte: Mori, C.M.C. (2012)

Figura 9 - Ganho de peso (média $\pm$ desvio padrão) de camundongos das quatro linhagens isogênicas (BALB/c, BALB/c nude, C57BL/6 e C3H/HeJ) infectados com as estirpes A4/72, A9/92 e A3/97 do EHV-1 no 3º dpi, comparados ao grupo controle - São Paulo - 2009

• $p < 0,001$ versus controle; * $p < 0,001$ versus A3/97.

Fonte: Mori, C.M.C. (2012)

4.2 ISOLAMENTO VIRAL E IDENTIFICAÇÃO DO EHV-1

O vírus foi isolado de forma consistente a partir do SNC e das vísceras (ou seja, pulmões, fígado, timo e baço) de todos os camundongos com sinais neurológicos no 3º dpi, inoculados com as estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 (Tabela 2). Observou-se efeito citopático (ECP) característico do EHV-1, com a formação de sincícios semelhantes a cachos de uva, no período entre 24 e 72 horas após a inoculação da suspensão dos órgãos macerados em cultura de células E-dermal (Figura 10). Nas amostras de tecido nervoso o ECP foi observado nas primeiras 24 horas após a inoculação.

Por sua vez, apenas as amostras de tecido pulmonar dos camundongos BALB/c, C57BL/6 e C3H/HeJ inoculados pela via intranasal com a estirpe A3/97 do EHV-1 apresentaram ECP com até 72 horas após a inoculação em células E-dermal. As demais amostras de tecido, ou seja, fígado, baço, timo e encéfalo, não apresentaram esta característica, sendo consideradas negativas no isolamento viral. O vírus foi recuperado dos pulmões, SNC e baço dos camundongos BALB/c nude no 3º. dpi com a estirpe A3/97 do EHV-1 (Tabela 2).

A identidade viral dos isolamentos positivos foi confirmada pela amplificação de fragmentos de DNA com 410 pb pela PCR, que correspondem a região selecionada do gene ORF64 do EHV-1.

Figura 10 - (a) Cultivo de células E-Dermal antes da inoculação viral. (b) Cultivo de células E-Dermal 48 horas após a inoculação das amostras de tecido dos camundongos infectados pelo EHV-1, mostrando células arredondadas, aumento da refração, desprendimento de células, presença de agregados citoplasmáticos semelhantes a cachos de uva e formação de sincícios. (c) Identificação viral pela PCR: amplicons (410 pares de bases [bp]), que correspondem ao gene ORF64 visualizado em gel de agarose corado pelo brometo de etídio. Amostras: EHV-1 A3/97 (coluna 1), EHV-1 A9/92 (coluna 2), EHV-1 A4/72 (coluna 3) e um marcador de 100 pb (M) (coluna 4) - São Paulo - 2009

Fonte: Mori, C.M.C. (2012)

Tabela 2 - Isolamento viral a partir de amostras de tecido dos camundongos infectados com as estirpes A4/72, A9/92 e A3/97 do EHV-1 no 3º dpi - São Paulo - 2009

EHV-1	Linhagem	Pulmão	Fígado	Baço	Timo	SNC	Sintomas Neurológicos
A4/72	BALB/c	2/2*	2/2	2/2	2/2	2/2	Severo
	BALB/c nude	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	Severo
	C57BL/6	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	Severo
	C3H/HeJ	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	Severo
A9/92	BALB/c	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	Severo
	BALB/c nude	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	Severo
	C57BL/6	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	Severo
	C3H/HeJ	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	Severo
A3/97	BALB/c	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	Ausente
	BALB/c nude	2/2	0/0	1/2	0/0	1/2	Ausente
	C57BL/6	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	Ausente
	C3H/HeJ	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	Ausente

* Número de positivos/número total de camundongos observados

4.3 EXAMES ANÁTOMO E HISTOPATOLÓGICOS

No exame macroscópico os camundongos infectados com as estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 apresentaram congestão e hemorragia no cérebro e nas meninges. Outros achados de necropsia incluíram discreto aumento do baço e dos linfonodos cervicais e mesentéricos, edema pulmonar e atrofia do timo. As alterações microscópicas no SNC consistiram de leptomeningite, hemorragia focal, trombose, ventriculite, degeneração neuronal, bem como necrose, neuronofagia, inflamação não-supurativa do neurópilo e gliose multifocal. Além disso, observou-se infiltrado perivascular de células mononucleares e polimorfonucleares no encéfalo dos camundongos infectados (Figuras 11, 12 e 13). Os camundongos das linhagens C3H/HeJ e C57BL/6 apresentaram lesões mais exacerbadas no tecido nervoso, como intensa vacuolização e necrose dos neurônios no hipocampo e focos de malácia no bulbo olfatório, quando comparados com as demais linhagens desafiadas.

Nos pulmões dos camundongos infectados com as estirpes A4/72, A9/92 e A3/97 do EHV-1, observou-se alterações microscópicas tais como hipertrofia do septo alveolar, erosão do epitélio bronquiolar, hemorragia e infiltrado inflamatório no interstício por linfócitos, neutrófilos e macrófagos (Figura 14).

Não foram observadas alterações macroscópicas ou microscópicas no SNC e outros órgãos, incluindo fígado, baço e timo dos camundongos inoculados com a estirpe A3/97 do EHV-1.

Figura 11 - Cortes histológicos de encéfalo representativos dos camundongos infectados com as estirpes neuropatogênicas A4/72 e A9/92 do EHV-1 no 3º dpi, corados por hematoxilina-eosina - São Paulo - 2009

Fonte: Mori, C.M.C. (2012)

- a leptomeningite com infiltração perivascular de células polimorfonucleares e mononucleares
- b gliose focal

Figura 12 - Cortes histológicos de encéfalo representativos dos camundongos infectados com as estirpes neuropatogênicas A4/72 e A9/92 do EHV-1 no 3º dpi, corados por hematoxilina-eosina - São Paulo - 2009

Fonte: Mori, C.M.C. (2012)

- a neuronofagia com degeneração neuronal e necrose
- b manguito perivascular

Figura 13 - Cortes histológicos de encéfalo representativos dos camundongos infectados com as estirpes neuropatogênicas A4/72 e A9/92 do EHV-1 no 3º dpi, corados por hematoxilina-eosina - São Paulo - 2009

Fonte: Mori, C.M.C. (2012)

- a hemorragia perivascular
- b trombo hialino

Figura 14 - Cortes histológicos de pulmão representativos dos camundongos infectados com as estirpes A4/72, A9/92 e A3/97 do EHV-1 no 3º dpi, corados por hematoxilina-eosina - São Paulo - 2009

Fonte: Mori, C.M.C. (2012)

a grupo controle sem alterações microscópicas

b e c hipertrofia do septo alveolar, infiltrado inflamatório peribronquiolar e erosão do epitélio bronquiolar

4.4 IMUNOISTOQUÍMICA

Os antígenos virais não foram detectados pela imunoistoquímica no SNC dos camundongos dos grupos controle e dos inoculados com a estirpe A3/97 do EHV-1, utilizando o anticorpo policlonal ERV/EHV-1. Por sua vez, o EHV-1 foi detectado no encéfalo dos camundongos infectados com as estirpes neuropatogênicas A4/72 e A9/92 do EHV-1. Os antígenos virais foram identificados com maior frequência no bulbo olfatório e hipocampo, infectando os diversos tipos celulares, localizados principalmente no citoplasma, mas também observou-se antígenos intranucleares em algumas células (Figura 15).

Figura 15 - Marcação imunoistoquímica com o anticorpo anti-ERV/EHV-1 no encéfalo de camundongos infectados com as estirpes neuropatogênicas A4/72 e A9/92 do EHV-1 - São Paulo - 2009

Fonte: Mori, C.M.C. (2012)

- a células marcadas no bulbo olfatório
- b células marcadas no hipocampo

5. MATERIAIS E MÉTODOS: EXPERIMENTO 2

5.1 HERPESVÍRUS EQUINO TIPO 1

A partir dos resultados obtidos no experimento 1, a estirpe neuropatogênica A9/92 do EHV-1 foi escolhida para o desafio viral dos camundongos no experimento 2. O isolado viral foi cultivado conforme descrito no item 3.1 (experimento 1).

5.2 CAMUNDONGOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Quarenta e quatro camundongos com oito semanas de idade, fêmeas, das linhagens isogênicas BALB/c(H2^d) e C57BL/6 (H2^b) e geneticamente modificados - C57BL/6 *knockout* CD4 (CD4^{-/-}) e C57BL/6 *knockout* CD8 (CD8^{-/-}) - foram provenientes do Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e do Biotério de Camundongos Isogênicos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, respectivamente. As condições de alojamento e manejo dos animais foram idênticas às do experimento 1, sendo que os experimentos foram realizados no Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ/USP.

Nove camundongos de cada linhagem foram anestesiados em cuba saturada com isoflurano (Isoforine®, Cristália, Itapira, SP) e inoculados por via intranasal com 25µL de meio EMEM de Eagle contendo a suspensão de vírus com a estirpe neuropatogênica A9/92 do EHV-1 na dose infectante de 10³ DICT₅₀/25µL. Os grupos controle foram determinados de acordo com o fundo genético dos camundongos, ou seja, quatro camundongos BALB/c foram utilizados como controle dos animais inoculados da mesma linhagem e outros quatro camundongos C57BL/6 serviram de controle para os animais inoculados com o mesmo fundo genético: C57BL/6, CD4^{-/-} e CD8^{-/-}. Todos os animais dos grupos controle foram submetidos à procedimentos idênticos daqueles dos grupos inoculados e receberam 25 µL do meio de cultura EMEM estéril (Quadro 5).

Quadro 5 - Número de camundongos inoculados por via intranasal com o a estirpe neuropatogênica A9/92 do EHV-1 na dose infectante de 10^3 DICT₅₀/25 μ L - São Paulo – 2011 e 2012

Linhagens	Número de Animais		
	Controle	Inoculados	
		EHV/1 A9/92 (2dpi)	EHV/1 A9/92 (3dpi)
BALB/c	4	5	4
C57BL/6	4*	5	4
C57BL/6 CD4 ^{-/-}	–	5	4
C57BL/6 CD8 ^{-/-}	–	5	4

* Os camundongos da linhagem C57BL/6 foram utilizados com controle para os CD4^{-/-} e CD8^{-/-} com o mesmo fundo genético.

5.3 COLETA DO ENCÉFALO PARA RT-PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL

De acordo com o delineamento experimental, os camundongos foram anestesiados em cuba saturada com isoflurano (Isoforine®, 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 dias pós inoculação. No 3º dpi, os camundongos foram eutanasiados 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 foram imediatamente congeladas em vapor de nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C para posterior processamento.

5.4 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINA NO PLASMA

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. A dosagem de citocinas e quimiocina no plasma foi realizada utilizando-se o CBA mouse inflammation kit (Cytometric Bead Array – CBA, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) para a quantificação de IL-6, IL-10, MCP-1 (CCL2), IFN-γ, TNF-α e IL-12p70, conforme instruções do fabricante. Em resumo, o plasma e os padrões de citocinas e quimiocina do CBA mouse inflammation kit foram incubados com microesferas de captura recobertas com anticorpos específicos para as respectivas citocinas/quimiocina e com o anticorpo de detecção marcado com o fluorocromo ficoeritrina (PE). Após os períodos de incubação, os tubos contendo os padrões e as mostras foram centrifugados a 250×g por 5 minutos, lavados, centrifugados novamente e ressuspensos para leitura em citômetro de fluxo (FACScalibur Immunocytometry System, San Jose, Ca, USA) e determinação da intensidade de fluorescência de PE (detector FL3). Nesse experimento, que teve como objetivo identificar as citocinas que seriam quantificadas pela expressão gênica, avaliou-se apenas as amostras de plasma provenientes dos camundongos da linhagem BALB/c infectados pela estirpe A9/92 do EHV-1 no 2º dpi.

5.5 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 16).

A extração de RNA de aproximadamente 30mg de tecido nervoso foi realizada utilizando-se o *RNAspin Mini RNA isolation Kit* (GE Healthcare, UK), seguindo o protocolo determinado pelo fabricante (Figura 17). 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 16 - Gral e pistilo utilizados para macerar os encéfalos dos camundongos, congelados em vapor de nitrogênio, para extração de RNA - São Paulo – 2011 e 2012

Fonte: Mori, C.M.C. (2012)

Figura 17 - Representação esquemática das etapas de extração de RNA total a partir de amostras de encéfalos dos camundongos dos grupos controle e inoculados com a estirpe A9/92 do EHV-1, utilizando o kit RNAspin Mini RNA isolation (GE HealthCare) - São Paulo – 2012

Fonte dos dados brutos: Manual do kit RNAspin Mini RNA isolation (GE HealthCare), disponível em: http://www.gelifesciences.co.jp/tech_support/manual/pdf/rnaspin_e_mini.pdf

5.6 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 (diethylpyrocarbonate) q.s.p 14 µL. Essa mistura foi aquecida em 65°C por cinco minutos em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) e depois mantida em gelo por, pelo menos, dois minutos. Em seguida, foram adicionados ao tubo de 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 de 1 µL (2 unidades) de enzima RNase H (para eliminar resíduos de RNA no cDNA), e o cDNA armazenado em freezer –20°C.

5.7 EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS E QUIMIOCINA PRÓ-INFLAMATÓRIAS

Mensurou-se a expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias e quimiocina IL-6, IFN-γ, TNF-α e CCL2 no SNC dos camundongos infectados com a estirpe A9/92 do EHV-1, nos 2º e 3º dpi, por transcrição reversa seguida pela reação de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) em placas com 48 poços (*MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate*, Applied Biosystems, USA) no aparelho *StepOne™ Real-Time PCR System, version 2.2* (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 *reporter*

(Applied Biosystems) para IL-6 (Mm00446190_m1), IFN- γ (Mm01168134_m1), TNF- α (Mm00443258_m1) e CCL2 (Mm00441242_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 6). 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 18).

A reação foi realizada em um volume final de 20 μ L contendo 10 μ L do tampão TaqMan® Universal Master Mix 2 $\times$ (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 minutos a 60°C para anelamento e extensão.

A quantificação relativa da expressão do RNA mensageiro (mRNA) para IL-6, IFN- 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:

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

Em seguida, os valores de $\Delta\Delta Ct$ foram transformados em escala logarítmica ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) com a finalidade 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:

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

Quadro 6 - Assays [Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) senso e anti-senso 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 – 2011 e 2012

Genes	Assays ID
MCP-1 ou CCL2	Mm00441242_m1
IL-6	Mm00446190_m1
TNF- α	Mm00443258_m1
IFN- γ	Mm01168134_m1
18S rRNA	Hs99999901_s1

Figura 18 - Representação esquemática do princípio de funcionamento da PCR quantitativa em tempo real utilizando sonda Taqman® tipo MGB. Uma sonda de fita simples marcada com duas moléculas, uma fluorescente ligada na extremidade 5' da sonda (FAM ou VIC) e a outra não fluorescente na extremidade 3'-terminal (quencher), é adicionada à reação de PCR. A sonda é clivada na extremidade 5' devido à atividade de exonuclease da enzima Taq DNA polimerase separando as moléculas quando sintetiza a fita nova. A fluorescência da molécula reporter é detectada pelo sistema óptico do equipamento de PCR em tempo real - São Paulo – 2012

Fonte: Mori, C.M.C. (2012)

5.8 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 (quantificação de citocinas e quimiocina no plasma) e valor de mediana $\pm$ erro padrão (expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , TNF- α , IL-6 e da quimiocina CCL2).

A diferença nos valores médios foi comparada utilizando 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 $P < 0,05$.

Já a diferença nas medianas 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 $P < 0,05$.

6. RESULTADOS: EXPERIMENTO 2

6.1 SINAIS CLÍNICOS

As manifestações clínicas e neurológicas da meningoencefalite aguda nos camundongos BALB/c, C57BL/6, CD4^{-/-} e CD8^{-/-}, que apareceram entre o segundo e terceiro dias após a inoculação intranasal com a estirpe neuropatogênica A9/92 do EHV-1, foram idênticas às aquelas descritas no item 4.1 do experimento 1 (Tabela 3)

Tabela 3 - Manifestações clínicas da infecção pela estirpe A9/92 do EHV-1 em camundongos das linhagens BALB/c, C57BL/6, CD4^{-/-} e CD8^{-/-} - São Paulo – 2011 e 2012

		BALB/c			C57BL/6			CD4 ^{-/-}			CD8 ^{-/-}		
		24h*	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
EHV-1 A9/92	Perda de Peso (%)	2,1	8,3	20,3	3,1	8,5	20,5	3,4	7,3	18,1	1,3	5,7	17,5
	Apatia	0	+1	+3	0	0	+2	0	0	+2	0	0	+2
	Pelos arrepiados	0	+1	+3	0	0	+1	0	0	+1	0	0	+1
	Postura arqueada	0	+1	+3	0	0	+1	0	0	+1	0	0	+1
	Sintomas respiratórios	0	+1	+2	0	0	+1	0	0	+1	0	0	+1
	Sintomas neurológicos	0	+1	+2	0	+1	+3	0	0	+2/3	0	+1	+3

* 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 taquipnéia e dispnéia leves; + 2 taquipnéia e dispnéia 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

6.2 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINA NO PLASMA

Observou-se aumento significativo na concentração da quimiocina CCL2 no plasma dos camundongos BALB/c infectados com a estirpe A9/92 do EHV-1 no 2º dpi ($p < 0,001$). Apesar de não haver diferença estatística, os valores médios (pg/mL) de TNF- α , IFN- γ e IL-6 no plasma dos camundongos infectados estavam aumentados quando comparados ao controle (Figura 19). A partir desses resultados, determinou-se avaliar a expressão gênica de TNF- α , IFN- γ , IL-6 e CCL-2 no encéfalo dos camundongos BALB/c, C57BL/6, CD4-/- e CD8-/- infectados com a estirpe neuropatogênica A9/92 do EHV-1.

Figura 19 - Concentrações em pg/mL (média $\pm$ desvio padrão) de IL-6, IL-10, CCL2, IFN- γ , TNF- α e IL-12p70 no plasma de camundongos BALB/c no 2º dia pós-infecção com a estirpe A9/92 do EHV-1, comparadas ao grupo controle - São Paulo – 2011 e 2012

Fonte: Mori, C.M.C. (2012)

* $p < 0,01$

6.3 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 a estirpe neuropatogênica A9/92 do EHV-1, no 2º e 3º dpi, em relação aos controles. Por sua vez, não foram observadas diferenças na 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 CCL-2 foram menores nos camundongos da linhagem BALB/c quando comparados aos camundongos com fundo genético C57BL/6, ou seja, C57BL/6, CD4-/- e CD8-/-.

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, observando-se diferenças significantes entre os camundongos C57BL/6 (IL6, aumento de 1.400 vezes; CCL-2, aumento de 20 mil vezes em relação ao controle), CD4-/- (IL6, aumento de 1.500 vezes; CCL-2, aumento de 16 mil vezes em relação ao controle) e CD8-/- (IL6, aumento de 3.000 vezes; CCL-2, aumento de 32 mil vezes em relação ao controle) no 3º dpi quando comparados aos camundongos BALB/c no 2º dpi (CCL-2, aumento de 4 vezes em relação ao controle; IL-6 não houve aumento em relação ao controle). Ainda referente à expressão de IL-6 e CCL-2 no 3º dpi, os camundongos CD8-/- apresentaram os maiores valores relativos, porém observou-se diferença significativa somente quando comparados aos BALB/c (IL6, aumento de 12 vezes; CCL-2, aumento de 100 vezes), conforme pode ser observado na tabela 4 e figuras 20 e 21.

O aumento na expressão de mRNA para TNF- α foi semelhante nos camundongos C57BL/6 (600 vezes maior no 2º dpi e 1.600 vezes maior no 3º dpi), CD4-/- (aproximadamente 1.400 vezes maior no 2º e 3º dpi) e CD8-/- (aproximadamente 1.900 vezes no 2º e 3º dpi), entretanto observou-se diferença estatística somente na comparação entre os camundongos CD8-/- no 2º e 3º dpi e os camundongos BALB/c no 2º dpi (Tabela 4 e Figura 22).

Tabela 4 - 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 a estirpe neuropatogênica A9/92 do EHV-1, calculada pelo método $\Delta\Delta Ct$. Os valores relativos foram expressos em mediana $\pm$ erro padrão - São Paulo – 2011 e 2012

Linhagem	dpi	Valores Relativos			Sintoma Neurológico
		CCL-2	TNF- α	IL-6	
BALB/c	2	3,95 $\pm 2,30$	0,72 $\pm 0,13$	0,29 $\pm 0,11$	Ausente
	3	104,90 $\pm 24,60$	3,41 $\pm 1,03$	12,67 $\pm 68,80$	Severo
C57BL/6	2	3.815,06 $\pm 1.311,60$	578,02 $\pm 152,66$	207,41 $\pm 65,97$	Ausente
	3	19.903,16** $\pm 2.095,80$	1.586,03 $\pm 247,60$	1.441,79* $\pm 285,01$	Severo
CD4-/-	2	4.164,16 $\pm 1.323,20$	1.425,40 $\pm 582,41$	723,21 $\pm 221,62$	Ausente
	3	16.548,76* $\pm 2.255,40$	1.459,51 $\pm 270,04$	1.519,58** $\pm 501,13$	Severo
CD8-/-	2	7.462,28 $\pm 2.845,00$	1.837,68** $\pm 713,62$	540,42 $\pm 200,81$	Ausente
	3	32.213,01*** • $\pm 2.861,40$	1.925,07* $\pm 195,73$	3.273,89*** • $\pm 530,91$	Severo

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

* $p < 0,05$ - CCL2: BALB/c 2dpi $\times$ CD4-/- 3dpi; IL-6: BALB/c 2dpi $\times$ C57BL/6 3dpi; TNF- α : BALB/c 2dpi $\times$ CD8-/- 3dpi

** $p < 0,01$ - CCL2: BALB/c 2dpi $\times$ C57BL/6 3dpi; IL-6: BALB/c 2dpi $\times$ CD4-/- 3dpi; TNF- α : BALB/c 2dpi $\times$ CD8-/- 2dpi

*** $p < 0,001$ - CCL2 e IL-6: BALB/c 2dpi $\times$ CD8-/- 3dpi

• $p < 0,05$ - CCL2 e IL-6: BALB/c 3dpi $\times$ CD8-/- 3dpi

Figura 20 - Variação em número de vezes da expressão gênica da quimiocina CCL2 no SNC dos camundongos de diferentes linhagens inoculados com a estirpe neuropatogênica A9/92 do EHV-1, calculada pelo método $\Delta\Delta Ct$. Os valores relativos (mediana $\pm$ erro padrão) representam o número de vezes que a expressão de mRNA no SNC dos camundongos infectados está aumentada em relação ao controle - São Paulo – 2011 e 2012

Fonte: Mori, C.M.C. (2012)

- * $p < 0,05$ - BALB/c 2dpi $\times$ CD4-/- 3dpi;
- ** $p < 0,01$ - BALB/c 2dpi $\times$ C57BL/6 3dpi;
- *** $p < 0,001$ - BALB/c 2dpi $\times$ CD8-/- 3dpi
- $p < 0,05$ - BALB/c 3dpi $\times$ CD8-/- 3dpi

Figura 21 - Variação em número de vezes da expressão gênica de IL-6 no SNC dos camundongos de diferentes linhagens inoculados com a estirpe neuropatogênica A9/92 do EHV-1, calculada pelo método $\Delta\Delta Ct$. Os valores relativos (mediana $\pm$ erro padrão) representam o número de vezes que a expressão de mRNA no SNC dos camundongos infectados está aumentada em relação ao controle - São Paulo – 2011 e 2012

Fonte: Mori, C.M.C. (2012)

* $p < 0,05$ - BALB/c 2dpi $\times$ C57BL/6 3dpi

** $p < 0,01$ - BALB/c 2dpi $\times$ CD4-/- 3dpi

*** $p < 0,001$ - BALB/c 2dpi $\times$ CD8-/- 3dpi

• $p < 0,05$ - BALB/c 3dpi $\times$ CD8-/- 3dpi

Figura 22 - Variação em número de vezes da expressão gênica de TNF- α no SNC dos camundongos de diferentes linhagens inoculados com a estirpe neuropatogênica A9/92 do EHV-1, calculada pelo método $\Delta\Delta Ct$. Os valores relativos (mediana $\pm$ erro padrão) representam o número de vezes que a expressão de mRNA no SNC dos camundongos infectados está aumentada em relação ao controle - São Paulo – 2011 e 2012

Fonte: Mori, C.M.C. (2012)

* $p < 0,05$ - BALB/c 2dpi $\times$ CD8-/- 3dpi

** $p < 0,01$ - BALB/c 2dpi $\times$ CD8-/- 2dpi

7. DISCUSSÃO

Na última década, observou-se um eminente aumento na frequência dos surtos da EHM em cavalos 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 (United States Department of Agriculture – USDA) (APHIS, 2007; VANDEKERCKHOVE et al., 2010). Entretanto, até os dias atuais, o mecanismo pelo qual o EHV-1 infecta o SNC não é conhecido e os fatores de risco relacionados ao meio ambiente, intrínsecos ao vírus e/ou ao hospedeiro que predispõem o aparecimento de manifestações neurológicas ainda não foram completamente esclarecidos (ALLEN, 2008). Considerando esse fato, no presente estudo, foram selecionadas três estirpes brasileiras do EHV-1 (A4/72, A9/92 e A3/97), isoladas a partir de casos de abortamento em éguas e de mortalidade perinatal, com o intuito de caracterizar esses vírus quanto à neuropatogenicidade e estabelecer um modelo murino para o estudo dos mecanismos envolvidos na patogenia da encefalite viral. As estirpes A4/72 e A3/97 do EHV-1 foram caracterizadas por meio do sequenciamento do gene da enzima DNA polimerase (ORF30), apresentando o genótipo não neuropatogênico (N₇₅₂). Uma vez que não foi possível sequenciar essa mesma região do gene da ORF30 da estirpe A9/92, utilizando os *primers* selecionados, sua identificação como EHV-1 foi realizada pelo sequenciamento da ORF64.

A partir dos resultados do presente estudo, observou-se que o EHV-1 foi capaz de infectar as diferentes linhagens de camundongos isogênicos desafiadas por via intranasal (BALB/c, BALB/c *nude*, C57BL/6 e C3H/HeJ); no entanto, o aparecimento e a gravidade das manifestações clínicas e neurológicas variaram de acordo com a patogenicidade do vírus inoculado. Consistente com outros relatos de literatura (AWAN et al., 1990; GALOSI et al., 2004), a estirpe A3/97 do EHV-1 foi caracterizada por sua baixa virulência em camundongos, produzindo apenas infecção respiratória tênue e de curta duração, a qual foi confirmada pelo desenvolvimento de lesões inflamatórias nos pulmões e reisolamento do vírus no 3º dpi. Em contraste, os camundongos inoculados via intranasal com as estirpes altamente virulentas A4/72 e A9/92 do EHV-1 apresentaram alterações clínicas e neurológicas evidentes e vieram a óbito entre o 3º e 4º dpi. O padrão de perda de peso foi praticamente idêntico para as quatro linhagens de camundongos utilizadas variando entre -18,6 e -21,5% do peso corpóreo no 3º dpi. Embora houvesse

divergências na capacidade de cada estirpe do vírus de causar doença, uma vez que as manifestações clínicas eram observadas e evoluíam de forma aguda, houve pouca ou nenhuma diferença com relação à suscetibilidade das linhagens de camundongo utilizadas nos experimentos.

Várias estirpes do EHV-1 com diferentes propriedades biológicas já foram descritas como, por exemplo, a RacL11 apresenta alta virulência no hospedeiro natural e em animais de laboratório, à medida que a KyA é completamente apatogênica para ambos, camundongos e cavalos, após uma série de passagens em cultivo de células murinas (VON EINEM et al., 2004). Os autores observaram que as estirpes recombinantes do EHV-1 RacL11 (com deleção no gene da proteína gp2) e KyARgp2F (que expressa a proteína gp2) foram apatogênicas para camundongos BALB/c. Por outro lado, Smith et al. (2005) demonstraram que camundongos da linhagem CBA foram mais susceptíveis à infecção pelo EHV-1 do que os BALB/c, quando inoculados com as estirpes RacL11 e KyARgp2F, embora ambas as linhagens apresentaram perda significativa de peso corpóreo.

As quatro linhagens de camundongos desafiadas com as estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 desenvolveram meningoencefalite não-supurativa grave e 100% de mortalidade entre o 3º e 4º dpi. 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. Os vírus foram capazes de infectar os neurônios resultando em morte celular e encefalite difusa, o que foi confirmado pela detecção de antígeno viral no SNC por imunoistoquímica. Estes 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 (HASABE et al., 2002a,b). As alterações histopatológicas encontradas no SNC dos camundongos infectados com as estirpes neuropatogênicas do EHV-1 foram semelhantes às aquelas já descritas na literatura (FRAMPTON et al., 2004; GOSZTONYI et al., 2009; KASEM et al., 2010; YU et al., 2010). Contrariamente ao descrito por esses autores, no presente estudo, os camundongos infectados pelo EHV-1 apresentaram manifestações neurológicas evidentes tais como, hiperexcitabilidade, andar em círculos, paralisia e convulsões, 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). Hamsters desafiados por via intranasal com o EHV-9 desenvolveram sinais clínicos e neurológicos no 3º dpi, tais como, acentuada perda de peso, postura arqueada, salivação, hiperexcitabilidade e convulsões. As lesões histopatológicas no SNC consistiram de degeneração dos neurônios, gliose, manguito perivascular e infiltrado inflamatório linfocítico nas meninges (EL-HABASH et al., 2011b). É interessante ressaltar também que essas alterações microscópicas foram semelhantes às lesões observadas nos camundongos inoculados com as estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1.

Outrossim, algumas lesões microscópicas observadas no SNC de camundongos infectados pelo EHV-1 podem ser comparadas àquelas causadas pela EHM em cavalos. Pôneis inoculados por via intranasal com a estirpe V592 do EHV-1 (genótipo não neuropatogênico N₇₅₂), isolada de um surto de abortamento ocorrido na Inglaterra em 1985, apresentaram degeneração de neurônios no bulbo olfatório e gliose (SMITH K. C. et al., 2000). O EHV-1 é descrito como endoteliotrópico em cavalos causando lesões características como vasculite de pequenos vasos e trombose com consequente isquemia do tecido nervoso. Apesar do EHV-1 não ser considerado primariamente neurotrópico em cavalos, existem relatos que o vírus pode induzir lesões em neurônios e astrócitos (SCHULTHEISS et al., 1997; SMITH, K. C. et al., 2000). Além do que, lesões como hemorragia, inflamação dos neurônios e células gliais, vasculite e manguitos perivasculares com presença de infiltrado mononuclear e polimorfonuclear, bem como trombose 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). A partir desses achados, podemos sugerir que essas duas estirpes virais apresentaram comportamento tanto neurotrópico quanto endoteliotrópico no modelo murino de infecção.

Segundo dados de literatura, os sinais clínicos em camundongos poderiam ser usados como parâmetro para distinguir entre estirpes patogênicas e não patogênicas do EHV-1 isoladas de cavalos (INAZU et al., 1993; VAN WOENSEL et al., 1995; GALOSI et al., 2004). Por sua vez, sabe-se que a neurovirulência em camundongos é um parâmetro importante na caracterização das diversas estirpes do EHV-1; no entanto, de acordo com relatos de literatura, essas conclusões não podem ser transpostas diretamente para o hospedeiro natural (CHOWDHURY et al.,

1986). Por outro lado, nossos resultados confirmaram que as lesões observadas no SNC de camundongos e cavalos com manifestações neurológicas foram muito semelhantes, tornando este modelo importante para elucidar aspectos da patogenia da doença neurológica associada à infecção pelo EHV-1.

Semelhante aos resultados do experimento realizado por Yu et al. (2010), embora as estirpes brasileiras A4/72 e A3/97 do EHV-1 terem sido caracterizadas como pertencentes ao genótipo não neuropatogênico (N₇₅₂) do gene da enzima DNA polimerase (ORF30), esses vírus apresentaram padrões diferentes de virulência após inoculação intranasal em camundongos, ou seja, o A4/72 foi classificado como neurovirulento enquanto o A3/97 não apresentou características de neurovirulência. Os resultados sugerem que outros fatores poderiam estar envolvidos na neuropatogenicidade do EHV-1 em modelos murinos. Esta hipótese baseia-se em estudos anteriores demonstrando a que deleção na sequência da ORF37 da estirpe Ab4p mutante do EHV-1 (Ab4pΔORF37) resultou na perda de patogenicidade em infecções experimentais com camundongos da linhagem CBA (KASEM et al., 2010).

Corroborando com 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 ventriculite generalizada e degeneração neuronal, principalmente nas áreas corticais e do hipocampo. Os resultados da análise histopatológica evidenciaram que os camundongos C57BL/6 (H2^b) e C3H/HeJ (H2^k) apresentaram lesões mais intensas do que os BALB/c (H2^d), com a presença de vacuolização e necrose dos neurônios no hipocampo e focos de malácia no bulbo olfatório.

A meningoencefalite aguda foi notavelmente exacerbada nos camundongos C57BL/6 e C3H/HeJ em comparação aos camundongos BALB/c e atímicos BALB/c *nude*, provavelmente devido às diferenças no padrão de resposta imune das linhagens de camundongo estudadas (SELLERS et al., 2012). Camundongos BALB/c desafiados com alta dose infectante (7.5×10^7 PFU/animal) da estirpe Ab4 do EHV-1 (genótipo neuropatogênico D₇₅₂) desenvolveram sinais agudos da doença, tais como pêlos arrepiados e alterações respiratórias pronunciadas, evoluindo para decúbito e morte no 3º dpi (GOSZTONYI et al., 2009). Apesar dos autores não terem relatado alterações neurológicas nos camundongos infectados, nem tão pouco,

lesões no SNC, a disseminação do vírus no tecido nervoso via bulbo olfatório pôde ser identificada por marcação imunoistoquímica. Outros autores demonstraram somente manifestações respiratórias brandas em camundongos BALB/c inoculados com a estirpe Ab4 do EHV-1 (AWAN et al., 1990; BAXI et al., 1996; BARTELS et al., 1998). Por sua vez, 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.

Em estudo realizado por Frampton et al. (2002) produziu-se uma estirpe recombinante do EHV-1 a partir da inserção das sequências que codificam a glicoproteína I (GI) e a glicoproteína E (gE) no genoma da estirpe KyA, utilizando genes da estirpe patogênica 89c25. Em contraste com o vírus parental KyA (apatogênico), a infecção por via intranasal com a estirpe recombinante do EHV-1 (Kgl/gE/75) em camundongos CBA (H2^k) causou meningoencefalite com lesões semelhantes àsquelas observadas no cavalo, indicando que camundongos CBA podem servir de modelo para o estudo da doença neurológica causada pelo EHV-1 (FRAMPTON et al., 2004). Mais recentemente, YU et al. (2010) descreveram que sete diferentes estirpes do EHV-1 isoladas no Japão causaram pneumonia intersticial com infiltrato linfocítico em camundongos CBA inoculados por via intranasal no 2º e 10º dpi. Nesse mesmo experimento, os autores observaram também lesões características de encefalite e meningoencefalite nos camundongos sem que apresentassem sintomas neurológicos, que foram causadas por quatro dessas estirpes virais, sendo três delas do genótipo não neuropatogênico N₇₅₂ (90c18, 97c11 e 98c12) e uma do genótipo neuropatogênico D₇₅₂ do EHV-1 (01c1). Contudo, somente o isolado japonês 89c1 (N₇₅₂) e a estirpe Ab4p (D₇₅₂) do EHV-1 causaram sintomas neurológicos nos camundongos CBA, comprovando que a mutação na ORF30 não é determinante de neuropatogenicidade no modelo murino. Yamada et al. (2008) evidenciaram que a mutação na ORF30 (N₇₅₂/D₇₅₂) não está relacionada com a capacidade de replicação viral em cultivo de células neuronais murinas e, embora tenham analisado um pequeno número de isolados do EHV-1, os autores sugeriram que ambos os genótipos podem causar doença neurológica em cavalos.

A maioria desses dados de literatura coincidem com os nossos resultados, confirmando que o neurotropismo e a neuroinvasividade do EHV-1 são

características intrínsecas a estirpe viral; entretanto, sua patogenicidade em camundongos depende de uma associação de fatores relacionados tanto ao agente quanto à resposta imune do hospedeiro. Encontra-se amplamente descrito na literatura que as linhagens de camundongos isogênicos são altamente divergentes no seu padrão de resposta imune, como resultado de mutações e polimorfismos. Tais variações imunológicas entre as linhagens isogênicas podem influenciar na resposta aos patógenos (GUÉNET, 2005; SELLERS et al., 2012).

De acordo com 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).

Em estudo realizado por AWAN et al. (1990), várias linhagens de camundongos (BALB/c, C57, CBA, AKR, SWR/J e DBA) foram comparadas quanto a susceptibilidade ao EHV-1. Os autores demonstraram que todos os camundongos das diferentes linhagens testadas apresentaram replicação viral nos pulmões, confirmando o epiteliotropismo desse agente viral; entretanto, foram os camundongos BALB/c que desenvolveram maior título viral no tecido pulmonar sendo considerada a linhagem mais sensível para estudo da doença respiratória causada pelo EHV-1. Em concordância com esses autores, nossos resultados demonstraram que as alterações respiratórias foram mais pronunciadas nos camundongos BALB/c e BALB/c nude, quando comparados aos C57BL/6 e C3H/HeJ (MORI et al., 2012).

Consistentemente com os achados de INAZU et al. (1993), no presente estudo a estirpe A3/97 do EHV-1 foi isolada dos pulmões dos camundongos BALB/c, C57BL/6 e C3H/HeJ no 3º dpi, mas o vírus não pode ser reisolado a partir

de outros órgãos incluindo timo, baço, fígado e SNC. Tal descoberta confirma que a infecção ficou limitada ao trato respiratório nos camundongos eutímicos. Por sua vez, o EHV-1 foi reisolado dos pulmões, SNC e baço dos camundongos atímicos BALB/c *nude* inoculados com a estirpe A3/97, demonstrando que a deficiência na resposta imune celular, dependente dos linfócitos T, favorece a disseminação viral para os órgãos periféricos e SNC após a inoculação intranasal. Apesar do vírus ter sido reisolado a partir do SNC de alguns camundongos imunodeficientes, não foram observadas manifestações neurológicas nesses animais, indicando que a estirpe A3/97 apresentou características de neuroinvasividade, mas não de neurovirulência após a inoculação intranasal. Em contraste, as estirpes neuropatogênicas A4/72 e A9/92 do EHV-1 foram capazes de causar alterações no SNC dos camundongos BALB/c *nude*; contudo, essas lesões foram menos intensas do que nas demais linhagens de camundongos, demonstrando assim que a imunidade do hospedeiro desempenha um papel importante na resposta inflamatória do SNC e contribui para o desenvolvimento da encefalite viral.

Embora a doença neurológica resultante da infecção pelas estirpes neuropatogênicas do EHV-1 tenha sido semelhante em todas as linhagens de camundongos testadas, as respostas imunes foram muito diferentes. De acordo com relatos de literatura, o presente estudo confirma 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 destaca a importância de escolher a linhagem de camundongo mais apropriada. A escolha da linhagem de camundongo depende primordialmente da questão específica a ser abordada e, muitas vezes, pode implicar na utilização de mais de uma linhagem especialmente nas interações específicas do EHV-1, e alfa-herpesviroses em geral, com o sistema imune do hospedeiro a ser estudado (VAN DE WALLE et al., 2008a).

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). Estudos *in vitro* avaliaram a produção de citocinas por leucócitos mononucleares periféricos de cavalos e pôneis infectados pelo EHV-1 (BREATHNACH et al., 2005; COOMBS et al., 2006; WAGNER et al., 2011; WIMER et al., 2011). Rappocciolo et al. (2003) comprovaram que o EHV-1 é capaz de inibir a expressão das moléculas de classe I do MHC em cultivo de células equinas infectadas. Por sua vez, alguns

autores utilizaram modelos murinos para determinar a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias no pulmão em resposta à infecção pelo EHV-1 (SMITH, P. M. et al., 2000; FRAMPTON et al., 2002; SMITH et al., 2005). A partir de estudos que utilizaram camundongos *knockout* (CCL3 $-/-$), infectados pelo EHV-1, foi comprovado que a quimiocina CCL3 (proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa) desempenha papel fundamental no controle da replicação viral nos pulmões por meio do desencadeamento de intensa resposta inflamatória (VAN DE WALLE et al., 2008a,b).

Em um único relato de literatura, os autores 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 IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 ou IL-12 p40 (PUSTERLA et al., 2006). Nesse sentido, pode-se considerar o presente trabalho como o estudo inicial que avalia a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias no SNC em um modelo de encefalite viral, em camundongos, causada pelo EHV-1.

Foi demonstrado que a infecção pelo EHV-1 em pôneis induz o aumento na produção de IFN- γ por linfócitos T CD4 $^{+}$ e CD8 $^{+}$ no período de convalescença, sugerindo que essa citocina pode contribuir para a imunidade protetora contra o EHV-1 (BREATHNACH et al., 2005). A porcentagem de células secretoras de IFN- γ que respondem *in vitro* ao desafio pelo EHV-1 foi insignificante ou não detectável em potros recém-desmamados ou de sobreano, mas aumentaram com a idade, detectando-se o maior percentual de células positivas para IFN- γ em animais com 28 anos de idade. Esses achados sugerem que os linfócitos T de memória específicos para o EHV-1 são susceptíveis de serem reestimulados durante toda a vida de um cavalo e aumentam sua população após exposição repetida ao antígeno, seja por meio de novas infecções, reativação do vírus latente ou por vacinação (PAILLOT et al., 2005; PAILLOT et al., 2007; PAILLOT et al., 2008). Apesar das concentrações de IFN- γ no plasma estarem um pouco elevadas em comparação ao controle, nossos resultados demonstraram que não houve aumento na expressão de mRNA para IFN- γ , no tecido nervoso dos camundongos BALB/c, C57BL/6, CD4 $-/-$ e CD8 $-/-$ infectados pela estirpe neuropatogênica A9/92 do EHV-1. O fato desses camundongos terem sido avaliados na fase aguda da doença, ou seja, no 2º e 3º dpi e não possuírem células de memória específicas para o EHV-1 (primo infecção)

pode explicar tais achados. Da mesma maneira, Pusterla et al. (2006) relataram que o tecido nervoso de cavalos infectados pelo EHV-1 não expressou IFN- γ . Os autores sugerem que a falta de expressão de IFN- γ deve desempenhar um papel importante na fisiopatogenia da EHM. Nesse sentido, os mecanismos envolvidos podem estar relacionados a natureza aguda da doença, ou à capacidade de EHV-1 de impedir ou modificar a resposta imune do hospedeiro.

Utilizando o teste de microarranjo de DNA, SMITH et al. (2005) identificaram aumento da expressão gênica de IFN- γ , TNF- α , IL-6 e CCL2, dentre outras citocinas e quimiocinas, nos pulmões de camundongos infectados com as estirpes KyA (apatogênica) e KyARgp2F (recombinante patogênica) do EHV-1 no período de 8 e 12 horas pós infecção. Em concordância com esses resultados, detectou-se por RT-qPCR aumento na expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 e da quimiocina CCL2 no tecido nervoso de todos os camundongos infectados com a estirpe neuropatogênica A9/92 do EHV-1, no 2º e 3º dpi, em relação aos controles.

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). Nesse mesmo estudo, também de forma semelhante aos nossos resultados, os autores demonstraram que o vírus neurotrópico TMEV induziu lesões no SNC dos camundongos caracterizadas por gliose e pela perda de neurônios, principalmente no hipocampo.

As citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 são produzidas no SNC por células residentes (microglia e astrócitos) e também pelas células inflamatórias circulantes que atravessam a barreira hematoencefálica, logo após a infecção viral (LIBBEY et al., 2011). Os resultados do presente estudo demonstraram que a expressão gênica de TNF- α no SNC dos camundongos C57BL/6, CD4-/- e CD8-/- infectados com a estirpe A9/92 do EHV-1 já estava aumentada no 2º dpi, observando-se valores de 578, 1.425 e 1.837 vezes maiores do que os controles,

respectivamente (Tabela 4). No 3º dpi a expressão de RNAm para TNF- α no SNC continuou elevada variando entre 1.400 e 1.900 vezes maior do que os controles. Por sua vez, observou-se que houve um aumento na expressão gênica de IL-6 no 3º dpi (1.400 a 3.000 vezes maior que o controle) comparado ao 2º dpi (200 a 700 vezes maior que o controle). Corroborando com os relatos de literatura (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 logo após a infecção do tecido nervoso que, por sua vez, estimulou a produção de IL-6 pelos macrófagos residentes no SNC e por células inflamatórias circulantes que migraram para o local da infecção devido aos estímulos quimiotáticos.

A quimiocina CCL2 está envolvida nos mecanismos de eliminação viral atuando diretamente na permeabilidade da barreira hematoencefálica e/ou como fator quimiotático para linfócitos e macrófagos no processo inflamatório do SNC (STAMATOVIC et al., 2005; DESHMANE et al., 2009). A expressão gênica de CCL2 no tecido nervoso dos camundongos C57BL/6, CD4 $^{-/-}$ e CD8 $^{-/-}$ infectados pelo EHV-1 aumentou expressivamente, observado-se valores variando de 4 a 7 mil e 16 a 32 mil vezes maiores do que os controles no 2º e 3º dpi, respectivamente. Baseando-se nos resultados do corrente experimento e de estudos sobre a resposta imune contra outras viroses neurotrópicas, como o vírus da encefalite equina venezuelana (EEV) (SHARMA; MAHESHWARI, 2009) e o herpesvírus simplex (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 e pode desempenhar um papel fundamental na defesa contra a infecção viral no SNC (WIMER et al., 2011). Corroborando com essa hipótese, sabe-se que em cavalos acometidos pela EHM ocorrem alterações na permeabilidade da barreira hematoencefálica, 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).

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 BALB/c (H2^d) (aumento de apenas 3, 12 e 100 vezes

mais do que os controles no 3º dpi, respectivamente) quando comparados aos camundongos com fundo genético C57BL/6 (H2^b), ou seja, C57BL/6, CD4^{-/-} e CD8^{-/-}. Conforme discutido anteriormente, tais resultados devem-se ao tipo de resposta imune de acordo com a linhagem dos camundongos, ou seja, linfócitos Th1 predominantes nos camundongos C57BL/6 produzem citocinas que ativam macrófagos, linfócitos NK (*natural killer*), neutrófilos e linfócitos T CD8⁺ (citotóxicos) que estimulam a resposta imune celular. Por outro lado, linfócitos tipo Th2, predominantes nos camundongos BALB/c, favorecem a resposta humoral pela ativação de células produtoras de anticorpos.

Azmi e Field (1993) verificaram que os linfócitos T CD8⁺ foram importantes na eliminação viral em camundongos BALB/c infectados com a estirpe Ab4 (genótipo neuropatogênico D₇₅₂) do EHV-1. Em contraste, Alber et al. (1995) relataram que apesar dos camundongos C3H (H2^k) infectados pelo EHV-1 exibirem maior índice de proliferação de linfócitos T do que os camundongos BALB/c (H2^d), essa resposta *in vitro* foi atribuída principalmente a células T CD4⁺ em ambas as linhagens de camundongos. No mesmo experimento, os autores detectaram também atividade dos linfócitos T CD8⁺, porém, a um nível consideravelmente menor. 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 cavalos, 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).

Apesar de não haver diferença estatística, a expressão gênica de IL-6 e CCL2 no SNC dos camundongos CD8^{-/-} infectados pelo EHV-1 no 3º dpi foi mais elevada do que nos camundongos C57BL/6 e CD4^{-/-}. Uma possível explicação seria que os linfócitos T CD8⁺ destroem as células da glia infectadas pelo EHV-1, reduzindo a produção de citocinas e quimiocinas; evento esse que não ocorre na ausência da resposta citotóxica. Contudo, os mecanismos envolvidos nessa resposta requerem estudos mais detalhados. Além do mais, ainda que todos os camundongos desenvolveram meningoencefalite viral, as manifestações neurológicas apareceram mais tardiamente e com menor intensidade nos camundongos CD4^{-/-} quando

comparados com os C57BL/6 e CD8^{-/-} (Tabela 3), indicando que os linfócitos T CD8⁺ são essenciais para o controle da infecção pelo EHV-1 no SNC nesse modelo murino. Nossos resultados foram consistentes com os achados de outros autores, os quais observaram aumento na expressão de mRNA para as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-1 nos pulmões de camundongos infectados pelo vírus da influenza (H1N1), após a depleção dos macrófagos pulmonares (MURPHY et al., 2011).

Tais achados sugerem que a expressão gênica de TNF- α , IL-6 e CCL2 no SNC ocorre por ativação da microglia em resposta a infecção pelo EHV-1. Posteriormente, ocorre alteração na permeabilidade da barreira hematoencefálica e intensa infiltração de linfócitos T CD8⁺ (citotóxicos) que são essenciais para combater a infecção pelo EHV-1; contudo, também contribuem para o desenvolvimento das lesões no SNC.

8. CONCLUSÕES

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 a infecção, exibindo acentuada perda de peso e 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 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.

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.

Além das diferenças no padrão de resposta imune das linhagens de camundongo estudadas, observamos que o neurotropismo e a neuroinvasividade foram características intrínsecas da estirpe viral. Enquanto as estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 apresentaram tropismo para o SNC e neurovirulência, a estirpe A3/97 ficou restrita ao trato respiratório dos camundongos infectados.

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 expressivo 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 barreira hematoencefálica e atuando como fator quimiotático para leucócitos; em especial, os linfócitos T CD8+. Por sua vez, os linfócitos T CD8+ contribuem para o desenvolvimento das lesões no SNC ao combaterem a infecção pelo EHV-1.

Os linfócitos T CD8+ foram essenciais para a evolução da infecção pelo EHV-1 no SNC, contribuindo no desenvolvimento das lesões no tecido nervoso.

REFERÊNCIAS

- 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.; 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.; YEARGAN, M. R.; TURTINEN, L. W.; BRYANS, J. T. A new field strain of equine abortion virus (equine herpesvirus-1) among Kentucky horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, n. 1, p. 138-140, 1985.
- ALLEN, G. P.; YEARGAN, M. R.; TURTINEN, L. W.; BRYANS, J. T.; MCCOLLUM, W. H. Molecular epizootiologic 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.
- 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. Risk factors for development of neurologic disease after experimental exposure to equine herpesvirus-1 in horses. **American Journal Of Veterinary Research**, v. 69, n. 12, p. 1595-1600, 2008.
- ANDERSON, K.; GOODPASTURE, E. W. Infection of newborn syrian hamsters with the virus of mare abortion (Dimock and Edwards). **The American Journal of Pathology**, v. 18, n. 4, p. 555-561, 1942.
- 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. 2012.
- 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.; 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.; GIBSON, J. S.; FIELD, H. J. A murine model for studying EHV-1-induced abortion. **Research in Veterinary Science**, v. 51, n. 1, p. 94-99, 1991.
- 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, 1993.
- 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.
- BENAVIDES, F. J.; GUÉNET, J. L. **Manual de Genética de Roedores de Laboratorio Principios Básicos y Aplicaciones**. Madrid: Universidad de Alcalá, 2003.
- BORCHERS, K.; EBERT, M.; FETSCH, A.; HAMMOND, T.; STERNER-KOCK, A. Prevalence of equine herpesvirus type 2 (EHV-2) DNA in ocular swabs and its cell tropism in equine conjunctiva. **Veterinary Microbiology**, v. 118, n. 3-4, p. 260-266, 2006.
- BORCHERS, K.; WOLFINGER, U.; LUDWIG, H. Latency-associated transcripts of equine herpesvirus type 4 in trigeminal ganglia of naturally infected horses. **The Journal of General Virology**, v. 80, pt. 8, p. 2165-2171, 1999.
- 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.
- CARUSO, C.; CANDORE, G.; MODICA, M. A.; BONANNO, C. T.; SIRECI, G.; DIELI, F.; SALERNO, A. Major histocompatibility complex regulation of cytokine production. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 16, n. 12, p. 983-988, 1996.
- 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.
- CARVALHO, R. F.; OLIVEIRA, A. M.; SOUZA, A. M.; PASSOS, L. M.; MARTINS, A. S. Prevalence of equine herpesvirus type 1 latency detected by polymerase chain reaction. **Archives of Virology**, v. 145, n. 9, p. 1773-1787, 2000.

-
- CHOMCZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **Biotechniques**, v. 15, n. 3, p. 532-534, 536-537, 1993.
- CHOWDHURY, S. I.; KUBIN, G.; LUDVIG, H. Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) Induced Abortions and Paralysis in Lipzzaner Stud: a Contribution to the Classification of equine Herpesvirus. **Archives of Virology**, v. 90, p. 273-288, 1986.
- CONRADY, C. D.; DREVETS, D. A.; CARR, D. J. J. Herpes Simplex Type I (HSV-1) Infection of the Nervous System: Is an Immune Response a Good Thing? **Journal of Neuroimmunology**, v. 220, n. 1-2, p. 1-9, 2010.
- 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.
- CORREA, W. M.; NILSSON, M. R. Observações preliminares sobre o aborto equino a virus no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 31, n. 3, p. 13-15, 1964.
- COSTA, E. A.; LIMA, G. B. L.; CASTRO, R. T.; FURTINI, R.; PORTILHO, R. V.; RESENDE, M. Meningoencephalitis in a horse associated with equine herpesvirus 1. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 6, p. 1580-1583, 2008.
- CRANDELL, R. A.; DRYSDALE, S.; STEIN, T. L. A comparative study of bovine herpesvirus 1247 and equine herpesvirus 1 in ponies. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 43, n. 1, p. 94-97, 1979.
- 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: VI REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 6., **Anais...** 1993. p. 15.
- DE LA FUENTE, R.; AWAN, A. R.; FIELD, H. J. The acyclic nucleoside analogue penciclovir is a potent inhibitor of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) in tissue culture and in a murine model. **Antiviral Research**, v. 18, n. 1, p. 77-89, 1992.
- 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.
- DIMOCK, W. W.; EDWARDS, P. R.; BRUNER, D. W. Infections observed in equine fetuses and foals. **The Cornell Veterinarian**, v. 37, n. 2, p. 89-99, 1947.
- DIMOCK, W. W.; EDWARDS, P. R. Is there a filterable virus of abortion in mares? **Kentucky Agricultural Experiment Station**, v. 333, p. 297-301, 1933. Supplement.
-

DOLL, E. R.; CROWE, M. E.; MCCOLLUM, W. H.; BRYANS, J. T. In vitro serum neutralization of hamster-propagated equine rhinopneumonitis virus. **The Cornell Veterinarian**, v. 49, n. 1, p. 28-33, 1959.

DOLL, E. R.; RICHARDS, M. G.; WALLACE, M. E. Adaptation of the equine abortion virus to suckling Syrian hamsters. **The Cornell Veterinarian**, v. 43, n. 4, p. 551-558, 1953.

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.

EHLERS, B.; DURAL, G.; YASMUM, N.; LEMBO, T.; DE THOISY, B.; RYSER-DEGIORGIS, M. P.; ULRICH, R. G.; MCGEOCH, D. J. Novel mammalian herpesviruses and lineages within the Gammaherpesvirinae: cospeciation and interspecies transfer. **Journal of Virology**, v. 82, n. 7, p. 3509-3516, 2008.

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.

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.

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.

FRAMPTON, A. R.; SMITH, P. M.; ZHANG, Y.; MATSUMURA, T.; OSTERRIEDER, N.; O'CALLAGHAN, D. J.. Contribution of gene products encoded within the unique short segment of equine herpesvirus 1 to virulence in a murine model. **Virus Research**, v. 90, n. 1-2, p. 287-301, 2002.

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.

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.

GALOSI, C. M.; BARBEITO, C. G.; VILA ROZA, M. V.; CID DE LA PAZ, V.; AYALA, M. A.; CORVA, S. G.; ETCHEVERRIGARAY, M. E.; GIMENO, E. J. Argentine strain of equine herpesvirus 1 isolated from an aborted foetus shows low virulence in mouse respiratory and abortion models. **Veterinary Microbiology**, v. 103, n. 1-2, p. 1-12, 2004.

GALOSI, C. M.; NORIMINE, J.; ECHEVERRÍA, M. G.; OLIVA, G. A.; NOSETTO, E. O.; ETCHEVERRIGARAY, M. E.; TOHYA, Y.; MIKAMI, T. Diversity of genomic electropherotypes of naturally occurring equine herpesvirus 1 isolates in Argentina. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 6, p. 771-774, 1998.

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.

GREENWOOD, A. D.; TSANGARAS, K.; HO, S. Y. W.; SZENTIKS, C. A.; NIKOLIN, V. M.; MA, G.; DAMIANI, A.; EAST, M. L.; LAWRENZ, A.; HOFER, H.; OSTERRIEDER, N. A Potentially Fatal Mix of Herpes in Zoos. **Current Biology**, v. 22, p. 1-5, 2012.

GRYSPEERDT, A. C.; VANDEKERCKHOVE, A. P.; GARRÉ, B.; BARBÉ, F.; VAN DE WALLE, G. R.; NAUWYNCK, H. J. Differences in replication kinetics and cell tropism between neurovirulent and non-neurovirulent EHV1 strains during the acute phase of infection in horses. **Veterinary Microbiology**, v. 142, n. 3-4, p. 242-253, 2010.

GUPTA, A. K.; KAUR, D.; RATTAN, B.; YADAV, M. P. Molecular variability in different Indian isolates of equine herpesvirus-1. **Veterinary Research Communications**, v. 29, n. 8, p. 721-734, 2005.

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.

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.

-
- 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.
- 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.
- KASEM, S.; YAMADA, S.; KIUPEL, M.; WOODRUFF, M.; OHYA, K.; FUKUSHI, H. Equine Herpesvirus Type 9 in Giraffe with Encephalitis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 12, p. 1948-1949, 2008.
- 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.
- KASTRUKOFF, L. F.; LAU, A. S.; TAKEI, F.; SMYTH, M. J.; JONES, C. M.; CLARKE, S. R. M.; CARBONE, F. R. Redundancy in the immune system restricts the spread of HSV-1 in the central nervous system (CNS) of C57BL/6 mice. **Virology**, v. 400, n. 2, p. 248-258, 2010.
- KAUSHIK, D. K.; GUPTA, M.; BASU, A. Microglial response to viral challenges: Every silver lining comes with a cloud. **Frontiers in Bioscience**, v. 16, n. 5, p. 2187-2205, 2011.
- KIELCZEWSKA, A.; VIDAL, S. M. Enemy at the gates: forward genetics of the mouse antiviral response. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, n. 5, p. 617-626, 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.
- KIRISAWA, R.; OHMORI, H.; IWAI, H.; KAWAKAMI, Y. The genomic diversity among equine herpesvirus-1 strains isolated in Japan. **Archives of Virology**, v. 129, n. 1-4, p. 11-22, 1993.
- 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.
- KLEIBOEKER, S. B.; TURNQUIST, S. E.; JOHNSON, P. J.; KREEGER, J. M. Detection and Nucleotide Sequencing of a DNA-Packaging Protein Gene of Equine Gammaherpesviruses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 16, n. 1, p. 67-74, 2004.
- KOTAIT, I. Herpesvírus eqüino tipo 1: incidência e diagnóstico laboratorial. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 1, p. 164-171, 1991. Suplemento 3.
-

- KOTAIT, I.; PEIXOTO, Z. M. P.; QUEIROZ, L. H.; CUNHA, E. M. S.; SOUZA, M. C. A. M.; MACRUZ, R.; FREITAS, C. A. Diagnóstico laboratorial do aborto eqüino a vírus através de imunofluorescência e soroneutralização. **Revista de Microbiologia**, v. 20, n. 1, p. 128-132, 1989.
- 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.
- LARA, M. C. C. S.; CUNHA, E. M. S.; VILLALOBOS, E. M. C.; NASSAR, A. F. C.; ASANO, K. M.; FERNANDES, W. R.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDÃO, P. E.; MORI, E. First isolation of equine herpesvirus type 1 from a horse with neurological disease in Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n. 2, p. 221-224, 2008.
- 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.
- 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.
- LOKENS GARD, J. R.; CHEERAN, M. C.-J.; HU, S.; GEKKER, G.; PETERSON, P. K. Glial cell responses to herpesvirus infections: role in defense and immunopathogenesis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. S171-S179, 2002. Supplement.
- 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.
- MANNINGER, R.; CSONTOS, J. Virusabortus der Stuten. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 49, p. 105-108, 1941.
- MCCANN, S. H.; MUMFORD, J. A.; BINNS, M. M. Development of PCR assays to detect genetic variation amongst equine herpesvirus-1 isolates as an aid to epidemiological investigation. **Journal of Virological Methods**, v. 52, n. 1-2, p. 183-194, 1995.
- 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.
- 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, 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 ou Dissertação (Doutorado ou Mestrado) - 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.

MORI, E.; MORI, C. M. C.; MASSIRONI, S. M. G.; CUNHA, E. M. S.; VILLALOBOS, E. M. C.; LARA, M. C. C. S. H.; FERNANDES, W. R. Detection of equid herpesvirus 1 DNA by Polymerase Chain Reaction after experimental inoculation of horses with a Brazilian A4 / 72 strain. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 4, p. 253-261, 2009.

MURPHY, E. A.; DAVIS, J. M.; MCCLELLAN, J. L.; CARMICHAEL, M. D.; ROOIJEN, N. V.; GANGEMI, J. D. Susceptibility to infection and inflammatory response following influenza virus (H1N1, A/PR/8/34) challenge: role of macrophages. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 31, n. 6, p. 501-508, 2011.

NAGY, E.; IDAMAKANTI, N.; CARMAN, S. Restriction endonuclease analysis of equine herpesvirus-1 isolates recovered in Ontario, 1986-1992, from aborted, stillborn, and neonatal foals. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 9, n. 2, p. 143-148, 1997.

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

NILSSON, M. R. Aborto equino a vírus. In: CICLO INTERNACIONAL DE CLÍNICA VETERINÁRIA EQUINA, 3., 1980, São Paulo. **Anais...** 1980. p. 57-58.

NILSSON, M. R.; CORREA, W. M. Isolamento do vírus do aborto equino no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 33, n. 2, p. 23-25, 1966.

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.

OSTERRIEDER, N.; VAN DE WALLE, G. R. Pathogenic potential of equine alphaherpesviruses: the importance of the mononuclear cell compartment in disease outcome. **Veterinary Microbiology**, v. 143, n. 1, p. 21-28, 2010.

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.; DALY, J. M.; JUILLARD, V.; MINKE, J. M.; HANNANT, D.; KYDD, J. H. Equine interferon gamma synthesis in lymphocytes after in vivo infection and in vitro stimulation with EHV-1. **Vaccine**, v. 23, n. 36, p. 4541-4551, 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.
- PALFI, V.; CHRISTENSEN, L. S. Analyses of restriction fragment patterns (RFPs) and pathogenicity in baby mice of equine herpesvirus 1 and 4 (EHV-1 and EHV-4) strains circulating in Danish horses. **Veterinary Microbiology**, v. 47, n. 1-2, p. 199-204, 1995.
- 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.; 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.
- PLUMMER, G.; COLEMAN, P. Neurovirulence of equine herpesvirus type 1 in mice of different ages. **Journal of Infectious**, v. 128, n. 2, p. 202-210, 1973.
- PLUMMER, G.; WATERSON, A. P. Equine herpes viruses. **Virology**, v. 19, p. 412-416, 1963.
- 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.; 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.
- PUSTERLA, N.; WILSON, W. D.; MADIGAN, J. E.; FERRARO, G. L. Equine herpesvirus-1 myeloencephalopathy: a review of recent developments. **Veterinary Journal**, v. 180, n. 3, p. 279-289, 2009.
-

-
- RANDALL, C. C.; RYDEN, F. W.; DOLL, E. R.; SCHELL, F. S. Cultivation of Equine Abortion Virus in Fetal Horse Tissue in Vitro. **The American Journal of Pathology**, v. 29, n. 1, p. 139-153, 1953.
- RANKINE, E. L.; HUGHES, P. M.; BOTHAM, M. S.; PERRY, V. H.; FELTON, L. M. Brain cytokine synthesis induced by an intraparenchymal injection of LPS is reduced in MCP-1-deficient mice prior to leucocyte recruitment. **The European Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 1, p. 77-86, 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.
- REBHUN, W. C.; JENKINS, D. H.; RIIS, R. C.; DILL, S. G.; DUBOVI, E. J.; TORRES, A. An epizootic of blindness and encephalitis associated with a herpesvirus indistinguishable from equine herpesvirus 1 in a herd of alpacas and llamas. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, n. 7, p. 953-956, 1988.
- 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.
- RITCHEY, J. W.; PAYTON, M. E.; EBERLE, R. Clinicopathological characterization of monkey B virus (Cercopithecine herpesvirus 1) infection in mice. **Journal of Comparative Pathology**, v. 132, n. 2-3, p. 202-217, 2005.
- ROTHS, J. B.; FOXWORTH, W. B.; MCARTHUR, M. J.; MONTGOMERY, C. A.; KIER, A. B. Spontaneous and engineered mutant mice as models for experimental and comparative pathology: history, comparison, and developmental technology. **Laboratory Animal Science**, v. 49, n. 1, p. 12-34, 1999.
- RUITENBERG, K. M.; WALKER, C.; WELLINGTON, J. E.; 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, n. 3, p. 237-244, 1999.
- SAXEGAARD, F. Isolation and identification of equine rhinopneumonitis virus (equine abortion virus) from causes of abortion and paralysis. **Nordisk Veterinaer Medicin**, v. 18, p. 504-512, 1966.
- 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.
- SCHRENZEL, M. D.; TUCKER, T. A.; DONOVAN, T. A.; BUSCH, M. D. M.; WISE, A. G.; MAES, R. K.; KIUPEL, M. New Hosts for Equine Herpesvirus 9. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 10, p. 1616-1619, 2008.
-

- SCHULTHEISS, P. C.; COLLINS, J. K.; HOTALING, S. F. Immunohistochemical Demonstration of Equine Herpesvirus-1 Antigen in Neurons and Astrocytes of Horses with Acute Paralysis. **Veterinary Pathology**, v. 34, n. 1, p. 52-54, 1997.
- 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.
- 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.; WHITWELL, K. E.; MUMFORD, J. A.; HANNANT, D.; BLUNDEN, A. S.; TEARLE, J. P. Virulence of the V592 isolate of equid 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, P. M.; ZHANG, Y.; GRAFTON, W. D.; JENNINGS, S. R.; O'CALLAGHAN, D. J. Severe murine lung immunopathology elicited by the pathogenic equine herpesvirus 1 strain RacL11 correlates with early production of macrophage inflammatory proteins 1alpha, 1beta, and 2 and tumor necrosis factor alpha. **Journal of Virology**, v. 74, n. 21, p. 10034-10040, 2000.
- 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.
- STEINMETZ, M.; STEPHAN, D.; FISCHER LINDAHL, K. Gene organization and recombinational hotspots in the murine major histocompatibility complex. **Cell**, v. 44, n. 6, p. 895-904, 1986.
- STUDDERT, M. J.; CRABB, B. S.; FICORILLI, N. The molecular epidemiology of equine herpesvirus 1 (equine abortion virus) in Australasia 1975 to 1989. **Australian Veterinary Journal**, v. 69, n. 5, p. 104-111, 1992.

- STUDDERT, M. J.; SIMPSON, T.; ROIZMAN, B. Differentiation of respiratory and abortigenic isolates of equine herpesvirus 1 by restriction endonucleases. **Science**, v. 214, n. 4520, p. 562-564, 1981.
- 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.
- 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 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 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 MAANEN, C.; DE BOER-LUIJTZE, E.; TERPSTRA, C. Development and validation of a monoclonal antibody blocking ELISA for the detection of antibodies against both equine herpesvirus type 1 (EHV1) and equine herpesvirus type 4 (EHV4). **Veterinary Microbiology**, v. 71, n. 1-2, p. 37-51, 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.
- VIDAL, S. M.; MALO, D.; MARQUIS, J. F.; GROS, P. Forward genetic dissection of immunity to infection in the mouse. **Annual Review of Immunology**, v. 26, p. 81-132, 2008.
- VON EINEM, J.; WELLINGTON, J.; WHALLEY, J M; OSTERRIEDER, K.; O'CALLAGHAN, D. J.; OSTERRIEDER, N. The truncated form of glycoprotein gp2 of equine herpesvirus 1 (EHV-1) vaccine strain KyA is not functionally equivalent to full-length gp2 encoded by EHV-1 wild-type strain RacL11. **Journal of Virology**, v. 78, n. 6, p. 3003-3013, 2004.
- WAGNER, B.; WIMER, C.; FREER, H.; OSTERRIEDER, N.; ERB, H. N. Infection of peripheral blood mononuclear cells with neuropathogenic equine herpesvirus type-1 strain Ab4 reveals intact interferon- α induction and induces suppression of anti-inflammatory interleukin-10 responses in comparison to other viral strains. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 143, n. 1-2, p. 116-124, 2011.
- WALKER, C.; LOVE, D. N.; WHALLEY, J M. Comparison of the pathogenesis of acute equine herpesvirus 1 (EHV-1) infection in the horse and the mouse model: a review. **Veterinary Microbiology**, v. 68, n. 1-2, p. 3-13, 1999.

- WALKER, C.; PEROTTI, V. M.; LOVE, D. N.; WHALLEY, J. M. Infection with equine herpesvirus 1 (EHV-1) strain HVS25A in pregnant mice. **Journal of Comparative Pathology**, v. 120, n. 1, p. 15-27, 1999.
- 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.
- WEIBLEN, R.; RABUSKE, M.; REBELATTO, M. C.; NOBRE, V. M.; CANABARRO, T. F. Abortion due to equine herpesvirus in southern Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 27, n. 6, p. 1317-1320, 1994.
- WESTERFIELD, C.; DIMOCK, W. W. The pathology of equine virus abortion. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 109, p. 101-111, 1946.
- 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.
- WOHLSEIN, P.; LEHMBECKER, A.; SPITZBARTH, I.; ALGERMISSSEN, D.; BAUMGÄRTNER, W.; BÖER, M.; KUMMROW, M.; HAAS, L.; GRUMMER, B. Fatal epizootic equine herpesvirus 1 infections in new and unnatural hosts. **Veterinary Microbiology**, v. 149, n. 3-4, p. 456-460, 2011.
- YADAV, A.; SAINI, V.; ARORA, S. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. **Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry**, v. 411, n. 21-22, p. 1570-1579, 2010.
- YAMADA, S.; MATSUMURA, T.; TSUJIMURA, K.; YAMAGUCHI, T.; OHYA, K.; FUKUSHI, H. Comparison of the growth kinetics of neuropathogenic and nonneuropathogenic equid herpesvirus type 1 (EHV-1) strains in cultured murine neuronal cells and the relevance of the D/N(752) coding change in DNA polymerase gene (ORF30). **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 70, n. 5, p. 505-511, 2008.
- 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.
- ZHANG, Y.; SMITH, P. M.; JENNINGS, S. R.; O'CALLAGHAN, D. J. Quantitation of virus-specific classes of antibodies following immunization of mice with attenuated equine herpesvirus 1 and viral glycoprotein D. **Virology**, v. 268, n. 2, p. 482-492, 2000.
- ZIENTARA, S.; PLATEAU, E.; SAILLEAU, C.; CRUCIÈRE, C. Comparison of the restriction patterns of equine herpesvirus (EHV-1) strains isolated for eight years in France. **Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of Veterinary Medicine. Series B**, v. 40, n. 7, p. 501-507, 1993.

APÊNDICE

EXPERIMENTALLY INDUCED DISEASE

Equid Herpesvirus Type-1 Exhibits Neurotropism and Neurovirulence in a Mouse Model

C. M. C. Mori^{*}, E. Mori[†], L. L. Favaro[†], C. R. Santos^{*},
M. C. C. S. H. Lara[‡], E. M. C. Villalobos[‡], E. M. S. Cunha[‡],
P. E. Brandao[†], L. J. Richtzenhain[†] and P. C. Maiorka^{*}

^{*} Department of Pathology, [†] Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of Sao Paulo and [‡] Biological Institute, Sao Paulo, Brazil

Summary

Intranasal inoculation of equid herpesvirus type-1 (EHV-1) Brazilian strains A4/72 and A9/92 induced an acute and lethal infection in four different inbred mouse strains. Clinical and neurological signs appeared between the 2nd and 3rd day post inoculation (dpi) and included weight loss, ruffled fur, a hunched posture, crouching in corners, nasal and ocular discharges, dyspnoea, dehydration and increased salivation. These signs were followed by increased reactivity to external stimulation, seizures, recumbency and death. The virus was recovered consistently from the brain and viscera of all mice with neurological signs. Histopathological changes consisted of leptomeningitis, focal haemorrhage, ventriculitis, neuronal degeneration and necrosis, neuronophagia, non-suppurative inflammation, multifocal gliosis and perivascular infiltration of polymorphonuclear and mononuclear cells. Immunohistochemical examination demonstrated that EHV-1 strains A4/72 and A9/92 replicated in neurons of the olfactory bulb, the cortex and the hippocampus. In contrast, mice inoculated with the EHV-1 Brazilian strain A3/97 showed neither weight loss nor apparent clinical or neurological signs; however, the virus was recovered consistently from their lungs at 3 dpi. These three EHV-1 strains showed distinct degrees of virulence and tissue tropism in mice. EHV-1 strains A4/72 and A9/92 exhibited a high degree of central nervous system tropism with neuroinvasion and neurovirulence. EHV-1 strain A3/97 was not neurovirulent despite being detected in the brains of infected BALB/c nude mice. These findings indicate that several inbred mouse strains are susceptible to neuropathogenic EHV-1 strains and should be useful models for studying the pathogenesis and mechanisms contributing to EHV-induced myeloencephalopathy in horses.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: EHV-1; mouse model; neurovirulence; viral meningoencephalitis

Introduction

Equid herpesvirus type-1 (EHV-1) is a major pathogen with significant economic impact on the equine industry worldwide. It has long been implicated causally in the occurrence of abortion, neonatal death, respiratory disease and neurological disorders in horses (Allen and Bryans, 1986; Gryspeerdt *et al.*, 2010). Encephalomyelitis is less common than other manifestations of EHV-1 infection; however, outbreaks have been reported with increasing frequency throughout North America and Europe, resulting in

the classification of EHV-1 as a potentially emerging disease by the US Department of Agriculture (Vandekerckhove *et al.*, 2010).

Horses have been used as the natural host for studying EHV-1 infection for many years. However, these studies have been limited by the fact that EHV-1 is endemic in equine populations worldwide and it is difficult to identify horses that have not been infected previously by this virus. Moreover, working with horses is expensive, labour intensive and only possible with small numbers of animals (Slater *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 2000).

The availability of several mouse strains that are susceptible to EHV-1 infection, the similarities between the immune response of the mouse and the

Correspondence to: C. M. C. Mori (e-mail: claudiam@usp.br),
or E. Mori (e-mail: enio@usp.br).

horse, and the amount of information regarding the genetic and biological characteristics of inbred mouse strains make them attractive animal models for investigating the pathogenesis and immune mechanisms responsible for virus clearance (Awan *et al.*, 1990; Baxi *et al.*, 1996; Bartels *et al.*, 1998; Mori *et al.*, 2006). Adult BALB/c mice inoculated intranasally exhibit many features similar to EHV-1 infections in horses. These include respiratory signs, local viral replication in the respiratory mucosa and cell-associated viraemia (Walker *et al.*, 1999). An increased incidence of abortion has also been observed in the mouse model; however, neurological signs are not usually reported (Walker *et al.*, 1999; Galosi *et al.*, 2004). Furthermore, C3H mice show immune responses similar to those of horses, with virus neutralizing antibodies that can be detected after a single exposure to EHV-1 (Alber *et al.*, 1995). In addition, CBA mice show brain lesions similar to those observed in EHV-1-infected horses exhibiting neurological signs (Frampton *et al.*, 2004; Kasem *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010).

Earlier studies using a mouse model showed neuroinvasion after intranasal inoculation, thereby indicating the ability of EHV-1 to penetrate the brain following replication in tissues outside the central nervous system (CNS) (Awan *et al.*, 1990). Recently, Gosztonyi *et al.* (2009) and Yu *et al.* (2010) demonstrated that mice inoculated intranasally with EHV-1 exhibit brain lesions, which occurred even without neurological signs.

The first molecular characterization of EHV-1 strains described 16 electropherotypes based on DNA restriction fragment length polymorphism (RFLP). The main electropherotypes are termed P and B (Allen *et al.*, 1983). EHV-1 strains isolated from horses with neurological disorders have been characterized as being of the P type. EHV-1 strains isolated in Argentina and Brazil have also been identified as the P type (Galosi *et al.*, 1998; Mori *et al.*, personal communication). Differences between the EHV-1 P and B types relate to difference in the *ORF64* gene. This gene encodes infected cell protein-4 (ICP4), which is thought to be involved in the neuropathogenicity of EHV-1 (Pagamjav *et al.*, 2005). In addition, a single nucleotide polymorphism (SNP) in the EHV-1 gene (*ORF30*) encoding the viral DNA polymerase is strongly associated with outbreaks of neurological disease in horses (Nugent *et al.*, 2006). Despite these findings, *in-vitro* studies using cells from the mouse cerebral cortex have demonstrated that neuropathogenic electropherotype P strains exhibit similar growth kinetics to non-neuropathogenic P strains (Yamada *et al.*, 2008). Recent studies have indicated that *ORF37* is one of

the neuropathogenicity factors of EHV-1 in the mouse encephalitis model (Kasem *et al.*, 2010).

The aim of the present study was to characterize the neuropathogenicity of three Brazilian abortogenic EHV-1 strains in different inbred mouse models.

Materials and Methods

Viruses

The EHV-1 strains A4/72, A9/92 and A3/97 used in this study were isolated from aborted equine fetuses in Brazil. All isolates were confirmed to be EHV-1 by polymerase chain reaction (PCR) amplification and DNA sequencing of the unique transcriptional regulator genes (GenBank accession numbers EU094655 to EU094657). In addition, A4/72 and A3/97 were characterized as the non-neuropathogenic genotype (N₇₅₂) of EHV-1 via the DNA polymerase enzyme gene (*ORF30*) (GenBank accession numbers EU410444 and EU410445). Stock viruses were propagated in E-Derm cells (CCL-57, ATCC) provided by the Biological Institute, Sao Paulo, Brazil, and then maintained in Eagle's minimal essential medium (EMEM) supplemented with 10% fetal calf serum at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. EHV-1 strains A9/92 and A3/97 were passaged *in vitro* a maximum of three times and were consequently described as low-passage strains. EHV-1 strain A4/72 was propagated *in vitro* at passage number 14.

Mice

Eight-week-old female BALB/c (H2^d), BALB/c nude (H2^d), C57BL/6 (H2^b) and C3H/HeJ (H2^k) mice were obtained from the animal facility of the Department of Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil. All mice were acclimatized for 1 week before experimental manipulation and were housed at a temperature of 22–24°C, a humidity of 40–60% and a 12:12 h light:dark cycle in the animal facility of the Biological Institute. Experimental and control mice were housed separately in polycarbonate cages with filtered tops. Filtered and autoclaved water and commercial pellets were given *ad libitum*. All procedures were performed after approval from the Biological Institute Institutional Animal Care and Use Committee under protocol number 70/08 CE-TEA-IB.

The viral suspensions of the EHV-1 strains A4/72, A9/92 and A3/97 used for intranasal infection of mice were prepared in EMEM to provide 25 µl of inoculate containing 10³ TCID₅₀ of each virus. Mice were anaesthetized by intraperitoneal administration of an anaesthetic mixture containing ketamine (100 mg/kg) plus

xyzazine-hydrochloride (20 mg/kg) and were inoculated intranasally with 25 μ l of the viral suspension. For each virus tested, 16 mice were divided into groups of four animals of each strain. Four additional mice of each strain were treated identically with EMEM and used as controls. Mice were observed twice daily until 7 days post inoculation (dpi), at which point the experiments were terminated. The body weights of individual animals were recorded daily. Any mice showing signs of severe CNS disease (depression, immobility or seizures) were killed by administration of an overdose of anaesthetic.

Histopathology and Immunohistochemistry

Two mice from each group were perfused through the heart with a 0.9% NaCl solution containing EDTA followed by 10% neutral buffered formalin as the fixative. Tissue samples from the viscera and brain were collected, embedded in paraffin wax, sectioned (5 μ m) and stained with haematoxylin and eosin (HE). For immunohistochemistry (IHC), sections of brain (5 μ m) were dewaxed and antigen retrieval was performed with citrate buffer (pH 6.0) by heating in a microwave oven (750 W for 20 min) prior to incubation with the primary antibody. Incubation was performed in a humid chamber at 4°C overnight with a 1 in 2,000 dilution of goat antiserum specific for ERV/EHV-1 (VMRD, Pullman, Washington, USA), which was followed by incubation with biotinylated secondary antibody (combination anti-mouse, -rabbit and -goat immunoglobulin; Dako Cytomation, Carpinteria, California, USA) and incubation with streptavidin for 30 min at room temperature. After exposure to the appropriate chromogen (3, 3'-diaminobenzidine), the slides were counterstained with Mayer's haematoxylin and mounted under synthetic resin.

Virus Isolation and Identification

Virus isolation (VI) was attempted with tissue samples from the lungs, thymus, liver, spleen and brain collected at the time of necropsy examination at 3 dpi from two mice per group (Lara *et al.*, 2008). The specimens were cut into 1 mm³ pieces immediately after removal, dropped directly into liquid nitrogen and stored at -80°C. Homogenates of frozen tissue were prepared by maceration and were diluted to 20% w/v in serum-free EMEM. After centrifugation (1,200 g for 10 min) the supernatant was removed and a 1 ml volume was inoculated onto monolayers of E-Derm cells at 37°C for 1 h. At the end of the attachment period, cell monolayers were rinsed, re-fed with 6 ml EMEM containing 5% fetal calf serum and incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Cell cultures were examined daily for 7 days for the appearance of characteristic herpesvirus cytopathic effect (CPE) (i.e. rounding, increased refractility, detachment of cells, cytoplasmic stranding and formation of syncytia). One passage was used routinely for all cases and additional passages (maximum three) were used when primary isolation was unsuccessful. Lack of CPE after three passages in these cultures was interpreted as a negative isolation. When these cells exhibited CPE, the identification of isolates was performed by PCR using a pair of specific oligonucleotide primers (forward primer 5'-ACGCC CCCTTCGTTTCCTC-3' and reverse primer 5'-CGC TCCACCTCGGTCCTG-3') derived from an EHV-1 *ORF64* gene region (Borchers *et al.*, 1999).

DNA extraction of the culture samples was conducted as described by Chomczynski (1993). Amplification was performed in a reaction mixture of total volume 50 μ l containing 0.5 mg of DNA sample, 0.5 mM of each primer, 0.2 mM of each dNTP mixture, 2.5 units of Platinum Taq DNA polymerase

Fig. 1. Mice infected with neuropathogenic EHV-1 strains A4/72 and A9/92 at 3 dpi. (a) BALB/c mice show ruffled fur, hunched posture and crouch in corners. (b) C57BL/6 mice show spastic paralysis of the hindlimbs and tail.

Table 1
Virus isolation from mouse tissue and neurological signs 3 days after intranasal inoculation with EHV-1 strains A4/72, A9/92 and A3/97

EHV-1	Mouse strain	Lung	Liver	Spleen	Thymus	Brain	Neurological signs
A4/72	BALB/c	2/2*	2/2	2/2	2/2	2/2	Severe
	BALB/c nude	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	Severe
	C57BL/6	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	Severe
	C3H/HeJ	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	Severe
A9/92	BALB/c	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	Severe
	BALB/c nude	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	Severe
	C57BL/6	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	Severe
	C3H/HeJ	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	Severe
A3/97	BALB/c	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	No
	BALB/c nude	2/2	0/0	1/2	0/0	1/2	No
	C57BL/6	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	No
	C3H/HeJ	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	No

*Number of positive/number of examined mice.

(Invitrogen, Carlsbad, California, USA), $1 \times$ PCR buffer (20 mM of Tris-HCl pH 8.4, 50 mM of KCl), 1.5 mM of $MgCl_2$ and ultra-pure water QS.

Amplification was carried out in a thermal cycler (Eppendorf Mastercycler Gradient, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) under the following conditions: the DNA template was initially denatured at $94^\circ C$ for 4 min followed by 35 cycles of 30 sec denaturation at $94^\circ C$, 1 min primer annealing at $56^\circ C$ and 2 min extension at $72^\circ C$. Finally, the reaction was completed in a 10 min final extension step at $72^\circ C$. Amplified PCR products were analyzed by horizontal electrophoresis (100 V for 25 min) in a 1.5% agarose gel and visualized by 0.5 mg/ml ethidium bromide under ultraviolet light.

Statistical Analysis

The results were analyzed using a statistical software package (Graph Pad InStat version 3.01, 32 bit for Windows 95/NT). The data are presented as the mean value $\pm$ standard deviation. Each variable was tested for normality by applying the Kolmogorov and Smirnov method. Differences in the mean values of weight gain were compared using a one-way analysis of variance followed by a multiple comparison Tukey-Kramer test. The level of statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

Clinical Signs and Virus Isolation

Intranasal inoculation of the EHV-1 strains A4/72 and A9/92 induced disease in BALB/c, BALB/c nude, C57BL/6 and C3H/HeJ mice. The disease was characterized by loss of body weight and the onset of neurological signs at 3 dpi. These signs included ruffled fur, a hunched posture, crouching in corners, nasal and ocular discharge, dyspnoea, dehydration and increased salivation at the onset of disease. These were followed by increased reactivity to external stimulation, seizures, recumbency and death. C57BL/6 and C3H/HeJ mice also exhibited spastic paralysis of the hindlimbs and tail (Fig. 1, Supplementary Video S1). Virus was recovered consistently from the brain and viscera (i.e. lungs, liver, thymus and spleen) of all mice with neurological signs at 3 dpi associated with EHV-1 strains A4/72 and A9/92 (Table 1, Fig. 2). The statistical analyses did not show significant differences in weight loss between the BALB/c, BALB/c nude, C57BL/6 and C3H/HeJ mice infected with each EHV-1 strain (Fig. 3). At 3 dpi, mice inoculated with EHV-1 strains A4/72 and A9/92 showed

Fig. 2. (a) E-Derm cells 48 h post inoculation with EHV-1 mouse positive tissue showing cell rounding, syncytium formation and cytoplasmic stranding. (b) Virus identification performed by PCR: amplicons (410 base pairs [bp]) corresponding to the *ORF64* gene visualized in an ethidium bromide-stained agarose gel. Samples are from: A3/97 EHV-1 (lane 1), A9/92 EHV-1 (lane 2), A4/72 EHV-1 (lane 3) and a 100 bp DNA ladder marker (M) (lane 4).

Fig. 3. Weight gain (mean $\pm$ standard deviation) of different mouse strains (BALB/c, BALB/c nude, C57BL/6 and C3H/HeJ) infected with the EHV-1 strains A4/72, A9/92 and A3/97 at 3 dpi.

significant ($P < 0.001$) weight loss when compared with the control group and EHV-1 strain A3/97-infected mice (Fig. 4).

BALB/c, C57BL/6 and C3H/HeJ mice inoculated intranasally with EHV-1 strain A3/97 showed neither weight loss nor apparent clinical signs of disease. The virus was recovered from the lungs at 3 dpi, but not from the brain or other organs. The immunodeficient strain (BALB/c nude) showed mild conjunctivitis between 3 and 4 dpi and the virus was recovered from the lungs, brain and spleen at 3 dpi (Table 1).

Fig. 4. Weight gain (mean $\pm$ standard deviation) from groups of mice of four strains (BALB/c, BALB/c nude, C57BL/6 and C3H/HeJ) infected with the EHV-1 strains A4/72, A9/92 and A3/97 at 3 dpi and compared with the uninfected control group. • $P < 0.001$ versus control; * $P < 0.001$ versus A3/97.

Pathological Findings

Mice infected with EHV-1 strains A4/72 and A9/92 showed gross congestion and haemorrhage in the brain and meninges. Other gross findings included mild enlargement of the superficial cervical and mesenteric lymph nodes and spleen, pulmonary oedema and thymic atrophy. Microscopical changes consisted of leptomeningitis, focal haemorrhage, ventriculitis and neuronal degeneration as well as necrosis, neuronophagia, non-suppurative inflammation of the neuropil and multi-focal gliosis. In addition, perivascular infiltration of polymorphonuclear and mononuclear cells was observed in the brains of infected mice (Fig. 5). C3H/HeJ mice exhibited the most severe damage to neuronal tissue compared with the other mouse strains.

Hypertrophy of the alveolar septum, haemorrhage and infiltration of the interstitium by lymphocytes, neutrophils and macrophages was observed between 3 and 7 dpi in all lungs from mice inoculated with EHV-1 strains A4/72, A9/92 and A3/97.

No gross abnormalities or microscopical changes were observed in the brain or other organs, including liver, spleen and thymus of mice inoculated with EHV-1 strain A3/97.

Immunohistochemistry

Viral antigens were not detected immunohistochemically in the brains from the control group or mice inoculated with EHV-1 strain A3/97. However, EHV-1 antigen was detected in the brains of all mice inoculated with EHV-1 strains A4/72 and A9/92. Antigen was demonstrated in several cell types and was mainly localized to the cytoplasm, but was also intranuclear in some cells (Fig. 6).

Fig. 5. Sections of brain from mice infected with the neuropathogenic EHV-1 strains A4/72 and A9/92 at 3 dpi. (a) Leptomeningitis with perivascular infiltration of polymorphonuclear and mononuclear cells. (b) Focal glial cell reaction. (c) Neuronophagia with neuronal degeneration and necrosis. (d) Perivascular cuffing. (e) Perivascular haemorrhage. (f) Thrombosis. HE.

Discussion

The results of the present study show that the onset and severity of clinical signs in mice infected intranasally with EHV-1 varies according to the pathogenicity of the inoculating virus. Consistent with other reports (Awan *et al.*, 1990; Galosi *et al.*, 2004), strain A3/97 (low virulence) produced a mild respiratory infection of short duration, which was confirmed by the development of lesions in the lungs and VI. In contrast, mice inoculated intranasally with the highly virulent strains A4/72 and A9/92 became

seriously ill and died at 3–4 dpi. Although there were differences in the ability of each virus strain to cause clinical disease, once clinical disease was established and allowed to run its course, there was little or no difference with respect to the susceptibility of each mouse strain.

Mice infected with EHV-1 strains A4/72 and A9/92 exhibited severe neurological signs followed by death after intranasal administration of virus. Other authors have demonstrated mild respiratory symptoms (Awan *et al.*, 1990; Baxi *et al.*, 1996; Bartels *et al.*, 1998; Frampton *et al.*, 2004) and even death or

Fig. 6. Immunohistochemical expression of ERV/EHV-1. (a) Labelled cells in the olfactory bulb and (b) hippocampus of mice infected with the neuropathogenic EHV-1 strains A4/72 and A9/92.

brain lesions without the observation of any neurological signs in mice inoculated intranasally with EHV-1 (Gosztonyi *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2010). Clinical signs in mice could be used to distinguish between pathogenic and non-pathogenic EHV-1 strains isolated from horses (van Woensel *et al.*, 1995; Galosi *et al.*, 2004).

All mice developed severe non-suppurative meningoencephalitis and 100% mortality by 3–4 dpi following intranasal inoculation with strains A4/72 and A9/92. The acute lesions in the brain induced by these two highly virulent EHV-1 strains indicated viral neurotropism and neurovirulence following intranasal inoculation. Neuronal infection resulted in cell death and diffuse encephalitis, which was confirmed by detection of viral antigen in the brain by IHC. These findings suggest that histopathological changes might be related directly to the neurovirulence of EHV-1, which may have an enhanced capacity to invade and replicate within the CNS (Hasebe *et al.*, 2002a, b). It is of note that the histopathological changes found in the brains of sick animals were similar to those already described in mice inoculated intranasally with EHV-1 (Gosztonyi *et al.*, 2009; Kasem *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010). However, the mice in the present study displayed marked neurological signs, which were very similar to those observed in hamsters inoculated with EHV-9 (Fukushi *et al.*, 2000).

The present findings suggested that viral migration occurred over the course of infection. The virus moved from the nasal mucosa by neural dissemination via the olfactory bulb and ventricular surface, thereby leading to neuronal degeneration, mainly in cortical areas and the hippocampus, with an associated generalized ventriculitis.

The acute meningoencephalitis was exacerbated in C57BL/6 and C3H/HeJ mice compared with BALB/c and BALB/c nude mice, which was probably due to

differences in the immune response made by the various strains of mouse. C57BL/6 and C3H/HeJ mice exhibit predominantly T helper (Th) 1-type responses characterized by production of the cytokines interleukin (IL)-2, interferon (IFN)- γ and tumour necrosis factor (TNF)- β , which are associated with cell-mediated immunity. By contrast, BALB/c mice develop a typical Th2-type response characterized by production of IL-4 and IL-5 that is related to a humoral response (Alber *et al.*, 2000). As described previously, infected C3H mice generated higher T-cell proliferative responses and higher concentrations of serum virus neutralizing antibodies than did BALB/c mice infected with EHV-1 (Alber *et al.*, 1995).

Virus was recovered only from the lungs of BALB/c, C57BL/6 and C3H/HeJ mice inoculated with the A3/97 strain, indicating that the infection was restricted to the respiratory tract in those mice. By contrast, EHV-1 was detected in the lungs, brain and spleen of A3/97-infected BALB/c nude mice, demonstrating that the lack of functional T lymphocytes enhanced viral spread to the peripheral organs and brain after intranasal inoculation. Despite the recovery of virus from the brains of some immunodeficient mice, no neurological signs were observed that would indicate that the A3/97 strain was neuroinvasive, but not neurovirulent, following intranasal inoculation. In contrast, the neuropathogenic EHV-1 A4/72 and A9/92 strains caused less severe lesions in the brains of BALB/c nude than in other mice strains, thereby demonstrating that host immunity plays a major role in the CNS inflammatory response and contributes to the development of viral encephalitis.

Although the Brazilian EHV-1 strains A4/72 and A3/97 have been characterized as non-neuropathogenic genotypes (N_{752}) of the EHV-1 DNA polymerase enzyme gene (*ORF30*), they exhibit different levels of virulence following intranasal

inoculation in mice. These results suggest that other factors could be involved in the neuropathogenicity of EHV-1 in these mouse models. This hypothesis was supported by later studies based on experimental infections using a mutant EHV-1 strain with an *ORF37* deletion (Kasem *et al.*, 2010).

The pathological changes observed in the brains of mice inoculated intranasally with EHV-1 were not identical to those of EHV-1-induced myeloencephalopathy in horses (Smith *et al.*, 2000). The characteristic lesions in horses infected with EHV-1 are vasculitis of small vessels and thrombosis, resulting in ischaemic damage to the CNS. Although EHV-1 in horses is not considered primarily neurotropic, it has also been reported that viruses can induce lesions in neurons and astrocytes (Schultheiss *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 2000). In contrast, the presence of haemorrhage, inflammation of neurons and glial cells, vasculitis with perivascular mononuclear and polymorphonuclear cuffing, as well as thrombosis, found in the brains of mice infected with A4/72 and A9/92, was consistent with lesions found in the brain of horses naturally infected with EHV-1. Furthermore, similarities between the disease in the mouse and the horse make this an attractive model for elucidating the neurological changes associated with EHV-1 infection.

In conclusion, the results of the present study have shown that the Brazilian EHV-1 strains A4/72, A9/92 and A3/97 have distinct degrees of virulence and tissue tropism in mice. In contrast to other EHV-1 strains described previously, the A4/72 and A9/92 strains exhibited a higher tropism towards the CNS and increased neurovirulence. Experimental infection of different inbred mouse strains with neuropathogenic EHV-1 strains is therefore useful for studying the pathogenesis and mechanisms involved in equine herpesvirus myeloencephalopathy. Further studies of neurovirulence factors are required to clarify the relationship between molecular variation and enhanced virulence in this mouse model, which may help elucidate the neuropathogenicity of particular strains of EHV-1.

Acknowledgments

This work was supported by the Sao Paulo Research Foundation (FAPESP) Grant numbers 2009/51886-3 and 2007/58861-0 and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) Grant number 473735/2008-3. The first two authors contributed equally to this work.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Supplementary data

Supplementary material associated with this article can be found in online version at doi:10.1016/j.jcpa.2011.04.003.

References

- Alber D, Greensill J, Killington R, Stokes A (1995) 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*, **59**, 205–213.
- Alber D, Killington R, Stokes A (2000) 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*, **19**, 895–901.
- Allen GP, Bryans J (1986) Molecular epizootiology, pathogenesis, and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. *Progress in Veterinary Microbiology and Immunology*, **2**, 78–144.
- Allen GP, Yeargan MS, Turtinen MS, Bryans JT, McCollum WH (1983) Molecular epizootologic studies of equine herpesvirus-1 by restriction endonuclease fingerprinting of viral DNA. *American Journal of Veterinary Research*, **44**, 263–271.
- Awan A, Chong Y, Field H (1990) The pathogenesis of equine herpesvirus type-1 in the mouse: a new model for studying host responses to the infection. *Journal of General Virology*, **71**, 1131–1140.
- Bartels T, Steinbach F, Hahn G, Ludwig H, Borchers K (1998) In situ study on the pathogenesis and immune reaction of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) infections in mice. *Immunology*, **93**, 329–334.
- Baxi M, Borchers K, Bartels T, Schellenbach A, Baxi S *et al.* (1996) Molecular studies of the acute infection, latency and reactivation of equine herpesvirus-1 (EHV-1) in the mouse model. *Virus Research*, **40**, 33–45.
- Borchers K, Wolfinger U, Schellenbach A, Lawrenz B, Glitz F *et al.* (1999) Equine herpesvirus type-1 and trigeminal ganglia of naturally infected horses: detection of DNA and latency associated transcripts. In: *Proceedings of the Eighth International Conference on Equine Infectious Diseases*, Dubai, pp. 147–152.
- Chomczynski P (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, **15**, 532–537.
- Frampton AR, Smith PM, Zhang YF, Grafton WD, Matsumura T *et al.* (2004) Meningoencephalitis in mice infected with an equine herpesvirus-1 strain KyA recombinant expressing glycoprotein I and glycoprotein D. *Virus Genes*, **29**, 9–17.
- Fukushi H, Taniguchi A, Yasuda K, Yanai T, Masegi T *et al.* (2000) A hamster model of equine herpesvirus-9 induced encephalitis. *Journal of Neurovirology*, **6**, 314–319.
- Galosi CM, Barbeito CG, Roza MVV, de la Paza VC, Ayala MA *et al.* (2004) Argentine strain of equine herpesvirus-1 isolated from an aborted foetus shows

- low virulence in mouse respiratory and abortion models. *Veterinary Microbiology*, **103**, 1–12.
- Galosi CM, Norimine J, Echeverría MG, Oliva GA, Noretto EO *et al.* (1998) Diversity of genomic electrophoretotypes of naturally occurring equine herpesvirus-1 isolates in Argentina. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **31**, 771–774.
- Gosztonyi G, Borchers K, Ludwig H (2009) Pathogenesis of equine herpesvirus-1 infection in the mouse model. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, **117**, 10–21.
- Gryspeerd AC, Vandekerckhove AP, Garré B, Barbé F, Van de Walle GR *et al.* (2010) Differences in replication kinetics and cell tropism between neurovirulent and non-neurovirulent EHV-1 strains during the acute phase of infection in horses. *Veterinary Microbiology*, **142**, 242–253.
- Hasebe R, Kimura T, Nakamura K, Okazaki K, Ochiai K *et al.* (2002a) Passage of equine herpesvirus-1 in suckling mouse brain enhances extraneural virus growth and subsequent hematogenous neuroinvasion. *Journal of Veterinary Medical Science*, **64**, 907–912.
- Hasebe R, Kimura T, Sato E, Okazaki K, Ochiai K *et al.* (2002b) Equine herpesvirus-1-induced encephalomyelitis in mice: a comparative study of neuroadapted virus and its parental strain. *Journal of Comparative Pathology*, **127**, 118–125.
- Kasem S, Yu MH, Yamada S, Kodaira A, Matsumura T *et al.* (2010) The ORF37 (UL24) is a neuropathogenicity determinant of equine herpesvirus-1 (EHV-1) in the mouse encephalitis model. *Virology*, **400**, 259–270.
- Lara MCCSH, Cunha EMS, Villalobos EMC, Nassar AFC, Asano KM *et al.* (2008) First isolation of equine herpesvirus type 1 from a horse with neurological disease in Brazil. *Arquivos do Instituto Biológico*, **75**, 221–224.
- Mori CMC, Mori E, Fernandes WR, Lara MCCSH, Massironi SMG *et al.* (2006) Brazilian isolates of equid herpesvirus type 1 show neurotropism and neurovirulence in mouse model. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, **45**, 130.
- Nugent J, Birch-Machin I, Smith KC, Mumford JA, Swann Z *et al.* (2006) Analysis of equid herpesvirus-1 strain variation reveals a point mutation of the DNA polymerase strongly associated with neuropathogenic versus non-neuropathogenic disease outbreak. *Journal of Virology*, **80**, 4047–4060.
- Pagamjav O, Sakata T, Matsumura T, Yamaguchi T, Fukushi H (2005) Natural recombinant between equine herpesviruses-1 and -4 in the *ICP4* gene. *Microbiology and Immunology*, **49**, 167–179.
- Schultheiss P, Collins J, Hotaling S (1997) Immunohistochemical demonstration of equine herpesvirus-1 antigen in neurons and astrocytes of horses with acute paralysis. *Veterinary Pathology*, **34**, 52–54.
- Slater J, Gibson J, Field H (1993) Pathogenicity of a thymidine kinase-deficient mutant of equine herpesvirus-1 in mice and specific pathogen-free foals. *Journal of General Virology*, **74**, 819–828.
- Smith K, Whitwell K, Mumford J, Hannant D, Blunden A *et al.* (2000) Virulence of the V592 isolate of equid herpesvirus-1 in ponies. *Journal of Comparative Pathology*, **122**, 288–297.
- van Woensel P, Goovaerts D, Markx D, Visser N (1995) A mouse model for testing the pathogenicity of equine herpes virus-1 strains. *Journal of Virological Methods*, **54**, 39–49.
- Vandekerckhove AP, Glorieux S, Gryspeerd AC, Steukers L, Duchateau L *et al.* (2010) Replication kinetics of neurovirulent versus non-neurovirulent equine herpesvirus type 1 strains in equine nasal mucosal explants. *Journal of General Virology*, **91**, 2019–2028.
- Walker C, Love D, Whalley J (1999) Comparison of the pathogenesis of acute equine herpesvirus 1 (EHV-1) infection in the horse and the mouse model: a review. *Veterinary Microbiology*, **68**, 3–13.
- Yamada S, Matsumura T, Tsujimura K, Yamaguchi T, Ohya K *et al.* (2008) Comparison of the growth kinetics of neuropathogenic and non-neuropathogenic equid herpesvirus type 1 (EHV-1) strains in cultured murine neuronal cells and the relevance of the D/N(752) coding change in DNA polymerase gene (*ORF30*). *Journal of Veterinary Medical Science*, **70**, 505–511.
- Yu M, Kasem S, Tsujimura K, Matsumura T, Yanai T *et al.* (2010) Diverse pathogenicity of equine herpesvirus 1 (EHV-1) isolates in CBA mouse model. *Journal of Veterinary Medical Science*, **72**, 301–306.

[Received, February 14th, 2011]
 [Accepted, April 12th, 2011]