

LEONARDO PEREIRA MESQUITA

Avaliação da resposta imune e inflamatória na encefalite experimentalmente induzida em camundongos pela infecção pelo vírus da estomatite vesicular e herpesvírus bovino tipo 5

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 a obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Paulo César Maiorka

São Paulo

2016

RESUMO

MESQUITA, L. P. **Avaliação da resposta imune e inflamatória na encefalite experimentalmente induzida em camundongos pela infecção pelo vírus da estomatite vesicular e herpesvírus bovino tipo 5** [Evaluation of immune and inflammatory responses in experimentally induced encephalitis in mice caused by vesicular stomatitis virus and bovine herpesvirus type 5]. 2016. 95 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

O presente trabalho compreende o estudo da resposta imune e inflamatória no sistema nervoso central (SNC) de camundongos ou ratos-veadeiros (*Peromyscus maniculatus*) frente a infecção por dois diferentes tipos de vírus neurotrópicos, o vírus da estomatite vesicular (VEV) e o herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5). Na primeira etapa, foi avaliada a função das células residentes do SNC no tocante à expressão de quimiocinas durante a infecção pelo VEV em ratos-veadeiros. No presente estudo, durante a encefalite causada pelo vírus da estomatite vesicular sorotipo *New Jersey* (VEVNJ) em ratos-veadeiros, as quimiocinas RANTES e MCP-1 foram expressas somente no bulbo olfatório (BO), local onde o vírus estava restrito. A expressão de quimiocinas foi seguida de um influxo de células inflamatórias no BO tardiamente no curso da doença aguda. A quimiocina RANTES foi expressa por neurônios, astrócitos e micróglia, ao passo que MCP-1 foi expressa por neurônios e astrócitos. Embora os astrócitos e a micróglia tenham respondido à infecção pelo VEVNJ ao expressarem quimiocinas, os neurônios foram o principal tipo celular infectado pelo vírus. Portanto, os neurônios infectados podem exercer um papel crucial na geração da resposta imune no BO. A sinalização entre neurônios e outras células residentes do SNC muito provavelmente é o mecanismo pelo qual os astrócitos e micróglia são ativados durante a encefalite causada pelo VEVNJ. Os resultados aqui apresentados, também indicam que a expressão de RANTES e MCP-1 no BO de ratos-veadeiros infectados pelo VEVNJ pode ajudar a prevenir a disseminação do vírus para outras áreas do SNC. Na segunda etapa, foi avaliada a susceptibilidade de camundongos isogênicos BALB/c frente à infecção pelo BoHV-5 em camundongos isogênicos BALB/c em diferentes dias pós-inoculação (DPI). O BoHV-5 quando inoculado pela via intracraniana foi capaz de infectar e se replicar no SNC de camundongos BALB/c. Entretanto, até o momento avaliado (15 DPI), os

animais sobreviveram a infecção sem apresentar sinais neurológicos evidentes. A infecção foi acompanhada de uma resposta imune do tipo Th1 importante, com expressão significativa das citocinas IFN- γ e TNF- α , e quimiocina CCL-2. A expressão das citocinas e quimiocinas se deu principalmente no início da infecção (3 e 4 DPI), a qual foi seguida por uma meningo-encefalite com manguitos perivasculares e periventriculite, compostas predominantemente por macrófagos e linfócitos. Após a expressão significativa das citocinas e quimiocina, os animais foram capazes de debelar a infecção aguda, uma vez que partículas virais viáveis não foram detectadas após o 6 DPI. Entretanto, o BoHV-5 foi capaz de infectar o gânglio trigeminal, uma vez que grande quantidade de DNA de BoHV-5 foi detectada no 3 DPI, o que foi confirmado pela presença de antígenos virais no citoplasma de neurônios do gânglio trigeminal de camundongos BALB/c infectados.

Palavras-chave: Citocinas. Neuro-inflamação. Quimiocinas. Sistema nervoso central.

ABSTRACT

MESQUITA, L. P. **Evaluation of immune and inflammatory responses in experimentally induced encephalitis in mice caused by vesicular stomatitis virus and bovine herpesvirus type 5.** [Avaliação da resposta imune e inflamatória na encefalite experimentalmente induzida em camundongos pela infecção pelo vírus da estomatite vesicular e herpesvírus bovino tipo 5]. 2016. 95 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The present work comprises the study of immune and inflammatory responses in the central nervous system (CNS) of mice or deer mice (*Peromyscus maniculatus*) during infection by two different neurotropic viruses, the vesicular stomatitis virus (VSV) and bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5). In the first part, the role of CNS resident cells regarding chemokine expression in deer mice infected with VSV was evaluated. Here, we demonstrated that during vesicular stomatitis New Jersey virus (VSNJV) encephalitis in deer mice, chemokines RANTES and MCP-1 are expressed only in the olfactory bulb (OB), where the virus was restricted. This chemokine expression was followed by the influx of inflammatory cells to the OB later in the course of acute disease. Neurons, astrocytes and microglia expressed RANTES, whereas MCP-1 was expressed by neurons and astrocytes. Although astrocytes and microglia responded to VSNJV infection by expressing chemokines, neurons were the predominantly infected cell type. Therefore, infected neurons may have a critical role in initiating an immune response in the OB. The signaling between neurons and other CNS resident cells is most likely the mechanism by which astrocytes and microglia are activated during the course of VSV encephalitis. Our results also indicate that the expression of RANTES and MCP-1 in the OB of deer mice infected with VSNJV might help prevent the spread of VSNJV to other areas of CNS. In the second part of the study, the susceptibility of isogenic BALB/c mice to BoHV-5 infection was evaluated in different days post-inoculation (DPI). BoHV-5, when inoculated through intracranial route, was able to infect and replicate within the CNS of BALB/c mice. However, until the evaluated time (15 DPI), the mice was able to survive without showing prominent neurological signs. The infection was accompanied by an important Th1 immune response, with a significant expression of the cytokines IFN- γ

and TNF- α , and chemokine CCL-2. The expression of these cytokines and chemokines was detected mainly on the early course of infection (3 and 4 DPI), and was followed by a meningoencephalitis with perivascular cuffing and periventriculitis, composed mainly by macrophages and lymphocytes. After the expression of cytokines and chemokine, the mice were able to curb BoHV-5 acute infection, since viable viral particles were not detected after 6 DPI. However, BoHV-5 was able to infect the trigeminal ganglia, since a large number of BoHV-5 DNA copies was detected on 3 DPI, which was confirmed by the presence of viral antigens within the cytoplasm of neurons in the trigeminal ganglia of infected BALB/c mice.

Keywords: Cytokines. Neuroinflammation. Chemokines. Central nervous system.

1 INTRODUÇÃO GERAL

O presente trabalho compreende o estudo da resposta imune e inflamatória no sistema nervoso central (SNC) de camundongos ou ratos-veadeiros (*Peromyscus maniculatus*) frente a infecção por dois diferentes tipos de vírus neurotrópicos, o vírus da estomatite vesicular (VEV) e o herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5). Portanto, o presente trabalho será dividido e apresentado na forma de artigos científicos de acordo com o tipo de agente etiológico (VEV ou BoHV-5) e modelos animais (camundongos isogênicos BALB/c ou ratos-veadeiros) estudados.

Primeiramente, no capítulo 2, será apresentado um artigo científico, intitulado “Cinética da expressão de RANTES e MCP-1 no sistema nervoso central de ratos-veadeiros (*Peromyscus maniculatus*) infectados pelo vírus da estomatite vesicular”. Este estudo teve como objetivo avaliar a cinética de expressão de quimiocinas no SNC de ratos-veadeiros infectados pela via intranasal com o VEV, bem como avaliar a participação das células gliais (neurônios, astrócitos e micróglia) no desenvolvimento da encefalite. A expressão de quimiocinas foi correlacionada com a distribuição viral e com o infiltrado inflamatório no SNC. Neste estudo foi realizada a expressão por meio de imuno-histoquímica das quimiocinas: *chemokine monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) também conhecida como *C-C motif ligand 2* (CCL2), e RANTES (*regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted*), também conhecida como CCL5. A participação das células gliais no tocante a expressão de quimiocinas durante a infecção pelo VEV neste modelo foi avaliada por meio de dupla-imunofluorescência (microscopia confocal).

O segundo trabalho resultante do estudo da patogênese da infecção pelo VEV em ratos-veadeiros será apresentado na forma de artigo científico. Este artigo foi publicado no periódico *Veterinary Pathology* e o mesmo será aqui apresentado integralmente, como foi publicado, na seção Apêndice, capítulo 2. Este artigo é intitulado de “Pathogenesis of Vesicular Stomatitis New Jersey Virus Infection in Deer Mice (*Peromyscus maniculatus*) Transmitted by Black Flies (*Simulium vittatum*)”. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a susceptibilidade de ratos-veadeiros (*Peromyscus maniculatus*) jovens e lactentes frente a infecção causada pelo VEV (sorotipo *New Jersey*) transmitido por moscas hematófagas (*Simulium vittatum*), bem como a habilidade destes camundongos infectados em transmitir o

VEV para moscas não infectadas. Este artigo resalta também a neuropatogênese da infecção causada pelo VEV descrevendo a cinética da evolução das lesões no SNC, bem como a distribuição viral. Os estudos relacionados a patogênese da infecção pelo VEV em ratos-veadeiros foram realizados em colaboração com pesquisadores do *Department of Pathology, University of Georgia, Athens, GA*.

O presente trabalho também teve como objetivo descrever os estudos referentes a infecção pelo BoHV-5 em camundongos. Este será apresentado na forma de artigo científico, capítulo 3, o qual é intitulado de “Avaliação da resposta imune e inflamatória no sistema nervoso central de camundongos infectados pelo herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5)”. Este artigo teve como objetivo avaliar a resposta imune do SNC de camundongos BALB/c recém-desmamados frente a infecção pelo BoHV-5, bem como a avaliar a capacidade de neuro-invasividade, neuropatogenicidade e replicação do BoHV-5 no SNC destes camundongos. Este artigo irá elucidar alguns aspectos relacionados a infecção pelo BoHV-5 em camundongos BALB/c, uma vez que não existem dados sólidos na literatura científica internacional a respeito da resposta imune e cinética da infecção nestes animais.

4 CONCLUSÃO GERAL

As quimiocinas RANTES (CCL-5) e MCP-1 (CCL-2) são expressas por diferentes células residentes do sistema nervoso central (SNC) no bulbo olfatório (BO) durante a infecção causada pelo vírus da estomatite vesicular sorotipo *New Jersey* (VEVNJ) em ratos-veadeiros. Neurônios, astrócitos e micróglia expressaram RANTES, ao passo que MCP-1 foi expresso por neurônios e astrócitos. A disseminação viral nos neurônios do BO procedeu a expressão destas quimiocinas, demonstrando que os neurônios infectados exercem um papel importante na iniciação da resposta imune no BO. Apesarem de não estarem significativamente infectados pelo VEVNJ, os astrócitos e a micróglia também responderam à infecção ao expressarem quimiocinas.

O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) foi capaz de infectar e se replicar no SNC de camundongos BALB/c por meio da via intracraniana. Entretanto, os camundongos infectados foram capazes de debelar a infecção aguda, o que estava associado a uma resposta imune do tipo Th1, com expressão das citocinas IFN- γ , TNF- α , além da quimiocina CCL-2. A expressão destas citocinas e quimiocina, principalmente no início da infecção (3 e 4 DPI), muito provavelmente contribuíram para o desenvolvimento da encefalite e para a eliminação do vírus, uma vez que partículas virais viáveis não foram detectadas após o 6 DPI. Apesar dos camundongos infectados terem eliminado o BoHV-5 durante a infecção aguda, grande quantidade do DNA de BoHV-5 foi detectada no gânglio trigeminal no 3 DPI, confirmado pela presença de antígenos virais no citoplasma de neurônios no 6 DPI. Estes resultados demonstram que o BoHV-5 possivelmente estabelece uma infecção latente no gânglio trigeminal em camundongos BALB/c.

REFERÊNCIAS

ABRIL, C.; ENGELS, M.; LIMAN, A.; HILBE, M.; ALBINI, S.; FRANCHINI, M.; SUTER, M.; ACKERMAN, M. Both viral and host factors contribute to neurovirulence of Bovine Herpesviruses 1 and 5 in Interferon Receptor-deficient mice. **Journal of Virology**, v. 78, n. 7, p. 3644-3653, 2004.

ASENSIO, V. C.; CAMPBELL, I. L. Chemokines in the CNS: plurifunctional mediators in diverse states. **Trends in Neuroscience**, v. 22, n. 11, p. 504-512, 1999.

BELTRÃO, N.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; SILVA, A. M.; ROEHE, P. M.; IRIGOYEN, L. F. Infecção e enfermidade neurológica pelo herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5): coelhos como modelo experimental. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 4, p. 144-150, 2000.

CANTIN, E. M.; HINTON, D. R.; CHEN, J.; OPENSHAW, H. Gamma interferon expression during acute and latent nervous system infection by herpes simplex virus type 1. **Journal of Virology**, v. 69, n. 8, p. 4898-4905, 1995.

DEL MÉDICO ZAJAC, M. P.; LADELFA, M. F.; KOTSIAS, F.; MUYLKENS, B.; THIRY, J.; THIRY, E.; ROMERA, S. A. Biology of bovine herpesvirus 5. **The Veterinary Journal**, v. 184, p. 138-145, 2010.

DIALLO, I. S.; CORNEY, B. G.; RODWELL, B. J. Detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 using a *multiplex* real-time polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v. 175, n. 1, p. 46-52, 2011

HUBNER, S. O.; PESCADOR, C.; COBERLLINI, L. G.; DRIEMEIER, D.; SPILKI, F. R.; ROEHE, P. M. Otimização da imuno-histoquímica para detecção de herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5) em tecidos do sistema nervoso central fixados em formaldeído. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 1, p. 1-6, 2005.

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, p. 6913-6922, 2011.

MACHADO, G. F.; BERNARDI, F.; HOSOMI, F. Y. M.; PEIRÓ, J. R.; WEIBLEN, R.; ROEHE, P. M.; ALESSI, A. C.; MELO, G. D.; RAMOS, A. T.; MAIORKA, P. C. Bovine

herpesvirus-5 infection in a rabbit experimental model: immunohistochemical study of cellular response in the CNS. **Microbial pathogenesis**, v. 57, p. 10-16, 2013.

MAYER, S. V.; QUADROS, V. L.; VOGEL, F. S. F.; WINKELMAN, E. R.; AREHART, S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Dexamethasone-induced reactivation of bovine herpesvirus type 5 latent infection in experimentally infected rabbits results in a broader distribution of latent viral DNA in the brain. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 3, p. 335-343, 2006.

MORI, C. M. C.; MORI, E.; FAVARO, L. L.; SANTOS, C. R.; LARA, M. C. C. S. H.; 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, p. 202-210, 2012.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Guide for the care and use of laboratory animals**. 8th ed. Washington D.C.: National Academy Press, 2010. 248 p.

PEREZ, S. E.; BRETSCHEIDER, G.; LEUNDA, M. R.; OSORIO, F. A.; FLORES, E. F.; ODEÓN, A. C. Primary infection, latency and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. **Veterinary Pathology**, v. 39, n. 4, p. 437-444, 2002.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **The American Journal of Hygiene**, v. 27, p. 493-497, 1938.

RENNO, T.; KRAKOWSKI, M.; PICCIRILLO, C.; LIN, J. Y.; OWENS, T. TNF-alpha by resident microglia and infiltrating leukocytes in the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis. Regulation by Th1 cytokines. **The Journal of Immunology**, v. 154, p. 944-953.

RISSI, D. R.; BARROS, C. S. L. Necrotizing meningoencephalitis in a cow. **Veterinary Pathology**, v. 50, n. 5, p. 926-929, 2013.

SILVA, A. M.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; CANTO, M. C.; IRIGOYEN, L. F.; ROEHE, P. M.; SOUZA, R.S. Pathogenesis of meningoencephalitis in rabbits by bovine herpesvirus type-5 (BHV-5). **Revista Brasileira de Microbiologia**, v. 30, p. 22-31, 1999.

STEIBEL, J. P.; POLETTO, R.; COUSSENS, P. M.; ROSA, G. J. M. A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. **Methods**, v. 94, p. 146-152, 2009.

VOGEL, F. S. F.; CARON, L.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; WINKELMAN, E. R.;
MAYER, S. V.; BASTOS, R. G. Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the
central nervous systems of latently, experimentally infected calves. **Journal of
Clinical Microbiology**, v. 41, n. 10, p. 4512-4520, 2003.