

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Patologia

Daniele Gonçalves da Silva

**ESTUDOS DOS MECANISMOS ASSOCIADOS ÀS ALTERAÇÕES
CLINICOPATOLÓGICAS, PARÂMETROS IMUNES E ASPECTOS
NEUROQUÍMICOS NA INFECÇÃO POR HERPESVÍRUS
BOVINO 5 (BOHV-5) NO MODELO MURINO**

Belo Horizonte

2020

Daniele Gonçalves da Silva

**ESTUDOS DOS MECANISMOS ASSOCIADOS ÀS ALTERAÇÕES
CLINICOPATOLÓGICAS, PARÂMETROS IMUNES E ASPECTOS
NEUROQUÍMICOS NA INFECÇÃO POR HERPESVÍRUS
BOVINO 5 (BOHV-5) NO MODELO MURINO**

Tese apresentada ao Programa de Doutorado em Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Patologia Investigativa.

Orientadora: Profa. Dra. Milene Alvarenga Rachid

Coorientadora: Profa. Dra. Aline Silva de Miranda

Belo Horizonte

2020

Silva, Daniele Gonçalves da.
SI586e Estudos dos mecanismos associados às alterações clinicopatológicas, parâmetros imunes e aspectos neuroquímicos na infecção por Herpesvírus Bovino 5 (BoHV-5) no modelo murino [manuscrito]. / Daniele Gonçalves da Silva. - - Belo Horizonte: 2021. 107f.: il.
Orientador (a): Milene Alvarenga Rachid.
Área de concentração: Patologia.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Apoptose. 2. Gliose. 3. Meningoencefalite. 4. Herpesvírus Bovino 5. 5. Fatores de Crescimento Neural. 6. Dissertação Acadêmica. I. Rachid, Milene Alvarenga. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

NLM: QW 165.5.H3

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697


FOLHA DE APROVAÇÃO

**“ESTUDOS DOS MECANISMOS ASSOCIADOS ÀS ALTERAÇÕES
CLINICOPATOLÓGICAS, PARÂMETROS IMUNES E ASPECTOS
NEUROQUÍMICOS NA INFECÇÃO POR HERPESVÍRUS BOVINO 5 (BOHV-5)
NO MODELO MURINO”**

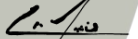
DANIELE GONÇALVES DA SILVA

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Patologia, como requisito para obtenção do grau de **Doutor em PATOLOGIA**, área de concentração **PATOLOGIA INVESTIGATIVA**.

Aprovada em 19 de março de 2020, pela banca constituída pelos membros:



Prof.^a Eliana Cristiana de Brito Toscano
ICB/UFMG



Prof. Enio Ferreira
ICB/UFMG



Prof.^a Grazielle Mara Ferreira Costa
Fundação Educação para o Trabalho de Minas Gerais



Prof. Thiago Henrique Caldeira de Oliveira
Faculdade de Ciências Médicas de Minas Gerais



Prof.^a Aline Silva de Miranda
ICB/UFMG - COORIENTADORA



Prof.^a Milene Alvarenga Rachid
ICB/UFMG - ORIENTADORA

Belo Horizonte, 19 de março de 2020.

DEDICATÓRIA

A Deus pelo dom da vida,

Aos meus pais Nadir e Jovenil,

As amigas e equipe do Laboratório de Patologia Molecular e Celular

“Porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas,
a Ele seja a glória eternamente.”

Romanos 11:36

"Se não podes voar, corra, se não podes correr, ande,
se não podes andar, rasteje, mas seja como for,
você precisa seguir em frente.”

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

Passaram-se quatro anos, alegrias, tristezas, encontros e muitas emoções diárias, de tudo ficará o conhecimento e a amizade. Espero ter marcado positivamente as pessoas ao meu redor e contribuído para a universidade, venho agradecer aqueles que me ajudaram no decorrer destes anos.

Sendo clichê, mas o primeiro vai para **Ele**, que me deu vida, a exatos dez anos estava no Hospital São Lucas, entre a vida e a morte, mesmo com o carinho e cuidado de excelentes profissionais da saúde, foi Deus que me permitiu continuar o caminho nesta Terra, para viver tudo isso, por isso agradeço pelo Tempo e pela dádiva da Vida!

Meus pais Nadir e Jovenil são exemplos de honestidade, dedicação, como abriram mão de tantas coisas para dar duas coisas muito importantes a Fé e o Conhecimento, sempre me incentivaram aos estudos e trabalharam muito para que pudesse ter o que tenho hoje, AMO VOCÊS!!!

Meu irmão Thiago mesmo estando tão tão distante, mas sempre salvando a pátria!

Meus familiares, primos, tias, tios, são muitos! Obrigada por fazer parte dessa conquista que é de cada um de vocês também.

A Professora e Orientadora Milene Alvarenga Rachid, pessoa admirável, simples, excelente profissional, não tenho palavras para agradecer por tudo o que fez por mim no mestrado e agora no doutorado, tenho orgulho de ter sido orientada por você. Mesmo com minhas dificuldades e limitações sempre acreditou em mim e me colocou para frente. Todas nós tivemos o privilégio de sermos orientadas por alguém que realmente se importa conosco e de sermos excelentes no que fazemos. Espero que continue assim, alguém que se importa com o ser humano, que pensa no coletivo. Agradeço pela amizade e respeito! Amo você de coração!

Colegas e amigos da pós, conheci muitas pessoas que espero levar comigo para o resto da vida. Muitas risadas e conversas nos corredores, na copa, que faziam o dia ficar mais leve quando as coisas não estavam tão bem assim, Adriano, Ramon, Igor, Mayra, Barbara, Marcela, meu muito obrigada.

As Amigas do Laboratório de Patologia Molecular e Celular,

Edna como tenho saudades! Sempre tentando inventar algo para melhorar nossos experimentos, uma verdadeira cientista!

Eliana obrigada pelo apoio, profissionalismo, seus conhecimentos, pelos cafés e lanches, espero que você colha os frutos do seu esforço e dedicação.

Quezya uma grande amizade que fiz em uma das disciplinas e acabou vindo para o mesmo laboratório, têm sido fiel, alegre, me ajudou muito em meus experimentos e sempre deixa o ambiente mais leve e divertido. Sua companhia foi essencial para minha jornada aqui. Muito obrigada por tudo! Amo você e grande sucesso em sua nova caminhada!

Professora Edel Stancioli sempre muito gentil e atenciosa, foi um grande prazer em conhecê-la e trabalharmos juntas.

A Professora Aline de Miranda pela coorientação e ajuda nas técnicas, ensino e disposição.

As IC's Gabriela e Taiza muito obrigada pela companhia, ajuda, espero ter contribuído para a vida de vocês.

As Queridas Bruna e Carol, que sempre me ajudavam quando precisava, sempre felizes, com muitos afazeres, mas nunca deixaram de doar seu tempo e conhecimento, obrigada por tudo!

A Professora Lirlândia e suas alunas Livia e Larissa, obrigada por toda ajuda e disposição.

Aos Professores Geovanni Dantas Cassali, Marcelo Vidigal Caliarri e Antônio Carlos por me permitir utilizar seus laboratórios e me auxiliar quando precisava.

A Secretária Marília e Técnicas(o) Jaqueline, Luciana, Nayara, Vânia e Tarcísio, pelas conversas, risos, desabafos e pelo ótimo trabalho que contribuiu para meu crescimento e pesquisa!

Aos pequenos camundongos utilizados neste estudo, meu respeito e gratidão.

A Universidade Federal de Minas Gerais, por fazer parte desta comunidade e pelo aprendizado.

APOIO FINANCEIRO

- ⇒ Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- ⇒ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- ⇒ Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios de Patologia Celular e Molecular e de Apoptose do Departamento de Patologia Geral e no Laboratório de Virologia Básica e Aplicada do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

RESUMO

A meningoencefalite causada pelo Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) é uma doença que apresenta alta letalidade em bovinos, com tratamento inespecífico e sem vacina específica contra o patógeno. Os animais de até dois anos de idade são mais afetados, com menor predomínio em bovinos adultos, causa impactos econômicos e está presente principalmente nos países da América do Sul. Os estudos envolvendo essa patogênese em modelos murinos são escassos. Nosso objetivo principal foi caracterizar as alterações clínicas, patológicas, aspectos imunes e neuroquímicos em camundongos C57BL/6 infectados por BoHV-5. Avaliamos também a participação dos TLRs 3/7/9 durante a infecção intracraniana por BoHV-5, utilizando a amostra Mutum. Nossos resultados demonstraram que após três dias de infecção, os animais infectados com 10^7 TCID₅₀ de BoHV-5 apresentaram sinais clínicos associados a diferentes graus de meningoencefalite, caracterizada pela formação de manguitos perivasculares, gliose reativa e focos hemorrágicos em diferentes regiões do sistema nervoso central. Além disso, foi observada maior imunexpressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e proteína ligante de cálcio ionizada-1 (Iba-1) no sistema nervoso central dos animais infectados. Células imunopositivas para caspase-3 clivada foram observadas ao redor de alguns vasos sanguíneos nos encéfalos de camundongos infectados. Realizou-se a dosagem a níveis encefálicos dos seguintes fatores neurotróficos, fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator de crescimento neural (NGF) e fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) e da proteína fraquitulina (CX3CL1) por ELISA. Os camundongos infectados apresentaram menores concentrações do fator neurotrófico BDNF, maior expressão das citocinas e quimiocinas IL-12p70, TNF, IL-10, IFN- γ , IL-6 e CCL-2 e não constatamos diferenças nos níveis de expressão de fraquitulina entre animais infectados e não infectados. Utilizando a técnica de RT-qPCR, avaliamos a expressão de oitenta e quatro genes relacionados com as respostas imunes inata e adaptativa na infecção causada por BoHV-5 em camundongos. Como resultado obtivemos 23 genes relacionados com as respostas imunes inata, adaptativa e com receptores de reconhecimento padrão mais expressos nos camundongos infectados, comparados aos não infectados. Além disso, foi avaliada a participação dos *Toll like receptors* (TLRs) 3, 7, 9, após a infecção com 10^4 TCID₅₀ de BoHV-5 em camundongos C57BL/6. A infecção promoveu perda significativa de peso até o terceiro dia em ambos os grupos de animais selvagens e deficientes para TLR3/7/9^{-/-}, não havendo diferença estatística entre os animais infectados selvagens e TLR3/7/9^{-/-}. Os camundongos infectados selvagens e TLR3/7/9^{-/-} apresentaram graus similares de sinais clínicos, de meningite e diminuição significativa do fator neurotrófico BDNF, em relação aos animais não infectados, sugerindo que outras vias possam ativar a resposta imune na infecção por BoHV-5 em camundongos C57BL/6. O BDNF pode estar envolvido com efeito antiapoptótico e neuroproteção durante a infecção e os danos teciduais pós-infecção podem estar relacionados a uma intensa inflamação local, microgliose e astrocitose. As quimiocinas e citocinas IL-12p70, TNF, IL-10, IFN- γ , IL-6 e CCL-2 demonstraram ser importantes na neuropatologia, como também o gatilho provocado por genes associados à inflamação demonstrados no presente estudo.

Palavras-chave: Apoptose, Gliose, Meningoencefalite, Herpesvírus Bovino 5, Respostas Imunes Inata e Adaptativa, Fatores Neurotróficos.

ABSTRACT

Meningoencephalitis caused by bovine Herpesvirus type 5 (BoHV-5) is a disease with high lethality in cattle, non-specific treatment and non-specific vaccine for the pathogen. Animals up to two years of age are more affected, with less predominance in adult cattle, cause economic impacts and are present mainly in the countries of South America. Studies involving this pathogenesis in murine models are scarce. Our main objective was to characterize the clinicopathological changes, immune and neurochemical profiles in C57BL/6 mice infected with BoHV-5. We also evaluated the participation of TLRs 3/7/9 during intracranial infection by BoHV-5, using the Mutum sample. Our results demonstrated that after three days of infection, animals infected with 10^7 TCID₅₀ of BoHV-5 showed clinical signs associated with different degrees of meningoencephalitis, characterized by formation of perivascular cuffs, reactive gliosis and hemorrhagic foci at different regions of the brain. Furthermore, higher immunoexpression for GFAP and Iba-1 was observed in the central nervous system of infected animals. Immunopositive cells for cleaved caspase-3 have been observed around some blood vessels in the brain of infected mice. Brain levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neural growth factor (NGF) and glial-derived neurotrophic factor (GDNF) and fractalkine protein (CX3CL1) were analyzed by ELISA. The infected mice showed lower concentrations of the neurotrophic factor BDNF, greater expression of the cytokines and chemokines IL-12p70, TNF, IL-10, IFN- γ , IL-6 and CCL-2 and we did not find differences in the levels of expression of fractalkine between animals infected and uninfected. Using the RT-qPCR technique, we evaluated the expression of eighty-four genes related to innate and adaptive immune responses in infection caused by BoHV-5 in mice. As a result, we obtained 23 genes related to the innate, adaptive and standard recognition receptors more expressed in infected mice, compared to mock mice. In addition, the participation of Toll like receptors (TLRs) 3, 7, 9 after infection with 10^4 TCID₅₀ of BoHV-5 in C57BL/6 mice was evaluated. The infection promoted significant weight loss until the third day in both groups of wild type and TLR3/7/9^{-/-} deficient animals, with no statistical difference between infected wild animals and TLR3/7/9^{-/-}. Both infected wild-type and TLR3/7/9 deficient animals had similar frequency of clinical signs, degrees of meningitis and a significant decrease of BDNF, suggesting that other via could activate the immune responses to BoHV-5 infection in C57BL/6 mice. BDNF may be involved with anti-apoptotic and neuroprotective effects during infection and post-infection tissue damage may be related to intense brain inflammation, microgliosis and astrocytosis. The chemokines and cytokines IL-12p70, TNF, IL-10, IFN- γ , IL-6 and CCL-2 proved to be important in neuropathology, as well as the trigger caused by inflammation-associated genes demonstrated in the present study.

Keywords: Apoptosis, Gliosis, Meningoencephalitis, Bovine Herpesvirus 5, Innate and Adaptive Immune Responses, Neurotrophic Factors.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------------------------------|---|
| ADEM | Encefalomielite Aguda Disseminada |
| APCs | Células Apresentadoras de Antígenos |
| ATP | Adenosina Trifosfato |
| BDNF | Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro |
| BoHV-1 | Herpes Vírus Bovino Tipo 1 |
| BoHV-5 | Herpes Vírus Bovino Tipo 5 |
| BSA | Albumina do Soro Bovino |
| BSE | Encefalopatia Espongiforme Bovina |
| CBA | Cytometric Bead Array |
| CCL2 | C-C Motif Chemokine Ligand 2 |
| CCL5 | C-C Motif Chemokine Ligand 5 |
| CEUA | Comissão de Ética no Uso de Animais |
| CXCL10 | C-X-C Motif Chemokine Ligand 10 |
| CX3CR1 | C-X3-C Motif Chemokine Receptor 1 |
| DAB | Diaminobenzidina peroxidase |
| D-MEM | Modified Eagle Medium |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| dpi | Dia Pós Infecção |
| EDTA | Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético |
| ELISA | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay |
| GFAP | Proteína Ácida Fibrilar Glial |
| GDNF | Fator Neurotrófico Derivado da Glia |
| HE | Hematoxilina-Eosina |
| HSV-1 | Herpesvírus simples tipo 1 |
| H₂O₂ | Peróxido de hidrogênio |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| ICB | Instituto de Ciências Biológicas |
| ICTV | Comitê internacional para Taxonomia de Vírus |
| IFNs | Interferons |
| IFN-β | Interferon Beta |
| IFN-γ | Interferon Gama |

| | |
|-------------------------------|---|
| IL-8 | Interleucina oito |
| IL-1β | Interleucina 1 Beta |
| IRF | Fator Regulatório de Interferon |
| LPD | Depressão de Longa Duração |
| MAPA | Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento |
| MDBK | Madin-Darby Bovine Kidney |
| MHC | Major Histocompatibility Complex |
| NAOH | Hidróxido de Sódio |
| NFs | Fatores Neurotróficos |
| NGF | Fator de Crescimento Neural |
| NK | Células Natural Killer |
| PAMPs | Padrões Moleculares Associados a Patógenos |
| PBS | Solução Tampão Fosfato Salina |
| PCR | Reação de Cadeia em Polimerase |
| PCR-RFLP | Análise de polimorfismo de fragmentos de restrição utilizando PCR |
| RNAm | Ácido Ribonucleico mensageiro |
| SFB | Soro Fetal Bovino |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| SOCS | Supressor de Sinalização de Citocinas |
| TCID₅₀ | 50% da Dose Infectante em Cultura de Células |
| TLR | Toll like Receptors |
| TNF | Fator de Necrose Tumoral |
| UFMG | Universidade Federal de Minas Gerais |
| UFSM | Universidade Federal de Santa Maria |
| USDA | Departamento de Agricultura dos Estados Unidos |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|-----------------------|-----------|
| Figura 1..... | 19 |
| Figura 2 | 25 |
| Figura 3 | 34 |
| Figura 4 | 36 |
| Figura 5 | 37 |
| Figura 6 | 40 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 Pecuária Bovina e Neuropatias em Bovinos..... | 16 |
| 1.2 Herpesvírus Bovino 5 | 17 |
| 1.3 Epidemiologia | 17 |
| 1.4 Sinais Clínicos e Aspectos Patológicos | 18 |
| 1.5 Diagnóstico | 20 |
| 1.6 Prevenção e Tratamento | 20 |
| 1.7 Modelos Experimentais | 21 |
| 1.8 Resposta Imune na Infecção por BoHV-5 | 22 |
| 1.8.1 Receptores do tipo Toll (TLRs) | 23 |
| 1.8.2 Papel dos TLRs e BoHV-5 | 25 |
| 1.8.3 Astrócitos | 26 |
| 1.8.4 Micróglias | 27 |
| 1.8.5 Fatores Neurotróficos | 28 |
| 1.8.6 Apoptose e Infecções Virais | 30 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 32 |
| 3. OBJETIVOS | 33 |
| 3.1 Objetivo Geral | 33 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 33 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 34 |
| 4.1 Animais..... | 34 |
| 4.2 Cultivo Celular e Viral | 35 |
| 4.3 Inoculação Viral | 35 |
| 4.4 Avaliação Clínica | 36 |
| 4.5 Histopatologia e Imunoistoquímica..... | 36 |
| 4.6 Titulação Viral..... | 38 |
| 4.7 RT-PCR para Identificação de Timidina Quinase (TK) | 39 |
| 4.8 PCR - Array | 40 |
| 4.9 Western Blot para Caspase-3 Clivada e Iba-1 | 41 |
| 4.10 Dosagem dos Níveis Cerebrais de Fatores Neurotróficos por ELISA | 42 |
| 4.11 Análise de CBA à Níveis Cerebrais em Camundongos | 42 |

| | |
|---|-----------|
| 4.12 Análise Estatística | 43 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 43 |
| 6. CAPÍTULO I | 44 |
| 7. CAPÍTULO II | 65 |
| 8. CAPÍTULO III | 80 |
| 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 96 |
| 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 97 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 PECUÁRIA BOVINA E NEUROPATIA EM BOVINOS

O Brasil possui como um dos setores de importância econômica, a pecuária bovina, com reconhecimento internacional. No país, as criações de gado de corte e leite tem impulsionado a economia, nosso território possui cerca de 218,2 milhões de cabeças bovinas, destacando os estados de Mato Grosso (13,9%), Minas Gerais (10,8%), Goiás (10,5%) e Mato Grosso do Sul (10,0%) (Brasil, IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2016). Sendo considerado o segundo maior exportador de carne bovina do mundo, segundo os dados divulgados pelo USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, 2016). O país apresenta expectativa de suprir 44,5% do mercado mundial até 2020, além de ser considerado como o quarto maior produtor de leite do mundo. Várias doenças bovinas que cursam com perdas econômicas resultam em prejuízos para o produtor e para toda a cadeia envolvida. As doenças podem levar a prejuízos diretos como mortes ou indiretos pelas reduções do crescimento, das produções de carne e leite, entre outros (Brasil, MAPA - Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento, 2015).

São reportados frequentemente no Brasil, distúrbios ocorridos no sistema nervoso dos bovinos. Estas neuropatias representam perigo em potencial para a saúde humana, como zoonoses, podendo causar também mortalidade do gado e prejuízos econômicos (Riet Correa et al., 1998; Rissi et al., 2007; Salvador et al., 1998).

Dentre as doenças que afetam os bovinos, destaca-se a meningoencefalite não supurada causada pelo vírus BoHV-5 (Herpesvírus Bovino tipo 5 – *Bovine herpesvírus type 5*), a doença não é uma zoonose, frequentemente apresenta um alto índice de mortalidade, principalmente entre animais jovens (Roizman et al., 1992).

A meningoencefalite ou encefalomeningite por definição é um processo inflamatório no cérebro e meninges (pia-máter, aracnoide e dura-máter), podendo ser causada por infecções (bactérias, fungos, vírus ou protozoários), raramente por síndromes autoimunes como a encefalomielite aguda disseminada (ADEM) e por toxicidade causadas por alguns fármacos como azatioprina, imunoglobulina endovenosa, alopurinol, dentre outros (Garcez et al., 2010; Montemezzo et al., 2014; Dash, S. K., 20117).

34 **1.2 HERPESVÍRUS BOVINO 5**

35 Os herpesvírus são considerados uns dos principais causadores de doenças virais
36 em seres humanos e animais, pertencendo à família Herpesviridae (ICTV, Comitê
37 Internacional para Taxonomia de Vírus, 2014). O herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) é
38 membro da subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*, possui uma molécula
39 de DNA (ácido desoxirribonucleico), fita dupla, com cerca de 137 kb, têm seu genoma
40 envolvido por um capsídeo icosaédrico próximo a 100-110 nm de diâmetro, com 12
41 capsômeros pentaméricos e 150 hexaméricos. Seu genoma e capsídeo são envoltos por
42 tegumento e externamente por um envelope lipoprotéico, no envelope encontramos várias
43 glicoproteínas virais inseridas que formam projeções (Halfen & Vidor, 2001; Roizman et
44 al., 1992; Rissi et al., 2007). Os bovinos são os hospedeiros naturais do BoHV-5, mas a
45 doença pode ser reproduzida em ovinos e coelhos (Silva et al., 1998; Beltrão et al., 2000;
46 Caron et al., 2002; Spilki et al., 2002; Diel et al., 2005). O vírus tem ciclo de replicação
47 curto e rápido, capacidade de induzir latência e permanência em gânglios nervosos,
48 podendo levar à meningoencefalite não supurativa bovina (Engels & Ackermann, 1996;
49 ICTV, 2014).

50 Segundo Del Médico Zajac e colaboradores (2010), o BoHV-5 foi reconhecido
51 como um vírus distinto em 1992, já que anteriormente era denominado como BoHV-1
52 (Herpesvírus bovino tipo 1), pois acreditava-se tratar do subtipo 3 do BoHV-1, causador
53 da doença rinotraqueíte infecciosa bovina. Constatou-se uma diferença genética e
54 imunogênica entre os dois vírus, apesar de apresentarem alta similaridade na constituição
55 de aminoácidos (Rensetti et al., 2018).

56 O ciclo de vida dos herpesvirus se desenvolvem através de alguns estágios,
57 começando com uma infecção aguda, seguido de latência principalmente no gânglio
58 trigêmeo, por último ocorre a reativação do vírus. A reativação do vírus latente pode
59 ocorrer sob condições de estresse dos animais ou pode ser induzida de forma experimental
60 utilizando glicocorticoides. Essa reativação viral é a principal fonte de disseminação do
61 vírus (Rensetti et al., 2018).

62

63 **1.3 EPIDEMIOLOGIA**

64 A meningoencefalite causada por BoHV-5 foi registrada em vários países como
65 Austrália, Estados Unidos da América, países da América do Sul onde há alta incidência,
66 na Argentina, Uruguai e Brasil, onde casos já foram registrados em todos os estados do
67 país (Del Médico Zajac et al., 2006; Aquino Neto et al., 2008/2009; Oliveira et al., 2014).

68 Estudos recentes realizados por Kumar e colaboradores (2020), isolaram e
69 caracterizaram pela primeira vez o BoHV-5 em bovinos de uma fazenda na Índia. No
70 Brasil, levantamentos realizados entre 2010 a 2016 por Blume e colaboradores (2018)
71 demonstraram casos diagnosticados de meningoencefalite por BoHV-5 por todo o estado
72 de Goiás. No estado de Pernambuco, alguns surtos foram relatados em municípios de
73 Recife (Oliveira et al., 2014). Em outros estudos sobre gado de corte no estado do Paraná,
74 identificou-se o BoHV-5 nessa população bovina em diferentes regiões geográficas do
75 estado, com uma maior prevalência no norte do estado, devido a maior concentração dos
76 bovinos nesta região (Oliveira et al., 2015).

77 A doença geralmente ocorre de forma esporádica ou em surtos com morbidade de
78 0,05-30% e letalidade de 75-100% (Riet-Correa et al., 1989; Riet-Correa & Schild, 1995;
79 Colodel et al., 2002; Gomes et al., 2002; Elias et al., 2004; Rissi et al., 2006). A idade na
80 maioria dos acometimentos em bovinos ocorre, segundo literatura, entre 60 dias há 24
81 meses, com estudos demonstrando 84,61% dos animais pesquisados nessa faixa de idade
82 (Salvador et al., 1998; Colodel et al., 2002; Rissi et al., 2007; Blume et al., 2018). Em
83 recente pesquisa, Blume e colaboradores (2018), apresentaram três casos de bovinos
84 positivos para BoHV-5 com idade entre 07 a 10 anos de idade, entre os animais
85 pesquisados em seu estudo.

86 Há uma concordância na literatura sobre não haver uma predileção sazonal para
87 ocorrência da doença (Perez et al., 2003; Cagnini et al., 2017; Blume et al., 2018), pela
88 presença da doença em diferenças raças bovinas (Colodel et al., 2002; Perez et al., 2003;
89 Elias et al., 2004; Cagnini et al., 2017) e sobre não haver prevalência da doença entre
90 fêmeas e machos (Rissi et al., 2006; Barros et al., 2006; Cagnini et al., 2017; Blume et
91 al., 2018).

92

93 **1.4 SINAIS CLÍNICOS E ASPECTOS PATOLÓGICOS**

94 O quadro clínico nos bovinos afetados por meningoencefalite causada pelo
95 BoHV-5 evolui de 1 a 15 dias, iniciando após período de incubação de 7 a 10 dias. Alguns
96 sinais detectados após a infecção são anorexia, fraqueza e comportamento do tipo
97 depressivo. Dentro de alguns dias, os animais podem apresentar dificuldade de ingestão
98 de água e apreensão de alimentos, corrimentos nasal e ocular, febre, bruxismo, sialorréia,
99 nistagmo, opistótono, andar em círculos, incoordenação, pressionamento da cabeça
100 contra objetos, cegueira, convulsões e quedas (Salvador et al., 1998; Elias et al., 2004;
101 Rissi et al., 2008).

102 Os achados de necropsia são variáveis ou podem não ser visualizados
103 macroscopicamente. Caracterizam-se por hiperemia das leptomeninges, aumento do
104 líquido cefalorraquidiano e hemorragia submeníngea. Apresentam como achado
105 relevante áreas de malacia, localizadas principalmente no córtex cerebral (Elias et al.,
106 2004; Rissi et al., 2006), **Figura 1**. Na literatura, observa-se principalmente nos bovinos,
107 lesões mais acentuadas na região do bulbo olfatório e córtex frontal, sendo o córtex frontal
108 um local importante de latência do vírus após o gânglio trigêmeo (Vogel et al., 2003;
109 Rissi et al., 2006). Nas avaliações histopatológica e imunoistoquímica, as lesões se
110 caracterizam por polioencefalomalacia no córtex cerebral, tálamo e núcleos da base,
111 meningoencefalite não supurativa, com manguitos perivasculares de células
112 mononucleares e corpúsculos de inclusão intranucleares eosinofílicos em astrócitos e
113 neurônios (Riet-Correa et al., 1989; Salvador et al., 1998; Riet-Correa et al., 2006). A
114 multiplicação do herpesvírus causa várias mudanças na arquitetura celular, aparecimento
115 de inclusões intranucleares, marginação da cromatina e destruição dos nucléolos. O DNA
116 viral recentemente sintetizado se acumula podendo ser visto no núcleo da célula em forma
117 de uma massa basofílica. Os capsídeos se formam e migram para o citoplasma, os vírus
118 adquirem o envelope quando brotam através da membrana nuclear, causando morte
119 celular (Fenner et al.,1993).

120



121
122 **FIGURA 1:** Meningoencefalite causada por herpesvirus bovino, apresentando áreas de malacia bilateral no córtex
123 frontal, demonstrado em ★ **Fonte:** Blume, et.al (2018).

124 **1.5 DIAGNÓSTICO**

125 De acordo com Flores e colaboradores (2007), devido ao desenvolvimento de
126 doença neurológica fatal, é necessário realizar diagnóstico diferencial com os agentes da
127 Listeriose, Babesiose, Raiva e BSE (encefalopatia espongiiforme bovina). A partir de
128 material coletado do SNC (sistema nervoso central), são realizados testes de inoculação
129 intracerebral, imunofluorescência/imunoperoxidase, isolamento viral ou PCR (reação da
130 cadeia em polimerase). Segundo Delhon (2003), a determinação da prevalência para o
131 BoHV-5 por sorologia torna-se difícil devido as reações cruzadas entre BoHV-5 e BoHV-
132 1 que podem ser provenientes da alta homologia genômica existente entre ambos, além
133 de ser uma técnica demorada, podendo não ser sensível para detectar infecções com baixo
134 nível de partículas virais (Oliveira et al., 2015).

135 A técnica PCR é bastante utilizada em diagnósticos de rotina, sendo mais sensível
136 que o isolamento do vírus (Oliveira et al., 2015). Um protocolo utilizando a extração do
137 DNA com NaOH (hidróxido de sódio) e PCR-RFLP (análise de polimorfismo de
138 fragmentos de restrição utilizando a reação em cadeia da polimerase) para detecção e
139 diferenciação do BoHV-1 e BoHV-5 em estudos epidemiológicos e futuro uso em
140 diagnóstico laboratorial foi desenvolvido por Oliveira e colaboradores (2015).

141

142 **1.6 PREVENÇÃO E TRATAMENTOS**

143 A meningoencefalite por BoHV-5 não apresenta tratamento específico. A adesão
144 a procedimentos de manejos adequados e programas de vacinação pode contribuir para
145 minimizar o aparecimento de casos da enfermidade (Rissi et al., 2007). Devido às
146 similaridades em aspectos biológicos e moleculares entre o BoHV-5 e BoHV-1, diversos
147 autores tem demonstrado relativa proteção cruzada contra enfermidade neurológica por
148 BoHV-5 em animais que foram vacinados contra a rinotraqueíte infecciosa bovina,
149 ocasionada pelo BoHV-1 (Cascio et al., 1999; Beltrão et al., 2000; Vogel et al., 2003; Del
150 Médico Zajac et al., 2006). A ampla distribuição da infecção pelo BoHV-1 e o uso da
151 vacinação em larga escala pode explicar a baixa ocorrência de BoHV-5 na América do
152 Norte e Europa (Ely et al., 1996; Cascio et al., 1999).

153 Estudos recentes de Ross e colaboradores (2018) sugeriram o uso de probióticos
154 *B. toyonensis* e *S. boulardii* como alternativa para melhoramento da eficácia de vacinas
155 para BoHV-5, os probióticos possuem um mecanismo de modulação da resposta imune,
156 estimulando as células a produzir citocinas. O experimento foi realizado com ovinos, os
157 animais vacinados que foram alimentados com esses probióticos modularam a resposta

158 imune, obtiveram maiores títulos de anticorpos anti-BoHV-5 em comparação ao grupo
159 controle, houve um estímulo na produção de anticorpos contra o BoHV-5, o que
160 aumentou a eficiência da vacina.

161

162 **1.7 MODELOS EXPERIMENTAIS**

163 Os modelos iniciais para estudos sobre o BoHV-5 eram realizados em bovinos
164 (Meyer et al., 1996). Existem algumas dificuldades em se desenvolver este modelo, como
165 espaço para manutenção dos animais, números de animais, entre outros. Porém,
166 atualmente, alguns estudos têm utilizado bezerros como modelo (Favier et al., 2014;
167 Cagnini et al., 2015; Queiroz et al., 2018).

168 A infecção experimental pelo BoHV-5 em coelhos vem sendo reproduzida com
169 sucesso, e têm sido utilizadas para compreender a base molecular da infecção e latência
170 pelo BoHV-5 (Machado et al., 2013). Nesse modelo, os animais infectados reproduzem
171 os sinais clínicos, sinais neurológicos e alterações patológicas que ocorrem no hospedeiro
172 natural, os bovinos (Mayer et al., 2006). Mas o modelo também traz algumas limitações
173 para o uso desta espécie para infecção por BoHV-5, tais como idade adequada para
174 responder à indução da imunização e número excessivamente alto de animais para
175 avaliação estatística (Flores et al., 1998; Chowdhury et al., 2002; Flores et al., 2009).

176 Os ovinos também são utilizados como modelos. Experimentos realizados por via
177 intranasal reproduziram alguns aspectos da infecção em bovinos, como sinais clínicos,
178 latência do vírus, transmissão para outros animais através de contato (Silva et al., 1998).
179 Devido às dificuldades encontradas nas outras espécies, o estabelecimento de modelos
180 experimentais utilizando animais de laboratório tornar-se uma ferramenta útil para a
181 pesquisa (Mendes & Souza, 2017).

182 São poucos os estudos que utilizam camundongos como modelo para a infecção
183 por BoHV-5, principalmente animais com deleção de genes. Abril e colaboradores (2004)
184 estudaram os efeitos da infecção intraperitoneal com 10^7 TCID₅₀ (50% da dose infectante
185 em cultura de células) de BoHV-5 em camundongos da linhagem 129Sv/Ev e em
186 camundongos com deleções genéticas no receptor do interferon alfa/beta e gama e na
187 habilidade de produção de linfócitos B e T (deleção RAG). Flores e colaboradores (2009)
188 demonstraram a ausência de susceptibilidade de camundongos lactentes suíços albinos,
189 em inoculação por via intraperitoneal de diferentes amostras de BoHV-5.

190

191 **1.8 RESPOSTA IMUNE NA INFECÇÃO POR BOHV-5**

192 Conceitualmente, a resposta imune tem sido dividida em respostas imunes inata e
193 adaptativa. A resposta imune inata é considerada uma das primeiras barreiras que o
194 organismo possui para detectar a presença de patógenos invasores e rapidamente eliminá-
195 los ou iniciar uma resposta imune adaptativa protetora (Medzhitov et al., 2000). A
196 constituição genética do hospedeiro, resposta mediada por macrófagos, NK (células
197 natural killer), anticorpos e citocinas são apontados como importantes mecanismos de
198 defesa do hospedeiro contra as infecções por herpes. Com isso, os mecanismos da
199 resposta imune inata formam a primeira linha de defesa, enquanto anticorpos e linfócitos-
200 T CD4⁺ e CD8⁺ citotóxicos estão sendo produzidos. A literatura demonstra que tanto a
201 resposta imune inata quanto a adquirida são necessárias para o controle da infecção por
202 herpesvirus, mesmo em uma primeira infecção (Stock et al., 2011).

203 A resposta imune adaptativa depende de uma ativação de células especializadas,
204 sendo estas os linfócitos e moléculas solúveis por eles produzidas e APCs (células
205 apresentadoras de antígenos). Estas células apresentam antígenos associados a MHC
206 (moléculas do complexo de histocompatibilidade) para os linfócitos T. Os mecanismos
207 da resposta adquirida demoram alguns dias para se desenvolverem, e suas principais
208 características são a especificidade, diversidade de reconhecimento, memória,
209 especialização de resposta, autolimitação e tolerância a componentes do próprio
210 organismo (Delves et al., 2000).

211 A doença infecciosa envolve interações complexas entre os patógenos e o
212 hospedeiro. Os patógenos requerem respostas imunológicas diferentes e especializadas,
213 dependendo do local onde eles se replicam e do seu tamanho. Os sistemas imunes inato
214 e adaptativo irão cooperar entre si para que o agente infeccioso seja eficientemente
215 eliminado (Abbas et al., 2012).

216 A resposta inflamatória é um componente essencial do sistema imunitário do
217 hospedeiro. Uma das linhas de resposta é o reconhecimento da agressão, quando
218 promovida por uma patógeno a agressão será reconhecida por meio das moléculas do
219 patógeno, essas moléculas que o organismo consegue reconhecer são denominadas
220 PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos), desempenhando um papel
221 importante contra as infecções virais e atuam diretamente inibindo um ou mais estágios
222 do ciclo de vida viral (Qureshi et al., 2014; Filho G. B., 2013). Os PAMPs podem ser
223 reconhecidos pelos receptores TLRs (Toll like Receptors), estes são reconhedores de
224 patógenos e expressos por células do sistema imunológico ou por aquelas células que são

225 o alvo primário de agentes infecciosos. Os TLRs comumente envolvidos na resposta
226 contra infecções virais são os 3, 7, 8 e 9. O desencadeamento da ativação dos TLRs
227 induzem uma série de eventos que resultam na produção de citocinas e quimiocinas pró-
228 inflamatórias que vão estimular a resposta imune adaptativa. O desencadeamento da
229 resposta imune pode levar ao controle da infecção ou à indução da patologia, dependendo
230 da qualidade e intensidade da resposta. Como por exemplo, algumas citocinas e
231 quimiocinas inflamatórias, como IFN- γ (interferon gama), IL-8 (interleucina oito), TNF
232 (fator de necrose tumoral) e IL-1 β (interleucina 1 beta), podendo ser benéficas para o sistema
233 imune do hospedeiro ou podem facilitar a entrada do vírus no SNC (Franco & Fernández-
234 Suárez, 2015; Rensetti et al., 2016).

235

236 **1.8.1 RECEPTORES DO TIPO TOLL (TLRS)**

237 Os TLRs são uma classe de receptores envolvidos no reconhecimento de diversos
238 padrões moleculares com propriedades antigênicas. Estão envolvidos na resposta imune
239 inata e resposta imune adaptativa, ao reconhecer os PAMPs induzindo uma resposta
240 imunológica contra patógenos (Akira & Takeda, 2004; Parker et al., 2007; Abbas et al.,
241 2012). Os genes de TLRs expressos em seres humanos são encontrados principalmente
242 em macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e linfócitos (Akira & Takeda, 2004; Singh
243 et al., 2012; Ashour et al., 2015). Também são expressos nos astrócitos, oligodendrócitos,
244 micróglia e neurônios (Olson & Miller, 2004; Carpentier et al., 2005; Farina et al., 2005).

245 Estes receptores reconhecem moléculas características em grupos de
246 microorganismos, como sequências de DNA ou RNA virais. Estímulos provenientes da
247 resposta imune inata pelas vias de sinalização celulares levam à produção de citocinas
248 fazendo a ativação dos TLRs (Takeda & Akira, 2005). Nas doenças infecciosas ocorrem
249 a produção de citocinas pró-inflamatórias pela resposta imune inata, controlando o
250 crescimento do patógeno e protegendo o hospedeiro, a produção exagerada de citocinas
251 pode resultar em quadros patológicos (Nishiya & DeFranco, 2004; El-Menyar et al.,
252 2009; Lourenco et al., 2009; Nalbandian et al., 2009).

253 Devido à importância dos TLRs na síntese de citocinas pró-inflamatórias e à
254 identificação de ligantes destes receptores em uma variedade de patógenos (Barton et al.,
255 2002; Gazzinelli et al., 2006), a função dos TLRs na resposta imune do hospedeiro contra
256 infecções tem sido alvo de estudos nas últimas décadas. O uso dos modelos com
257 camundongos deficientes para os TLRs ou para a proteína adaptadora Myd88

258 (Myd88^{-/-}), responsável pela sinalização celular da maioria dos TLRs, tem se mostrado
259 importante para o estudo em infecções por vírus, protozoários, bactérias e fungos. A
260 sinalização TLR ocorre por duas vias distintas, uma via dependente de MyD88 que leva
261 à produção de citocinas inflamatórias e uma via independente de MyD88 associada à
262 estimulação por IFN-β (Interferon Beta) e a maturação de células dendríticas. De uma
263 maneira geral, animais Myd88^{-/-} são imunocomprometidos e sucumbem à infecção por
264 diferentes patógenos, incluindo vírus como o *Herpes simplex* (Mansur et al., 2005).

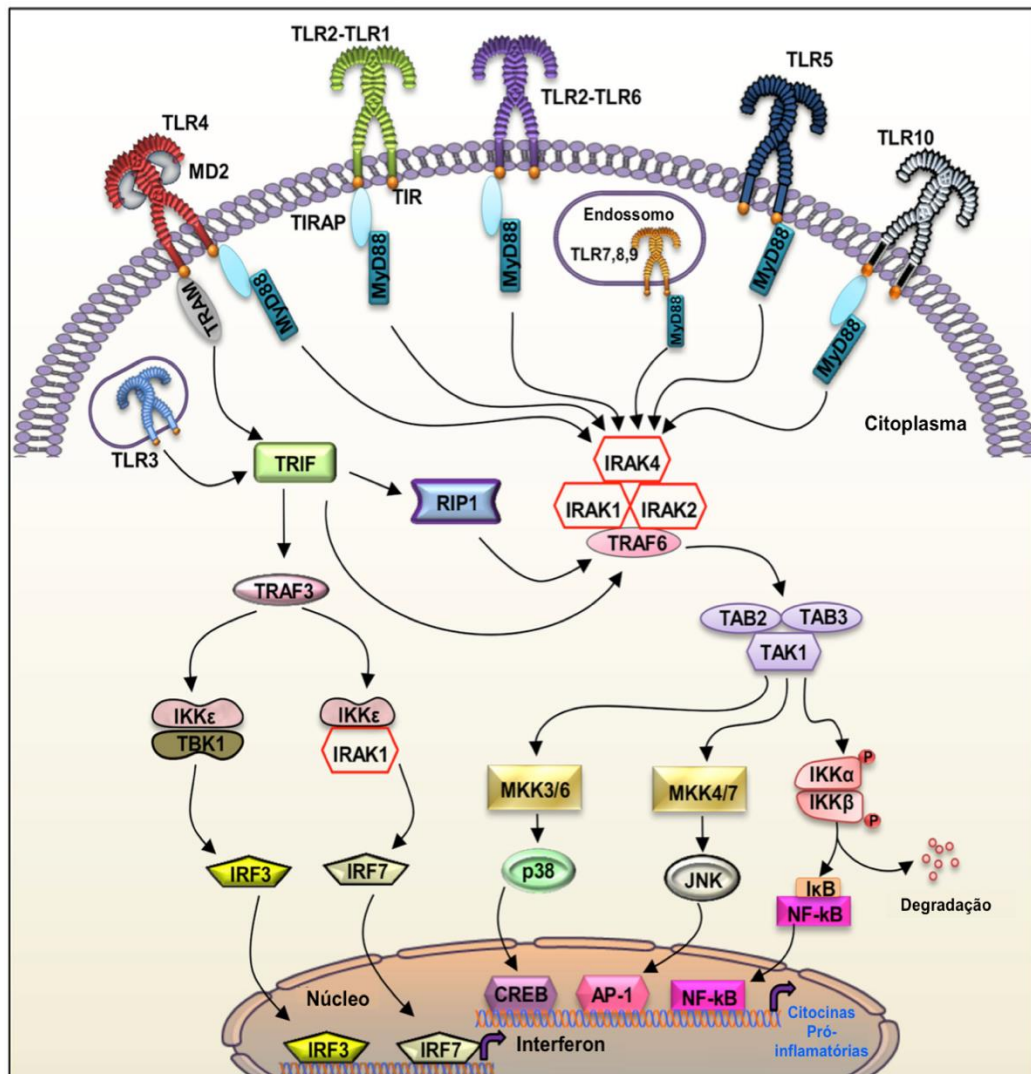
265 Os TLRs se encontram localizados na membrana plasmática, com exceção de
266 TLR3, TLR7, TLR9, que estão localizados no endossoma. Foram caracterizados dez
267 TLRs humanos (TLR 1 ao 10) e doze murinos (TLR 1 ao 9, TLR11, TLR12 e TLR13,
268 sendo o homólogo do TLR10 um pseudogene) (Nishiya & DeFranco, 2004).

269 O TLR2 é importante para o reconhecimento de uma variedade de PAMPs de
270 bactérias Gram-positivas; o TLR3 está implicado no reconhecimento de RNA de cadeia
271 dupla derivado de vírus; o TLR4 é ativado pelo lipopolissacarídeo; o TLR5 detecta
272 flagelo bacteriano; e o TLR9 é necessário para a resposta ao DNA CpG não metilado. Os
273 TLR7 e TLR8 reconhecem pequenas moléculas antivirais sintéticas (Jurk et al., 2002), e
274 o RNA de cadeia simples foi relatado como seu ligante natural (Heil et al., 2004). O
275 TLR11 foi relatado por reconhecer *E.coli* uropatogênica e uma proteína semelhante à
276 profliga de *Toxoplasma gondii* (Keating et al., 2007; Zhang et al., 2004; Lauw et al.,
277 2005).

278 Os TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 reconhecem ácidos nucleicos virais e induzem
279 IFN do tipo I. Eles envolvem o IRF (fator regulatório de interferon), que desempenha um
280 papel importante nas defesas antivirais, crescimento celular e regulação imune, IRF3,
281 IRF5 e IRF7 funcionam como transdutores diretos de sinalização de TLR mediada por
282 vírus. TLR3 e TLR4 ativam IRF3 e IRF7 (Doyle et al., 2002), enquanto TLR7 e TLR8
283 ativam IRF5 e IRF7 (Schoenemeyer et al., 2005) (Fig. 2).

284 Marin e colaboradores (2014) demonstraram que o agonista para TLR7 e 8
285 apresentou efeito antiviral em monócitos de bovinos infectados por BoHV-1 e BoHV-5.
286 Este estudo sugeriu que os TLRs atuam na proteção do hospedeiro contra infecções por
287 vírus e que o papel dos TLRs na meningoencefalite por BoHV-5 ainda é desconhecido.

288



289

290

291

292

293 1.8.2 PAPEL DOS TLRs e BoHV-5

294

295

296

297

298

299

300

301

302

303

FIGURA 2: Representação esquemática dos TLR's e de suas principais vias de sinalização. Fonte: Achek, et.al. (2016). Disponível em : link.springer.com/article/10.1007%2Fs12272-016-0806-9#citeas

Os IFNs (interferons tipo I) são importantes na resposta imune inata em resposta as infecções por herpesvírus. A indução de IFN mostra-se característica nas infecções por herpesvírus bovino (BoHV). Além disso, já se sabe que alguns TLRs são capazes de estimular a ativação desses interferons (Perez et al., 2003; Paludan et al., 2011; Marin et al., 2014).

Marin e colaboradores (2014) demonstraram em seus estudos “in vitro” e “in vivo” a participação de alguns TLRs na resposta às infecções por herpesvírus bovino. Como tentativa de controle sobre a invasão e multiplicação dos herpesvírus, o sistema imune inato e adaptativo entram em ação. Detectou-se, por exemplo, que a replicação de BoHV nas células MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney) foi prejudicada perante a

304 ativação da sinalização do TLR7. Em outro estudo encontrou-se aumento da expressão
305 de TLR3 e TLR7 em córtex de bezerros infectados com BoHV-5 durante a infecção aguda
306 e durante a reativação do vírus (Marin et al., 2014). Estudos desenvolvidos por Rensetti
307 e colaboradores (2016) demonstraram aumento da expressão dos TLR3, TLR7 e TLR8
308 no sistema nervoso de bezerros infectados por BoHV-5 e o aumento do RNAm de TLR9
309 no gânglio trigêmeo durante a infecção e a reativação do BoHV-5 (Marin et al., 2014).

310 Um estudo com infecção por HSV-1 em modelo murino de Zolini e colaboradores
311 (2014), foi realizado utilizando camundongos selvagens C57/BL6 e camundongos
312 nocautes para TLR2^{-/-}, TLR9^{-/-} e TLR2/9^{-/-}. Os resultados demonstraram a importância
313 dos TLRs para controlar a infecção por HSV-1 no gânglio trigêmeo dos camundongos,
314 minimizando os efeitos da doença e impedindo encefalites e uma diminuição na morte
315 dos animais. Os camundongos, por exemplo, que não expressavam o TLR9 não
316 apresentaram uma resposta eficiente para controlar o vírus, mesmo expressando outros
317 TLRs nos seus cérebros.

318

319 **1.8.3 ASTRÓCITOS**

320 Os astrócitos são as células da glia em maior abundância no sistema nervoso
321 central e variam de acordo com a sua morfologia, desenvolvimento, metabolismo e
322 fisiologia (Stipursky et al., 2010; Gomes et al., 2013). Apresentam importância na
323 homeostase do microambiente cerebral e têm como função a absorção de glicose e outros
324 nutrientes, que serão utilizados pelos neurônios. Fazem parte da barreira
325 hematoencefálica, absorvendo e degradando neurotransmissores em excesso. Além disso,
326 os astrócitos possuem atividade neuromoduladora, importante para o controle espacial e
327 temporal da ativação neuronal (Abbott et al., 2006; Haydon & Carmignoto, 2006;
328 Bélanger et al., 2011; Harada et al., 2016; Weikang et al., 2018). Estas células possuem
329 prolongamentos com filamentos intermediários (fibrilas gliais), e apresentam como
330 componentes principais o GFAP (proteína ácida fibrilar glial), a proteína ligadora de
331 cálcio (S-100 beta) e a enzima conversora de glutamato em glutamina (Glutamina
332 sintetase) (Cahoy et al., 2008; Gomes et al., 2013). Os astrócitos são uma importante fonte
333 de interferons, que diante uma infecção, protege astrócitos vizinhos e neurônios (Kurahde
334 et al., 2016; Lindqvist et al., 2016).

335 A presença dos astrócitos na meningoencefalite causada pelo BoHV-5 é relatada
336 em literatura, são observados e descritos como a presença de inclusões intranucleares
337 eosinofílicas em astrócitos. Estes relatos ocorrem em experimentos com infecções por

338 BoHV-5 em ovinos e descritos em experimentos também com bovinos, os achados destes
339 corpúsculos de inclusão em alguns experimentos em bovinos são observados
340 ocasionalmente, em outros experimentos o corpúsculos de inclusão nos astrócitos foi
341 observado em todos os casos investigados (Silva et al., 1998; Rissi et al., 2007; Arruda et
342 al., 2010; Blume et al., 2018).

343

344 **1.8.4 MICRÓGLIAS**

345 As micróglia são células da glia residentes no tecido nervoso e possuem
346 morfologia diversificada, em repouso apresentam ramificações que se intensificam
347 quando reativas. Por ser uma célula altamente ramificada, suas ramificações rapidamente
348 varrem o ambiente local e reagem a qualquer modificação, quando por exemplo, o
349 hospedeiro passa por uma infecção, as micróglia transformam sua morfologia, para
350 migrar, proliferar e fagocitar (Kettenmann et al., 2011; Béchade et al., 2013).

351 Estão distribuídas em todo o SNC e variam em densidade tanto em roedores
352 quanto em humanos, com algumas diferenças sutis na morfologia (Ransohoff & Perry,
353 2009). Dentre as células pertencentes as populações gliais no SNC as microglia são as
354 mais abundantes (Perry et al., 2013). As micróglia, como células imunes, são
355 frequentemente apontadas como a primeira resposta à infecção do SNC, detectam e
356 reagem, além das infecções, a traumas, isquemias, neurodegeneração, em resumo,
357 qualquer alteração na homeostase cerebral. Também desempenham papel importante no
358 desenvolvimento cerebral, plasticidade sináptica e memória. (Béchade et al., 2013; Chen
359 et al., 2019).

360 Em uma infecção, as micróglia podem detectar os nucleotídeos liberados pelos
361 neurônios infectados e são recrutadas rapidamente para fazer suas atividades fagocitárias.
362 Os neurônios infectados liberam mais ATP (adenosina trifosfato), e esses estímulos fazem
363 com que a microglia se torne ativada e recrutada de minutos a horas. Estas células são
364 capazes de detectar alterações no pH, citocinas, quimiocinas, aminoácidos e compostos
365 inorgânicos. No entanto, dependendo do estímulo recebido, o perfil de ativação destas
366 células também é diferente e pode resultar tanto em efeitos benéficos para o organismo,
367 como em efeitos prejudiciais (Boche al., 2012).

368 As micróglia e os astrócitos durante suas ações de defesa produzem fatores
369 inflamatórios que podem danificar o tecido local, aumentando ainda mais a inflamação e
370 a ativação glial, levando a um ciclo inflamatório vicioso. Esta inflamação, em longo
371 prazo, pode ser prejudicial ao SNC, podendo ocorrer desde a perda de sinapses, prejuízo

372 à cognição e neurodegeneração. Mas a falta de microglia pode prejudicar o controle da
373 inflamação, uma quantidade menor destas células leva a níveis mais baixos de fator
374 neurotrófico derivado do cérebro (Cherry et al., 2014). As micróglia podem ser marcadas
375 no SNC de roedores e humanos pela técnica imunocitoquímica para antígenos específicos
376 (Ransohoff & Perry, 2009).

377 De acordo com Menasria e colaboradores (2017), a micróglia na infecção por
378 HSV-1 (Herpes Simplex Vírus tipo 1), participa no controle da replicação do vírus no
379 encéfalo, ativando citocinas e quimiocinas como IL-6, IL1b, CXCL10 (C-X-C motif
380 chemokine ligand 10), CCL2 (C-C motif chemokine ligand 2) e CCL5 (C-C motif chemokine
381 ligand 5). Durante os insultos cerebrais, um dos controles para a ativação microglial é feito
382 pelo receptor de quimiocina denominado fraquitalquina CX3CR1 (C-X3-C motif
383 chemokine receptor 1). A fraquitalquina faz a sinalização do neurônio produtor para a
384 microglia efetora, sendo a microglia residente considerada a única fonte de expressão de
385 CX3CR1, ou seja, o único receptor de sinalização da fraquitalquina no cérebro saudável.
386 Essa quimiocina é expressa em níveis elevados pelos neurônios, em especial nas
387 estruturas cerebrais como o hipocampo, amígdala, córtex cerebral, globo pálido, corpo
388 estriado, tálamo e também no bulbo olfativo (Paolicelli et al., 2014).

389 O eixo CX3CL1 a CX3CR1 constitui um caminho chave em que os neurônios e
390 micróglia regulam a imunidade no SNC. Essa sinalização, além da participação no
391 controle da produção de várias citocinas, regula a atividade fagocitária da microglia
392 (Menasria et al., 2017). O eixo CX3CL1/CX3CR1 é necessário para que se mantenha a
393 homeostase cerebral e haja uma reabsorção inflamatória no cérebro danificado, através
394 da regulação do equilíbrio de citocinas pró e anti-inflamatórias, como o TNF- α , IL-6, IL-
395 1 β e IL-10 (Luo et al., 2019). Além do CX3CL1 manter as condições neuroinflamatórias
396 e contribuir para a neurotoxicidade, no cérebro adulto, a sinalização CX3CL1/CX3CR1
397 regula a plasticidade sináptica e as funções cognitivas. Principalmente no hipocampo,
398 CX3CL1 é um potente modulador da transmissão sináptica e sua diminuição prejudica a
399 aprendizagem motora, a memória associativa e espacial (Lauro et al., 2015).

400

401 **1.8.5 FATORES NEUROTRÓFICOS**

402 As células gliais são importantes fontes de NFs (fatores neurotróficos). Os NFs
403 são conhecidos como um grupo de polipeptídeos responsáveis pela sobrevivência de
404 neurônios, crescimento de axônios, expressão de proteínas essenciais para o
405 funcionamento neuronal, liberação de neurotransmissores e pela formação e função de

406 sinapses (Allen & Dawbarn, 2006; Domingues et al., 2015; Sebben et al., 2011).
407 Basicamente, são um conjunto de três famílias de moléculas e seus receptores, que
408 mantêm o crescimento e sobrevivência dos axônios, neurônios motores e sensitivos, após
409 ocorrência de danos teciduais (Boyd & Gordon, 2003; Sebben et al., 2011).

410 Também modulam a transmissão e a plasticidade neuronal que decai durante o
411 envelhecimento, em condições traumáticas ou degenerativas. São sintetizados no retículo
412 endoplasmático e clivados em moléculas que podem sofrer modificações. Além disso,
413 realizam funções celulares através da ativação de receptores, incluindo a expressão dos
414 genes que estão envolvidos na regulação da neuroplasticidade e integridade celular
415 (Perito & Fortunato, 2012; Budni et al., 2015). São classificados de acordo com
416 características funcionais e estruturais (Allen & Dawbarn, 2006; Domingues et al., 2015).

417 Os principais NFs são: NGF (fator de crescimento neural), BDNF (fator
418 neurotrófico derivado do encéfalo), GDNF (fator neurotrófico derivado da glia) e as
419 neurotrofinas NT3, NT-4/5, NT-6 e NT-7. Estes fatores também agem em atividades
420 como comportamento, aprendizagem e memória (Lai et al., 1998; Budni et al., 2015).

421 O BDNF é o NF mais disseminado no SNC de mamíferos, protegendo as conexões
422 neurais (Babri et al., 2018). É essencial para o crescimento, diferenciação, regeneração e
423 sobrevivência neuronal, assim como para a plasticidade e transmissão sináptica,
424 contribuindo assim para a aprendizagem e memória (Waterhouse & Xu, 2009;
425 Shishmanova-Doseva et al., 2018). A nutrição, metabolismo, comportamento e estresse
426 podem afetar a expressão de BDNF no sistema nervoso central e periférico (Fuchikami
427 et al., 2009). O BDNF promove a proteção dos neurônios contra os danos causados por
428 infecções e sua expressão no sistema nervoso é modificada por muitos insultos como,
429 convulsão, estresse, isquemia e hipoglicemia (Yan et al., 1997). O BDNF regula a LPD
430 (depressão de longa duração) e a potenciação de longa duração (LTP), a plasticidade
431 sináptica, o crescimento axonal, a proliferação da árvore dendrítica e a diferenciação
432 neuronal (Murer et al., 2001; Tyler et al., 2002). Têm um papel central nos transtornos
433 psiquiátricos e seus níveis séricos são considerados como um possível biomarcador para
434 a saúde cerebral e distúrbios psiquiátricos (Babri et al., 2018).

435 O GDNF se mostra importante no desenvolvimento, sobrevivência e manutenção
436 dos neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo (Deister e Schmidt, 2006). Na transecção
437 de um nervo, ocorre um aumento significativo da expressão de RNAm do GDNF,
438 evidenciando seu forte envolvimento no processo de regeneração dos nervos periféricos
439 (Sebben et al., 2011).

440 O NGF possui papel no desenvolvimento, diferenciação, manutenção e
441 sobrevivência de neurônios simpáticos e sensitivos derivados da crista neural (Chao et
442 al., 2003). Este fator é importante na sobrevivência celular após lesão, na regeneração,
443 sensibilidade neuronal e expressão de neurotransmissores. É produzido por vários tecidos
444 periféricos, principalmente na pele e outros tecidos que recebem uma rica inervação
445 simpática ou sensorial. No SNC, o hipocampo é a maior fonte, onde são expressos através
446 dos principais neurônios excitatórios, bem como por um subconjunto de neurônios
447 inibidores contendo ácido γ -aminobutírico. As lesões inflamatórias provocam níveis
448 aumentados de NGF nos tecidos periféricos e com isso, aumentam a exposição dos
449 neurônios sensoriais ao NGF (Rattray et al., 2001).

450 Em estudo realizado por Morichi e colaboradores (2014) relatou-se o aumento dos
451 níveis de BDNF no soro e no líquido cefalorraquidiano de crianças com encefalopatias
452 de origem viral, em comparação com as crianças do grupo controle. Observou-se também
453 alta incidência de sequelas neurológicas nos pacientes com altos níveis de BDNF sérico
454 e no líquido cefalorraquidiano (Morichi et al., 2014).

455

456 **1.8.6 APOPTOSE E INFECÇÕES VIRAIS**

457 A apoptose é um processo de morte celular programada que leva à condensação
458 da cromatina, redução do volume celular, perda da aderência celular à matriz extracelular
459 e células vizinhas, fragmentação do DNA e formação de vesículas na membrana. Essas
460 vesículas são rapidamente fagocitadas por macrófagos e removidos sem que haja
461 processo inflamatório associado (Grivicich et al., 2007). A apoptose desempenha um
462 papel essencial na homeostasia, no desenvolvimento de órgãos e na remoção programada
463 de células (Namura et al., 1998; Griffiths et al., 2009). Porém, também participa de danos
464 teciduais em diferentes doenças neurodegenerativas e em processos isquêmicos (Desprès
465 et al., 1998; Jones et al., 2003). Várias doenças neurológicas causadas por infecções virais
466 levam à morte celular por apoptose, como por exemplo a raiva e a cinomose (Del Puerto
467 et al., 2011; Suja et al., 2011). A apoptose pode ser dividida em via intrínseca e via
468 extrínseca. A via intrínseca ou mitocondrial inicia-se após a privação de fatores de
469 crescimento ou após danos ao DNA por radiação, toxinas ou radicais livres. A via
470 extrínseca ou citoplasmática é ativada pela família de receptores do Fator de Necrose
471 Tumoral (TNF) ou mediada pelo linfócito T citotóxico.

472 Segundo Hardwick (2001), é difícil um vírus infectar uma célula sem ativar uma
473 das vias do processo de apoptose. Existe a possibilidade de que o BoHV-5 possua

474 mecanismos desconhecidos para inibir a morte celular e evitar o sistema imunológico do
475 hospedeiro. A apoptose é um mecanismo que tenta defender a célula hospedeira contra
476 os agentes virais, tendo estratégias de controle ou regulação, maximizando a produção da
477 progênie viral, permitindo a disseminação viral para as células vizinhas (Hay &
478 Kannourakis, 2002). De acordo com Scott (2010), o sucesso na replicação de muitos vírus
479 depende da habilidade em prevenir a indução da apoptose pela via mitocondrial. Em
480 estudos recentes, Rensetti e colaboradores (2018) sugerem uma possível associação entre
481 a replicação de BoHV-5 e a indução de apoptose no gânglio trigêmeo.

482

483

484

485

486

487

488

489

490

491

492

493

494

495

496

497

498 **2. JUSTIFICATIVA**

499 Nosso grupo de pesquisa padronizou um modelo murino de meningoencefalite por
500 BoHV-5, os camundongos foram infectados por via intracraniana, avaliamos os efeitos
501 do BoHV-5 no SNC e as respostas a essa infecção. Em um desses estudos foi avaliado o
502 papel dos SOCS (supressores da sinalização de citocinas) na resposta imune a
503 meningoencefalite causada pelo BoHV-5 em camundongos C57BL/6 selvagens e
504 deficientes para SOCS2. O modelo reproduziu os sinais clínicos ocorridos no hospedeiro
505 natural e observou-se neuroinflamação nos camundongos SOCS2^{-/-} infectados e o
506 aumento dos níveis cerebrais de algumas citocinas, quando comparados com
507 camundongos selvagens infectados. Neste estudo, sugerimos a participação de SOCS-2
508 na ativação e expressão de SOCS-1 e de IFN- β , com consequente controle da replicação
509 viral (Barbosa et al., 2016). Vários fatores estão envolvidos na patogênese das infecções
510 virais. Sabe-se que as alterações neurológicas estão frequentemente associadas aos danos
511 teciduais, disfunções imunológicas e alterações neuroquímicas decorrentes da infecção
512 (Vilela et al., 2011; Liu et al., 2017). As células imunes assim como os astrócitos e as
513 micróglia residentes ativam a produção de mediadores inflamatórios, que por sua vez,
514 podem interferir na secreção de fatores neurotróficos. Estes fatores participam do
515 processo de neuroproteção pela inibição da apoptose e dos efeitos anti-inflamatórios (Liu
516 et al., 2017; Prajeeth et al., 2017). No entanto, não existem estudos descrevendo as
517 alterações clinicopatológicas com o perfil neuroquímico e inflamatório durante a
518 meningoencefalite por BoHV-5 em camundongos. Além disso, os trabalhos abrangendo
519 o papel da resposta imune no controle da infecção murina são escassos. Portanto, o
520 presente estudo pretende avaliar as principais alterações clínicas associadas as vias de
521 ativação e de modulação da resposta imune, por meio da avaliação dos níveis encefálicos
522 de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias e da expressão de genes
523 de referência para as respostas imunes inata e adquirida. Adicionalmente, como uma das
524 respostas iniciais do hospedeiro, à infecção viral é a indução do interferon tipo I,
525 principalmente o IFN $\alpha\beta$ e sabendo que os receptores do tipo Toll (TLRs) são potentes
526 indutores de IFN tipo I, e também a possibilidade de estudar o papel dos TLR
527 endossomais 3, 7 e 9 no SNC de camundongos infectados por BoHV-5. Os estudos
528 desenvolvidos nesta área contribuirão para o melhor esclarecimento dos possíveis
529 mecanismos de ação envolvidos na meningoencefalite bovina por BoHV-5.

530

531

532 **3. OBJETIVOS**

533

534 **3.1 OBJETIVO GERAL**

535 Estudar os mecanismos associados às alterações clinicopatológicas, parâmetros imunes e
536 aspectos neuroquímicos durante a infecção por BoHV-5 em camundongos C57/BL6.
537 Além disso, pretende-se avaliar a participação dos TLRs 3/7/9 durante a infecção com
538 BoHV-5.

539

540 **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

541 Nos camundongos C57/BL6 não infectados e infectados com 10^4 ou 10^7 TCID₅₀ de
542 BoHV-5:

- 543 ◆ Avaliar peso corporal, alterações clínicas e alterações histopatológicas nos encéfalos
544 de camundongos dos diferentes grupos experimentais.
- 545 ◆ Estudar a expressão e ativação da micróglia, astrócito e morte celular na
546 meningoencefalite experimental causada por BoHV-5.
- 547 ◆ Mensurar os níveis teciduais de TNF, IL-12p70, IL-6, IFN- γ , IL-10, CCL2 através do
548 método CBA (cytometric bead array).
- 549 ◆ Quantificar nos encéfalos dos camundongos os níveis da proteína fraquitilquina
550 (CX3CL1) e dos fatores neurotróficos BDNF, GDNF e NGF através do método de
551 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).
- 552 ◆ Analisar a expressão de 84 genes relacionados à resposta imune inata e adaptativa por
553 qPCR array.
- 554 ◆ Avaliar os efeitos da deficiência dos TLR3/7/9 durante a infecção por BoHV-5 em
555 camundongos, as alterações clinicopatológicas, expressão e ativação de micróglia e
556 quantificar os fatores neurotróficos BDNF, GDNF e NGF através do método de ELISA
557 e compara-los aos camundongos C57BL/6 selvagens.

558

559

560

561

562

563

564

565 4. MATERIAL E MÉTODOS

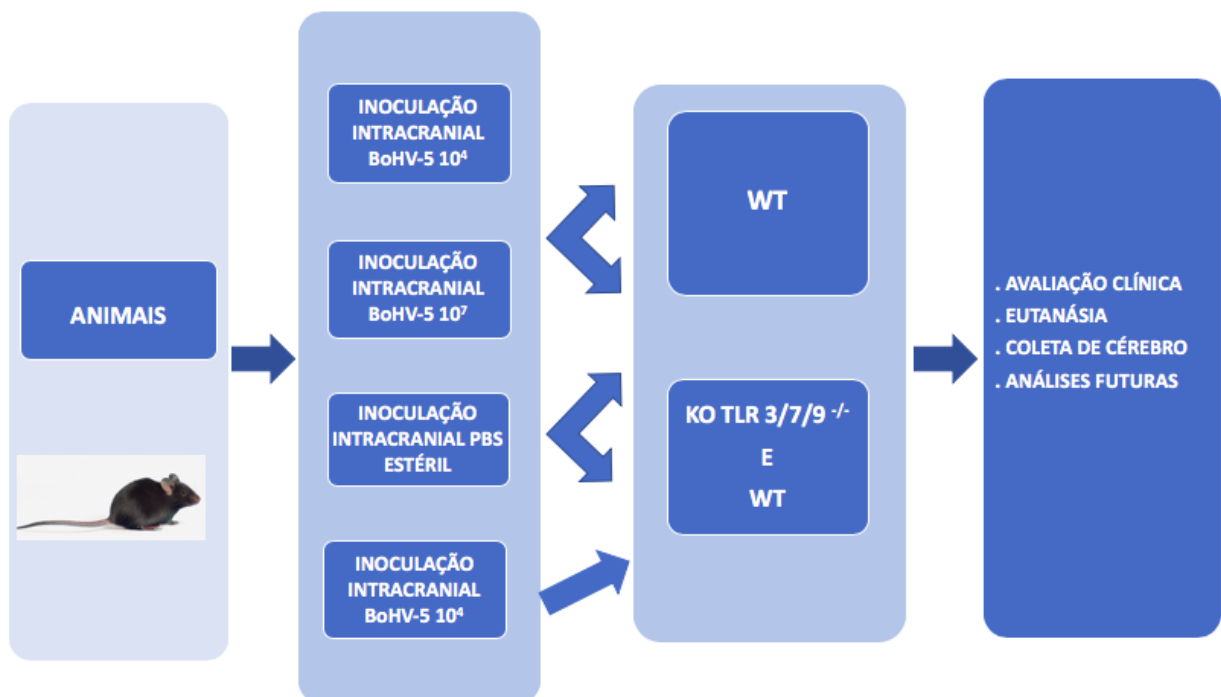
566

567 4.1 ANIMAIS

568 Foram utilizados camundongos convencionais da linhagem C57BL/6, machos,
569 com sete a nove semanas de idade, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal
570 de Minas Gerais e camundongos machos, com sete a nove semanas de idade, deficientes
571 para TLR3/7/9^{-/-} cedidos gentilmente pelo Prof. Dr. Marco Antônio Campos provenientes
572 do Instituto René Rachou (Fiocruz), localizado em Belo Horizonte - MG.

573 Todos os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura
574 (24°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) e tiveram livre acesso à ração e
575 água. Nosso projeto foi submetido e aprovado pelo CEUA (comitê de ética no uso de
576 animais) da UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais), sob o número de protocolo
577 272/11. No delineamento experimental os camundongos foram divididos em quatro
578 grupos representados abaixo pela **figura 3**.

579



580

581

582 **FIGURA 3:** Delineamento experimental animais divididos em quatro grupos: camundongos selvagens não infectados,
583 camundongos deficientes (KO) para TLR3/7/9^{-/-}, camundongos selvagens infectados com BoHV-5 e camundongos
584 deficientes (KO) para TLR3/7/9^{-/-} infectados com BoHV-5. Os animais infectados inoculados com o vírus BoHV-5 e
585 os animais não infectados inoculados com PBS estéril.

586

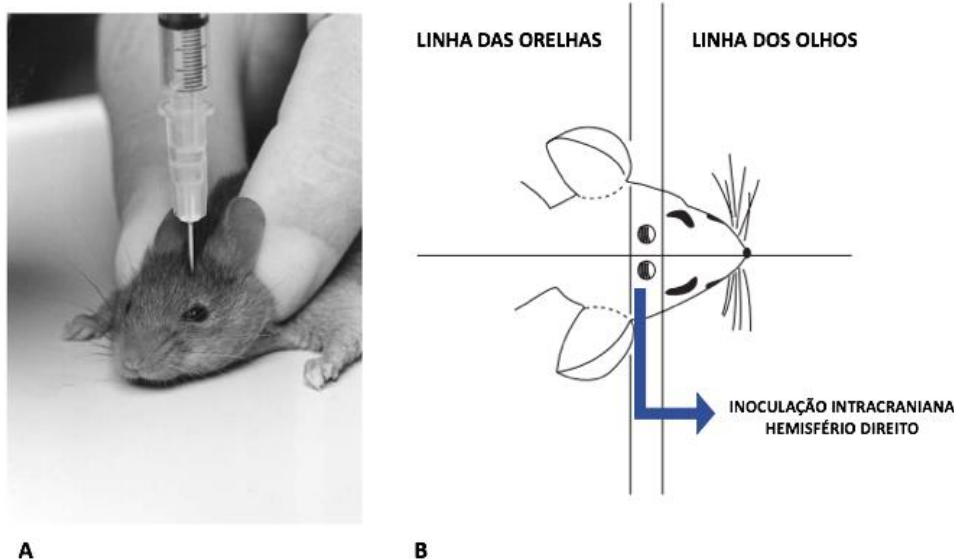
587 4.2 CULTIVO CELULAR E VIRAL

588 Foram realizadas titulações virais com culturas de células da linhagem CRIB-1
589 (CRL-11883, ATCC), provenientes da UFSM (Universidade Federal de Santa Maria),
590 gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Eduardo Furtado Flores. As células foram cultivadas
591 em garrafas próprias para esse fim (Corning®), utilizando meio D-MEM (Dulbecco
592 Modified Eagle Medium), Sigma®, acrescido de 2U/ml de Penicilina, 2µg/ml de
593 Estreptomicina e 10 µg/ml de Anfotericina B, acrescido de 5% de SFB (soro fetal bovino)
594 Cultilab®. As garrafas de células foram mantidas em estufa (Thermo Scientific, EUA) a
595 37° C, em atmosfera com 5% de CO₂ até o momento de uso. O subcultivo celular foi
596 realizado três vezes por semana na proporção de 1:3, sendo a monocamada celular lavada
597 com PBS (solução tampão fosfato salina) 1X e tratada com solução de tripsina contendo
598 EDTA (Sigma®). A amostra viral Mutum, disponibilizada para nossas pesquisas foi
599 isolada de um bovino proveniente da cidade mineira Mutum, atendido no Hospital
600 Veterinário da Escola de veterinária – UFMG. O isolamento, multiplicação, purificação
601 e titulação da amostra BoHV-5 Mutum foi realizada no Laboratório de Virologia Básica
602 e Aplicada, no departamento de Microbiologia, ICB (Instituto de Ciências Biológicas) -
603 UFMG. A amostra foi gentilmente cedida pela professora Edel Figueiredo Barbosa
604 Stancioli, assim como todo o processamento virológico realizado em nossos
605 experimentos. O título inicial para expansão do vírus foi de 10^{8,28} TCID₅₀/50 µL.

606

607 4.3 INOCULAÇÃO VIRAL

608 A inoculação nos experimentos foi realizada após avaliação clínica individual dos
609 camundongos. Os grupos foram anestesiados por via intraperitoneal com uma mistura de
610 xilazina (10mg/kg) e cetamina (80mg/Kg), de acordo com o peso individual, logo após,
611 foram submetidos ao inóculo de 1x10⁴ TCID₅₀ ou de 1x10⁷ TCID₅₀ do vírus BoHV-5
612 suspenso em 10µL de PBS, por via intracraniana. Os camundongos não infectados de
613 ambos experimentos, receberam 10µL de PBS, também por via intracraniana. A
614 inoculação fez-se utilizando seringas de insulina BD Ultrafina™ (0,3mm:0,8mm). O
615 inóculo de 10µL foi feito no lado direito da sutura sagital na direção do olho **figura 4**.



616
 617 **FIGURA 4:** Demonstração de uma inoculação intracraniana em camundongo. Em A: utilização da seringa intradérmica
 618 na inoculação, posicionamento e área para o inóculo, neste caso, o hemisfério esquerdo. Em B: Ilustra a demarcação
 619 correta para inóculos intracranianos nos hemisférios direito e esquerdo, a seta azul sinaliza a inoculação no hemisfério
 620 direito como realizado em nosso experimento. **Fonte:** adaptado de Shimizu, S., 2004:
 621 <http://www.usp.br/bioterio/Artigos/Procedimentos%20experimentais/Routeadministration-4.pdf>
 622

623 4.4 AVALIAÇÃO CLÍNICA

624 Todos os camundongos foram avaliados clinicamente e pesados diariamente, a
 625 partir do dia 0 (inoculação) até o terceiro dpi (dia pós infecção). Os animais
 626 permaneceram no Biotério de Experimentação do Departamento de Microbiologia, ICB
 627 - UFMG. Toda a manipulação animal foi realizada dentro do fluxo laminar e os mesmos
 628 mantidos em caixas com microisoladores e individualmente. Ao terceiro dpi após serem
 629 avaliados e pesados os camundongos foram eutanasiados com sobre dose de anestésico
 630 (Ketamina/Xilazina) por via intraperitoneal, os encéfalos foram removidos e estocados
 631 para as devidas análises futuras.

632

633 4.5 HISTOPATOLOGIA E IMUNOISTOQUÍMICA

634 As amostras do hemisfério cerebral direito foram coletadas de ambos os grupos e
 635 acondicionados para fixação do tecido em tubos falcon contendo formalina tamponada
 636 na concentração de 10% por 72 horas para posterior processamento e avaliação
 637 histopatológica. Em seguida, as amostras foram seccionadas com espessura de 2 mm,
 638 utilizando matriz slicer para cérebros de camundongo (Insight LTDA, Ribeirão Preto, SP,
 639 Brasil) e colocadas individualmente em cacetes individuais identificados. O excesso de
 640 líquido fixador foi removido lavando em água corrente por um período de 30 minutos.

641 Os tecidos então passaram por seis banhos sucessivos de 3 minutos cada, em soluções
642 alcoólicas nas seguintes concentrações: 70%, 80%, 90%, álcool absoluto I, álcool
643 absoluto II e álcool absoluto III. Para desparafinar, usou-se xilol, em dois banhos
644 sucessivos de 10 minutos cada, na sequência, xilol II e xilol I. O material então foi incluso
645 em parafina aquecida em dois banhos sucessivos de uma hora cada, nas soluções parafina
646 I e parafina II, então, foram resfriados no freezer, para obtenção dos blocos. Estes foram
647 seccionados através de um micrótomo a 5 µm de espessura, cortados em intervalos de 10
648 µm e os cortes transferidos para lâminas. As lâminas passaram por um processo de
649 desparafinização e reidratação e foram coradas pela técnica de HE (hematoxilina-eosina).
650 Posteriormente, as lâminas histológicas foram analisadas. Foi utilizada a seguinte
651 classificação de meningite (AMARAL, et al., 2011) **FIGURA 5:**

652

| CLASSIFICAÇÃO DE MENINGITE | |
|-----------------------------------|---|
| 0 | SEM INFLAMAÇÃO |
| 1 | UMA CAMADA DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS |
| 2 | DUAS CAMADAS DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS |
| 3 | TRÊS CAMADAS DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS |
| 4 | QUATRO A SEIS CAMADAS DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS |
| 5 | SETE OU MAIS CAMADAS DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS |

653

654

655 Para a realização da técnica de imunoistoquímica para todos os marcadores,
656 utilizamos as lâminas com os cortes banhados em parafina que estavam refrigerados, foi
657 realizado a desparafinização (3 banhos de xilol, 20/15 e 20 minutos) e desidratação (série
658 de álcool absoluto, 95%, 80% e 70% por 5 minutos cada) dos cortes, logo após lavados
659 2x em solução de PBS (5 minutos cada). Utilizou-se, para a marcação de caspase 3
660 clivada, na recuperação antigênica, uma solução de tampão citrato de sódio (pH 6,0) em
661 micro-ondas durante dez minutos. Para o bloqueio da peroxidase endógena, os cortes
662 foram incubados por 30 min à temperatura ambiente, com solução de H₂O₂ (peróxido de
663 hidrogênio) e PBS (10%) por 30 minutos.

664

665 A imunomarcação para caspase-3 clivada foi realizada da seguinte maneira: o
666 bloqueio de proteínas foi feito com leite em pão desnatado a 6% (p / v) e Tween-20 a 0,1%.
667 Os tecidos foram incubados durante 18 horas (overnight), em câmara úmida a 4  C, com
668 anticaspase-3 clivada (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), na diluição de
669 1:200, em BSA (Albumina do Soro Bovino) 1%. Para amplificação das reações, os cortes
670 foram lavados e incubados, à temperatura ambiente, em anticorpo secundário e complexo
671 estreptavidina biotina (Universal LSAB™+ kit/HRP, Dako, Califórnia, USA). A reação
672 foi revelada com solução de DAB [(diaminobenzidina peroxidase), Liquid DAB
673 Substrate Chromogen System®, Dako, Califórnia, USA] por 01 minuto. Todas as
674 lavagens foram realizadas em PBS. Os cortes foram contracorados com hematoxilina de
675 Mayer, por 30 segundos, montadas com Entellan (Merck, São Paulo, SP) e examinadas
676 microscopicamente.

677 Nas marcações para GFAP e Iba-1, a recuperação antigênica foi feita com tampão
678 de citrato de sódio (ph:6) em microondas por 12 minutos. Para o bloqueio das peroxidases
679 endógenas, os cortes foram incubados por 30 minutos, em solução de H₂O₂ e PBS (10%)
680 (Leica, EUA). Para o bloqueio de reações inespecíficas, utilizou-se leite em pão desnatado
681 em PBS a 6% (p/v) e Tween-20 a 0,1%. Os tecidos foram incubados overnight em câmara
682  mida e escura a 4   C, com o anticorpo primário policlonal contra os marcadores GFAP
683 (Diagnostic BioSystems, CA, USA) na diluição de 1:100 e Iba-1 (Anti-Iba1, EPR16588,
684 Abcam) na diluição de 1:2000. Os anticorpos secundários conjugado   enzima
685 estreptavidina peroxidase (HRP) foram adicionados aos cortes pelo tempo de 15 minutos
686 e reveladas com o cromógeno DAB a 5% (v/v) (Leica). Lavadas em água corrente por
687 10 minutos e contracorados com hematoxilina de Mayer, por 30 segundos, e montadas
688 com Entellan (Merck, São Paulo, SP) e examinadas microscopicamente.

689

690 **4.6 TITULAÇÃO VIRAL**

691 Foram utilizadas amostras contendo fragmentos do hemisfério esquerdo do
692 encefalo dos camundongos, estocados desde a coleta em eppendorfs a uma temperatura
693 de - 70  C. Os fragmentos foram pesados e macerados individualmente, dentro da capela
694 de fluxo laminar, utilizando pistilo, graal de cerâmica e nitrogênio líquido. Logo após,
695 realizou-se a ressuspensão, utilizando meio de acordo com o peso inicial das amostras. O
696 meio recebido foi o D-MEM (Sigma®), suplementado com penicilina (1,6mg/L),
697 estreptomicina (0.4mg/L) e fungizona (2,5mg/L). Centrifugou-se as amostras a 6708g por

698 10 minutos, 4° C, o sobrenadante de cada amostra foi coletado e acondicionado em
699 eppendorfs e estocado a -70° C até o momento do uso.

700 A titulação foi realizada com o sobrenadante estocado a -70° C de ambos os
701 grupos. Adicionamos 85.000 células/cm² a placas de 96 poços (Corning®), juntamente
702 com 150 µL/poço de meio D-MEM (Sigma®) suplementado com 5% de soro fetal bovino
703 (SFB) (Cultilab®). Na estufa (Thermo Scientific, EUA), as placas foram incubadas por
704 24 horas a temperatura de 37° C e atmosfera de 5% de CO₂. À monocamada celular
705 apresentando confluência de aproximadamente 90%, foram adicionadas as diluições
706 seriadas na base 10 previamente preparadas do material a ser titulado.

707 Plaqueou-se 08 replicatas de cada diluição, sendo elas de 10⁻¹ a 10⁻¹⁰, mantendo
708 poços contendo apenas meio não suplementado como controle celular. As placas foram
709 então levadas à estufa, nas mesmas condições previamente descritas, por uma hora para
710 adsorção viral. Após a adsorção, 100 µL de meio D-MEM (Sigma®) suplementado com
711 2,5% de SFB (Cultilab®) foram adicionados por poço, e a placa novamente incubada.
712 Diariamente, verificou-se, com auxílio de microscópio ótico, a presença ou ausência de
713 efeito citopático até a leitura final, completando-se 96 horas de incubação. O cálculo da
714 titulação das amostras virais foi realizado pelo método de Reed & Muench (1938).

715

716 **4.7 RT-PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DE TIMIDINA QUINASE (TK)**

717 O RNA total de fragmentos do encéfalo contralateral ao inóculo, foi extraído com
718 o kit RNEasy Mini (QIAGEN) e tratado com RNase-Free Dnase (QIAGEN) de acordo
719 com o protocolo do fabricante e quantificado com Nanovue Plus (GE Healthcare Life
720 Sciences, EUA). A transcrição reversa foi realizada usando 2 µg de RNA total, 200 U de
721 transcriptase reversa M-MLV RT (Promega, EUA), tampão enzimático 5 mM, DTT 0,1
722 M, dNTPs 10 mM, RNase-OUT 10000 U e 50 µM oligoDT em uma
723 reação com um volume final de 20 µL, da seguinte forma: 25° C por 5 min', 42° C por
724 90 min', 72° C por 15 min'. O cDNA foi amplificado por PCR convencional, usando
725 iniciadores específicos para identificar a expressão do gene da timidina-quinase do
726 BoHV-5 e da hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase - HPRT como housekeeping de
727 murinos. As sequências de iniciadores utilizados foram as seguintes: **FIGURA 6**

728

729

730

731

| | |
|---------------------|----------------------------|
| HPRT Forward | GTTGGATACAGACTTTGTT |
| HPRT reverso | GATTCAACTTGCGCTCATCTTAGGC |
| TK Forward | AAGTGCCGCGAGCTCTAC |
| Reverso TK | GGACACGTCCAGCATGAAG |

732

733 O PCR foi conduzido em um volume de reação final de 20 µL sendo: 4 µL de
734 tampão enzimático GoTaq Polimerase 5X (Promega), 1,5 mM MgCl₂, 1 µL de cada
735 primer (10 µM / µL), 0,4 µL de mistura de dNTP (200 µM) (Promega), 9,5 µL de água
736 livre de nuclease, 0,1 µL de enzima DNA polimerase GoTaq (Promega) (0,5U) e 4 µL de
737 cDNA, da seguinte forma: 95° C por 5 min', 35 ciclos de 94° C, 30 seg, 55° C (TK) ou
738 60° C (HPRT), 30 seg, 72° C, 1 min'. Uma extensão final foi realizada a 72° C por 7 min'.
739 Os produtos de PCR foram visualizados em géis de agarose a 1,2%.

740

741 **4.8 PCR- ARRAY**

742 Fragmentos encefálicos contralaterais à inoculação foram utilizados. O RNA total
743 dessas amostras foi isolado de acordo com as especificações do fabricante. A técnica de
744 qPCR foi realizada utilizando o kit Mouse Innate & Adaptative Immune Responses RT²
745 Profiler PCR Array (QIAGEN), a placa continha perfis de expressão para 84 genes
746 envolvidos na resposta do hospedeiro a infecção bacteriana e a septicemia, cinco genes
747 housekeeping, sendo eles: Actb, B2m, Gapdh, Gusb e Hsp90ab1 e os controles para RT
748 e reações do PCR. O RNA total foi transcrito de forma reversa, o cDNA resultante foi
749 diluído em água livre de nuclease e adicionada a RT² SYBR Green qPCR Mastermixes
750 (Qiagen), que foi posteriormente aliquotada a cada poço da matriz de PCR para PCR
751 quantitativa. Os ciclos térmicos e a detecção de fluorescência foram realizados utilizando
752 uma análise web online da Biorad iQTM5 (Laboratórios BioRad, Hemel Hempstead,
753 Reino Unido). As condições do ciclo foram: 10 min desnaturação a 95° C, seguida de 40
754 ciclos de 15 segundos a 95° C e 1 minuto a 60° C. Seis amostras não infectadas e seis

755 amostras infectadas foram utilizadas em placas individuais e os dados foram analisados,
756 utilizando o Profiler RT² Profiler PCR Array Data Analysis (Análise de dados online da
757 Qiagen). A mudança de *fold change* foi calculada pela determinação da relação entre os
758 níveis de RNAm e o controle utilizando a função ΔCt method ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$).

759

760 **4.9 WESTERN BLOT PARA CASPASE-3 CLIVADA E IBA-1**

761 Os extratos de células inteiras foram obtidos de hemisférios cerebrais
762 contralaterais de camundongos inoculados com BoHV-5 e hemisférios cerebrais
763 contralaterais de camundongos não infectados inoculados com PBS estéril. As amostras
764 foram maceradas em homogeneizador de tecidos utilizando um tampão de lise (Triton X-
765 100 a 0,5%, 100 mM de Tris/HCl em pH 8,0, glicerol a 20%, EDTA 0,5M a 0,2 mM,
766 NaCl 200 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, NaF 25 mM, 2,5 µg/ml de leupeptina, 5 µg/ml
767 de aprotinina e 5 µg /ml de ortovanadato de sódio).

768 Os lisados foram centrifugados a 10.000 RPMs durante 15 min a 4° C e
769 quantificados usando o reagente de ensaio de Bradford da Bio-Rad (Hercules, CA). Os
770 extratos proteicos (60 µg) foram separados por eletroforese em um gel de poliacrilamida-
771 SDS desnaturante a 12% e transferidos para membranas de nitrocelulose. As membranas
772 foram bloqueadas durante a noite a 4°C com PBS contendo 5% (p/v) de leite em pó
773 desnatado e 0,1% de Tween-20, lavadas por três vezes com PBS contendo 0,1% de
774 Tween-20. As membranas foram incubadas com os anticorpos primários anti-caspase-3
775 clivada de coelho (Cell Signaling Technology -Beverly MA, EUA), anti- β -actina de rato
776 (Sigma-Aldrich) e anti-Iba -1 (Abcam, Ab178846, EUA) utilizando uma diluição de
777 1:1000 em solução salina tamponada com fosfato contendo 5% (p/v) de BSA e 0,1% de
778 Tween-20.

779 Posterior a lavagem, a membrana foi incubada com anticorpo secundário
780 conjugado com Horseradish peroxidase (1:3000). As bandas imunorreativas foram
781 visualizadas usando um sistema de detecção de ECL, conforme descrito pelo fabricante
782 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA). Os níveis de caspase-3 clivada e anti-iba -1 foram
783 quantificados por meio de um software de análise densitométrica ImageJ (Processamento
784 e Análise de Imagens em Java - NIH, Bethesda, MD, EUA), e os valores foram
785 normalizados para os valores de β -actina na mesma amostra. As alterações nos níveis de
786 proteína foram estimadas, e os resultados foram expressos como uma razão de caspase-
787 3- clivada e anti-Iba1, medidas em unidades arbitrárias.

788

789 **4.10 DOSAGEM DOS NÍVEIS CEREBRAIS DE FATORES NEUOTRÓFICOS**
790 **POR ELISA**

791 Amostras do hemisfério cerebral contralateral de camundongos não infectados e
792 infectados foram pesadas e maceradas individualmente utilizando um tampão de lise, com
793 auxílio de um sonicador. As amostras permaneciam em eppendorf, o fundo do mesmo
794 permanecia no gelo, para evitar aquecimento da amostra. Após a maceração, as amostras
795 foram homogeneizadas em uma solução de extração (100 mg de tecido por mililitro)
796 contendo NaCl 0,4 M, NaCl 0,4 M, Tween 20 0,05%, BSA 0,5%, fenil 0,1 mM. fluoreto
797 de metilsulfonil, cloreto de benzotônio 0,1 mM, EDTA 10 mM e aprotinina 20 KIU
798 usando Ultra-Turrax. Os lisados foram centrifugados a 14.000 rpm por 20 min a 4° C, os
799 sobrenadantes foram coletados e armazenados a -70° C até o uso. A dosagem das
800 concentrações dos fatores neurotróficos foram marcadas com anticorpos anti-BDNF,
801 anti-NGF e anti-GDNF, determinadas pela técnica de ELISA, utilizando o kit (R&D
802 Systems, Minneapolis, MN) de acordo com as instruções do fabricante. Os dados foram
803 expressos em picogramas por 100 mg de tecido.

804

805 **4.11 ANÁLISE DE CBA À NÍVEIS CEREBRAIS EM CAMUNDONGOS**

806 As amostras armazenadas a uma temperatura de -80° C, foram utilizadas para a
807 técnica de CBA. Os fragmentos de tecido encefálico do hemisfério contralateral a
808 inoculação, dos grupos mock e grupo infectados, foram homogeneizadas em uma solução
809 de extração de tampão PBS contendo um coquetel inibidor de protease. Os lisados foram
810 centrifugados a 13.000g por 10 min a 4° C e armazenados a -70° C até o uso. As IL-12p70,
811 IL-6, CCL2, TNF e IL-10 foram quantificadas utilizando o Reagente de Ensaio Bio-Rad
812 Bradford (Hercules, CA). As análises dos níveis de citocinas cerebrais foram
813 determinadas usando o kit de inflamação de camundongos BD™ CBA (CBA; BD
814 Biosciences, San Diego, CA) e analisadas por FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose,
815 CA). As quantidades de proteína nos lisados de análise de CBA foram quantificadas
816 usando o Bio-Rad Bradford Assay Reagent (Hercules, CA).

817

818

819

820

821

822

823 **4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

824 Todos os dados foram testados quanto à normalidade (teste de Kolmorov-
825 Smirnov). Para variáveis normalmente distribuídas, as diferenças foram comparadas
826 usando o teste t de Student. Todas as análises foram realizadas no software GraphPad
827 Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, San Diego, CA, EUA). Todos os valores foram
828 expressos como média \pm erro padrão da média (MEV). A significância estatística foi
829 assumida para todos os valores de $p < 0,05$.

830

831 **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

832

833 Os resultados e discussão serão apresentados em três capítulos. O primeiro
834 capítulo teve como objetivo abordar as alterações clínicas, patológicas e neuroquímicas
835 encontrados durante a meningoencefalite por BoHV-5 em camundongos selvagens. No
836 segundo capítulo, utilizando o mesmo modelo, foram avaliados os aspectos imunes frente
837 à infecção por BoHV-5. E no terceiro capítulo avaliou-se a resposta à infecção por BoHV-
838 5 em camundongos selvagens e deficientes para TLR3/7/9^{-/-}.

839

840

841

842

843

844

845

846

847

848

849

850 **6. CAPÍTULO I**

851 *“Neurological changes were associated with brain damage and downregulation of*
852 *BDNF levels in mice infected with bovine alphaherpesvirus 5”*

853

854 Manuscrito enviado para o periódico: *The Scientific World Journal*.

855

856 **Neurological changes are associated with brain damage and downregulation of**
857 **BDNF levels in mice infected with bovine alphaherpesvirus 5**

858

859 Daniele Gonçalves Silva^{1*}, Iracema Luisa Quintino-de-Carvalho^{2*}, Eliana Cristina de
860 Brito Toscano¹, Bruna da Silva Oliveira³, Larissa Froede Brito⁴, Lirlândia Pires Sousa⁴,
861 Flávio Guimarães da Fonseca², Antônio Lúcio Teixeira⁵, Aline Silva de Miranda³, Edel
862 Figueiredo Barbosa-Stancioli², Milene Alvarenga Rachid^{1#}

863

864 *Departamentos de Patologia Geral¹, Microbiologia², Morfologia³, Instituto de Ciências*
865 *Biológicas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas⁴, Faculdade de*
866 *Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, MG, Brasil. Translational Psychiatry*
867 *Program, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, School of Medicine,*
868 *University of Texas Health Science Center at Houston, TX⁵.*

869 ***Contributed equally**

870

871 **Corresponding author:**

872 [#]Milene Alvarenga Rachid

873 Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de
874 Patologia Celular e Molecular, Campus Pampulha, Av. Antônio Carlos 6.627 - Belo
875 Horizonte, Minas Gerais, Brasil. 31270-901

876 Tel/Fax: 55-31-34092878

877 e-mail: milenerachid@gmail.com

878



Submit a Manuscript Author Activities

6069825.v1 (Research Article)

| | |
|-------------------|--|
| Title | Neurological changes were associated with brain damage and downregulation of BDNF levels in mice infected with bovine alphaherpesvirus 5 |
| Journal | The Scientific World Journal |
| Subject Area | Veterinary Science |
| Issue | Regular |
| Additional Files | Cover Letter |
| Manuscript Number | 6069825 (Research Article) |
| Submitted On | 2019-12-02 |
| Author(s) | Daniele Gonçalves Silva, Iracema Luisa Quintino-de-Carvalho, Eliana Cristina de Brito Toscano, Bruna Oliveira, Larissa Froede Brito, Lirlândia Sousa, Flávio Guimarães da Fonseca, Antônio Lúcio Teixeira, Aline S. De Miranda, Edel Figueiredo Barbosa-Stancioli, Milene Alvarenga Rachid |
| Editor | Agnieszka Rak |
| Status | Under Review |

879

ABSTRACT

880

881 The infection with Bovine alphaherpesvirus 5 (BoHV-5) has been associated with
882 neurological disease and meningoencephalitis in cattle. BoHV-5 infection is
883 characterized by neuronal loss, infiltration of immune cells and, eosinophilic intranuclear
884 inclusion bodies in astrocytes and neurons. Astrocytes develop pro-inflammatory and
885 anti-inflammatory functions and are related with the production of neurotrophic factors,
886 which play an important role in the survival of neurons in different CNS diseases. In the
887 current study, we investigated a potential involvement of astrocytes and the levels of
888 neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor (BDNF), glial cell line derived
889 neurotrophic factor (GDNF), and neural growth factor (NGF) with brain damage and
890 neurological sequelae after experimental BoHV-5 infection. Mice were infected with 10^7
891 TCID₅₀ of BoHV-5 by intracranial route and evaluated until day 3 post infection. Infected
892 animals had ruffled fur, conjunctivitis, serous nasal secretion and swollen chamber,
893 apathy, ataxia, hunched posture and circling. The infection promoted histopathological
894 changes characterized by different degrees of meningoencephalitis, neuropil vacuolation,
895 hemorrhage and reactive gliosis at day 3 post infection. Cleaved caspase-3
896 immunopositive glio-inflammatory cells were visualized around some blood vessels and
897 increased immunoexpression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) was presented
898 throughout the parenchyma from brains of infected animals. Moreover, the infected
899 animals had lower concentration of BDNF, compared with mock group. The viral load
900 was of $1 \times 10^{3.5}$ TCID₅₀/ml. Our results demonstrated that clinical signs related to brain
901 inflammation, astrocytosis and tissue damage after infection in mice. Moreover, we
902 suggest that BDNF could be involved with anti-apoptotic effect and neuroprotection
903 during meningoencephalitis by BoHV-5.

904 **Keywords:** BoHV-5, astrocytes, neurotrophic factors, apoptosis, mice

905

906

907 **1. INTRODUCTION**

908 Bovine alphaherpesvirus 5 (BoHV-5) has been related to the development of
909 neurological signs and meningoencephalitis in cattle (Perez et al., 2002; Rissi et al.,
910 2008). The affected animals may present several clinical signs such as serous nasal
911 secretion, apathy, tremors, circling, ataxia, nystagmus, seizures, recumbency and death.
912 The neurological signs usually are associated with brain lesions such as inflammation and
913 neuronal degeneration (Cardoso et al., 2010; Del Medico Zajac et al., 2011; Megid et al.,
914 2015; Perez et al., 2002). Moreover, the presence of the virus has been detected in cattle
915 brain areas of inflammatory infiltration along with the expression of pro-inflammatory
916 cytokine genes following acute infection with BoHV-5 (Cardoso et al., 2016). We
917 previously reproduce the BoHV-5-associated encephalitis in a murine model and
918 described the participation of suppressor of cytokine signaling (SOCS-2) in the
919 modulation of the immune response. In this model, we detected the brain expression of
920 IFN- γ , IL-10, CXCL1 and CCL5 in infected wild-type animals and enhanced brain
921 inflammation associated with higher levels of IFN α/β , TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-12,
922 CXCL1 and CCL5 and broadly viral replication in SOCS-2 deficient mice (Barbosa et
923 al., 2016a).

924 In the central nervous system, inflammatory mediators are mainly produced by
925 activated resident brain cells including microglia and astrocytes (Peng et al., 2011; Walsh
926 et al., 2014). These glial cells have pro-inflammatory and anti-inflammatory functions
927 and can be source of neurotrophic factors (Liu et al., 2017; Prajeeth et al., 2017).
928 Neurotrophic factors such as brain derived neurotrophic factor (BDNF), nerve growth
929 factor (NGF) and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) play important roles
930 in neuronal proliferation, survival, synaptic plasticity and neurogenesis, ultimately
931 leading to neuroprotection (Vilar and Mira, 2016). A crosstalk between inflammation and
932 neurotrophic factors has been reported in different brain diseases, such as cerebral
933 malaria, brain ischemia and reperfusion and septic encephalopathy (Calsavara et al.,
934 2015; De Miranda et al., 2015; Edna Constanza Gómez Victoria et al., 2017). For
935 instance, we have previously demonstrated, by employing a murine cerebral malaria
936 model, a negative correlation between inflammatory cytokines (IL-6 and TNF) and the
937 neurotrophic factors, BDNF and NGF (De Miranda et al., 2015). In line with these
938 findings, it has been reported that neurotrophic factors might modulate the inflammatory
939 response and present anti-apoptotic properties (de Miranda et al., 2016; E.C.G. Victoria
940 et al., 2017; Xu et al., 2017).

941 In this scenario and due to the little information in the literature on the relationship
942 of neurotrophic factors in meningoencephalitis caused by BoHV-5, we aimed to evaluate
943 the association of neurological deficits with histopathological and immunohistochemical
944 changes, as well as the levels of neurotrophic factors in response to a BoHV-5 infection
945 in mice.

946 **2. MATERIALS AND METHODS**

947 **2.2 Virus and cell culture**

948 BoHV-5 strain Mutum (GenBank AY916517) was allowed to multiply at low
949 multiplicity of infection (MOI 0.01) and at passage 5 in Mardin Darby bovine kidney
950 (MDBK, ATCC, USA) cells, containing 5% fetal bovine serum (FBS) inactive and free
951 for Mycoplasma and Bovine Viral Diarrhea Virus (ThermoFisher Scientific, USA) and
952 treated with penicillin (1.6mg/l), streptomycin (0.4mg/l) and fungizone (2.5mg/l) at 37°C
953 in 5% CO₂². To produce viral stocks, the supernatant was harvested, cell debris was
954 removed by centrifugation at 2,000 ×g for 5 min, and the viral supernatant was purified
955 by precipitation with an 77% saturated solution of ammonium sulphate followed by
956 centrifugation at 8000 rpm (rotor GS-3, RC-5B-Sorvall). After that, the supernatant was
957 discarded and the precipitate was homogenized in 10mL of PBS (pH 7.6) and further
958 twice centrifuged through a 36% (wt/vol) sucrose cushion at 14000 rpm for 2 hours at
959 4°C (rotor AH-629 Sorvall). After that the final precipitate was again centrifuged through
960 a 36% (wt/vol) sucrose cushion at 20000 rpm for 1 hour at 4°C (rotor AH-629 Sorvall).
961 The virus titers obtained were 10^{8.28} TCID₅₀/ml.

962

963 **2.3 Experimental design**

964 After anesthesia with intraperitoneal injection of a mixture of ketamine 100 mg/kg
965 (10% Syntec) and xylazine 10 mg/kg (2% Syntec), Twenty-one seven-week-old male
966 C57BL/6 mice was inoculated with 1x10⁷ TCID₅₀ inoculum of the purified BoHV-5
967 resuspended in 10 µL of phosphate-buffered saline (PBS). The inoculum was injected
968 intracranially in the right side of the sagittal suture at the level of the eyes. Ten non-
969 infected (mock) mice received 10 µL of PBS with the same conditions. A total of 10
970 animals per group were used for calculate the percent original of body weight. All animals
971 were obtained from the Central Bioterium (UFMG). This study was approved by the
972 Committee for Ethical Conduct in the Use of Animals in Research of Universidade
973 Federal de Minas Gerais (Protocol Number 272/11).

974

975 **2.4 Histopathology and immunohistochemistry**

976 Mice were euthanized at day 3 post infection and brains were immediately
977 removed and fixed in 10% buffered formalin for histological analysis. A total of 5 animals
978 and 7 animals were used respectively from mock and infected groups. The euthanasia
979 was performed using an overdose of sterilized mixture with ketamine 100 mg/kg (10%
980 Syntec) and xylazine 10 mg/kg (2% Syntec) in PBS. After fixation, the whole brains were
981 cut into coronal slices of 2 mm in thickness using a mouse brain slicer matrix (Insight
982 LTDA, Ribeirão Preto, SP, Brazil). Sections of approximately 4 μ m were obtained and
983 stained with hematoxylin and eosin. Other sections of these fragments were used to
984 perform immunohistochemical reactions for cleaved caspase-3 polyclonal and GFAP
985 monoclonal. These sections were submitted to antigen recover with sodium-citrate buffer
986 (pH 6) for 12 min in microwave and it was blocked for endogenous peroxidase activity
987 with H₂O₂ and PBS solution (10%) for 30 min. After, the protein block was made with
988 non-fat dry milk in PBS 6% (w/v) and 0.1% Tween-20. Brain sections were then
989 incubated with rabbit monoclonal antibody against cleaved caspase-3 (Cell Signalling) or
990 rabbit polyclonal antibody to GFAP (Abcam), which were diluted 1:100 and incubated
991 overnight at 4° C. Biotinylated polyclonal link and streptavidin-HRP (Leica) were applied
992 and the sections were incubated with diaminobenzidine 5% (v/v) (Leica). Then, the
993 sections were counterstained with haematoxylin and examined microscopically.

994

995 **2.5 Lysate preparation and Western blot analysis**

996 Western blot analysis for cleaved caspase-3 was performed as described (Toscano
997 et al., 2016). Briefly, whole cell extracts were obtained from homogenized brains by
998 using a lyses buffer (1% (v/v) Triton X-100, 100 mM Tris/HCl, pH 8.0, 10% (v/v)
999 glycerol, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 25 mM NaF, 2.5 g/ μ ml
1000 leupeptin, 5 g/ml aprotinin, and 1 mM sodium orthovanadate. Lysates were centrifuged
1001 at 13,000g for 10 min at 4°C and quantified using the Bradford assay reagent from Bio-
1002 Rad (Hercules, CA). Protein extracts (60 μ g) were separated by electrophoresis on a
1003 denaturing 15% polyacrylamide-SDS gel and transferred onto nitrocellulose membranes.
1004 Membranes were blocked overnight at 4°C with PBS containing 5% (w/v) non-fat dry
1005 milk and 0.1% Tween-20 and washed three times with PBS containing 0.1% Tween-20.
1006 The membranes were then incubated with rabbit anti-cleaved caspase-3 (Cell Signalling
1007 Technology -Beverly MA, USA) or mouse anti-beta-actin (Sigma-Aldrich), using a
1008 dilution of 1:1000 in phosphate-buffered saline containing 5% (w/v) BSA and 0.1%

1009 Tween-20. After washing, membrane was incubated with appropriate horseradish
1010 peroxidase conjugated secondary anti-body (1:3000). Immunoreactive bands were
1011 visualized by using an enhanced chemiluminescence detection system, as described by
1012 the manufacturer (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). The levels of cleaved caspase-
1013 3 were quantified by using a densitometric analysis software (ImageJ, Image Processing
1014 and Analysis in Java), and the values were normalized to the values of β -actin in the same
1015 sample. Changes in protein levels were estimated, and the results were expressed as a
1016 cleaved caspase-3- β actin ratio, measured in arbitrary units. The brains from mock (n=6)
1017 and BoHV-5 infected animals (n=8) were used.

1018

1019 **2.6 ELISA of neurotrophic factors (BDNF, NGF and GDNF)**

1020 The whole brains from mock (n=5) and infected (n=8) mice were homogenized in
1021 an extraction solution (100 mg of tissue per milliliter), containing 0.4M NaCl, 0.05%
1022 Tween 20, 0.5% BSA, 0.1 mM phenyl methyl sulphonyl fluoride, 0.1 mM benzethonium
1023 chloride, 10 mM EDTA, and 20 KIU aprotinin, using Ultra-Turrax. Lysates were
1024 centrifuged at 13,000g for 10 min at 4° C, supernatants were collected and stocked at -
1025 70° C until use. The concentration of neurotrophins (BDNF, NGF, and GDNF) was
1026 determined by ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN) in accordance to the
1027 manufacturer's instructions. The data were expressed as picogram per 100 mg of tissue.

1028

1029 **2.7 Viral titration**

1030 Brains from the contralateral side of inoculation were also collected and stored at
1031 -80°C. The samples were inoculated on MDBK cells grown in and monitored for
1032 cytopathic effect (CPE) for 4 days. Samples were pooled and titers were calculated by the
1033 Reed and Muench method. The values were expressed by TCID₅₀/mL. A total of animals
1034 from the mock group (n=6) and animals from the infected group (n=7) were used.

1035

1036 **2.8 Statistical analysis**

1037 All data were tested for normality (Kolmorov-Smirnov's test). For variables
1038 normally distributed, differences were compared by using Student's t test. All analyses
1039 were performed using GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software, La Jolla, San
1040 Diego, CA, USA). All values were expressed as mean \pm standard error of the mean
1041 (SEM). Statistical significance was assumed for all values of $p < 0.05$.

1042

1043 **3. Results**

1044 **3.1 BoHV-5 infection promoted body weight loss and clinical signs**

1045 The mock animals (n=10) did not show any clinical signs and the percent of
1046 original body weight did not differ statistically after the inoculation of PBS by intracranial
1047 route. Otherwise, BoHV-5 infected mice (n=10) exhibited significant decrease in the
1048 percent of body weight at day 1 post infection (Fig.1). The infected animals presented
1049 ruffled fur, conjunctivitis, serous nasal secretion, swollen chamber, apathy, ataxia,
1050 hunched posture and circling.

1051

1052 **3.2 Histopathology and immunohistochemistry**

1053 Mock animals (n=5) had no evidence of morphological changes in the brain (Fig.2
1054 A-C). All BoHV-5 infected mice (n=7) developed meningoencephalitis, characterized by
1055 infiltration of mononuclear cells in the leptomeninges (Fig.2 D) and in the parenchyma
1056 from cerebrum, brainstem and cerebellum. Areas of spongiosis and focal hemorrhages
1057 were visualized in the brainstem and cerebellum. Some infected animals also presented
1058 choroiditis characterized by infiltration of macrophages, lymphocytes and neutrophils in
1059 the choroid plexus from lateral ventricles (Fig.2 E). Infected animals also exhibited
1060 perivascular cuffs of lymphocytes and macrophages and reactive gliosis in the neuropil
1061 from cerebrum, brainstem and cerebellum. Some shrinkage, hypereosinophilic neurons
1062 were detected in the CA region of hippocampus (Fig.2 F). Cleaved caspase-3
1063 immunopositive glio-inflammatory cells were visualized around some blood vessels in
1064 the cerebrum (Fig.2 G-I). Control group showed some positive GFAP astrocytes with
1065 small cell bodies. The brains from infected animals showed astrogliosis with increased
1066 expression of GFAP at cerebrum, brainstem and cerebellar regions (Fig.2 J-L).

1067

1068 **3.3 Expression of cleaved caspase-3 by Western blot analysis**

1069 In order to confirm the brain activation of caspase-3 after BoHV-5 infection, we
1070 performed western blot to detect the levels of cleaved caspase-3 in brain tissue. The
1071 infected animals (n=8) showed higher activation of cleaved caspase-3, compared with
1072 mock group (n=6) ($p < 0.05$), suggesting brain apoptosis (Fig.3).

1073

1074 **3.4 Neurotrophic factors expression**

1075 To investigate the participation of neurotrophic factors during BoHV-5 infection,
1076 we measure the brain expression of BDNF, NGF and GDNF. Infected animals (n=8)

1077 presented lower brain levels of BDNF, compared with mock animals (n=5) (p<0.007).
1078 Both groups presented similar levels of NGF and GDNF at day 3 post-infection (Fig.4).

1079

1080 **3.5 Viral titration**

1081 Infected animals had viral load of $1 \times 10^{3.5}$ TCID₅₀/ml at day 3 post infection (data
1082 not shown).

1083

1084 **4. DISCUSSION**

1085 In the present work, we investigated potential associations among brain
1086 histopathological changes, activation of apoptotic marker caspase-3, astrogliosis and
1087 decrease expression of the neurotrophic factor BDNF, following BoHV-5 infection.
1088 Infected animals presented similar clinical signs that were described in cattle during
1089 experimental and natural infections (Elias and Lucia, 2004; Megid et al., 2015; Rissi et
1090 al., 2008). Moreover, animals inoculated with 10^7 TCID₅₀ of BoHV-5 developed
1091 neurological symptoms, similar to those reported in rabbits (Chowdhury et al., 2002;
1092 Machado et al., 2013; Meyer et al., 1999) and cattle after experimental inoculation
1093 (Ladelfa et al., 2011). Some authors described that BoHV-5 was able to infect and
1094 replicate within the central nervous system (CNS) of BALB/c mice after intracranial
1095 injection of 10^6 TCID₅₀/mL of BoHV-5 (Mesquita et al., 2017). We previously
1096 demonstrated that the inflammation was associated with up-regulation of brain pro-
1097 inflammatory cytokines and chemokines after intracranial inoculation of 10^4 TCID₅₀
1098 BoHV-5 in mice (Aparecida Silva Barbosa et al., 2016b). In the present work, all infected
1099 mice developed different degrees of brain inflammation and had viral replication in the
1100 parenchyma at day 3 post infection. The inflammatory process was detected in the
1101 meninges, cerebrum, brainstem, cerebellum and ventricles. Meningoencephalitis seen in
1102 cattle infected by BoHV-5 was also characterized by infiltration of immune cells at in
1103 different brain regions, such as meninges, cerebral cortex, thalamus, cerebellum and
1104 medulla (Elias and Lucia, 2004; Megid et al., 2015; Vogel et al., 2003). The activation of
1105 resident glia leads to modulation of inflammatory response and infiltration of immune
1106 cells. We suggest that the BoHV-5 infection could contribute to host inflammatory
1107 response, resulting in tissue damage as observed by other models of viral diseases
1108 (Marques et al., 2017; Myint et al., 2014; Vilela et al., 2016). We detected
1109 immunopositive cells for caspase-3 in the areas of inflammation and glial response. These
1110 findings were confirmed by the evaluation of higher expression of cleaved caspase-3 in

1111 infected mice, compared with mock animals, revealing that the activation of apoptosis
1112 during BoHV-5 infection also occurs in mice. Our findings corroborate some studies that
1113 described the induction of apoptosis by BoHV-5 in bovine-derived neuron-like cells using
1114 TUNEL and annexin V markers (Cardoso et al., 2015) and in neuronal and glial-derived
1115 tumor cell cultures (Cardoso et al., 2015). Glial cells are important for the recognition of
1116 pathogens and the actions that follow for their elimination. In a study on Zika virus, the
1117 results showed an increased expression of astrocytes in infected cultures compared to
1118 control cultures. This increase in astrocytes increased the secretion of IP-10, which is an
1119 important chemokine in the control of an infection, participating in the defense
1120 mechanisms that attenuate the viral load (Ojha et al., 2019). Astrocytes are related with
1121 the production of neurotrophic factors, which play an important role in the survival of
1122 neurons in multiple CNS diseases (Liu et al., 2017; Prajeeth et al., 2017). Reactive
1123 astrocytes were detected mainly in cortical areas, hippocampus, and subependymal layer
1124 after experimental infection with BoHV-5 in rabbits (Machado et al., 2013). In the current
1125 study, BoHV-5 infection promoted activation of astrocytes in the damaged areas along
1126 with significant reduction of BDNF expression. This neuroprotection related to BDNF
1127 has been also reported by Mocchetti and Alessia (Mocchetti and Bachis, 2004) that
1128 observed prevention of apoptosis by inhibition of caspase-3 activation in cerebellar
1129 granule cells infected with HIV-1. Apoptosis was also targeted in a study on a strain of
1130 the rabies virus, where the virus blocked neural apoptosis and promoted widespread and
1131 efficient neuroinvasion. Research shows that this virus strategy avoids elimination and
1132 promotes an infectious, non-lethal cycle that guarantees long-term survival in the host.
1133 Studies also suggest the onset of apoptosis in inflammatory cells that interferes with the
1134 release of cytokines (Suja et al., 2011). Recently it was reported that neuronal loss
1135 occurred after BDNF depletion, leading to exacerbation of neuropathology in an
1136 experimental model of Alzheimer's disease (Braun et al., 2017). Furthermore, previous
1137 studies indicated the participation of BDNF in anti-inflammatory and anti-apoptotic
1138 effects in experimental models of *S. pneumoniae* meningitis (Xu et al., 2017). Our data
1139 suggested that BDNF also exert important role to neuroprotection during BoHV-5
1140 infection in mice.

1141
1142
1143
1144

1145 **5. CONCLUSION**

1146 In summary, according to the literature data, some cited in this article, and the
1147 findings in our experiment, we suggest that BDNF together with other mechanisms,
1148 which need to be better understood, may be involved with the anti-apoptotic and
1149 neuroprotective effect during meningoencephalitis by BoHV-5.

1150

1151 **Conflict of Interest Statement**

1152 The authors report no conflict of interests.

1153

1154 **Acknowledgements**

1155 This work was supported by “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
1156 Tecnológico” (CNPq) [grant number 449963/2014-4] and “Fundação de Amparo à
1157 Pesquisa do Estado de Minas Gerais” (FAPEMIG) [grant number APQ-02437-14];
1158 UFMG, Brazil. I.L. Quintino-de-Carvalho, L.P. Souza, F.G. Fonseca, A.C. Vasconcelos,
1159 M.M. Teixeira, E.F. Barbosa Stancioli and M.A. Rachid received fellowships from
1160 CNPq.

1161

1162 **REFERENCES**

- 1163 Barbosa, A., Freitas Versiani, A., Fonseca da Cunha Sousa, L., Silva de Miranda, A.,
1164 Gasparini, M.R., Brant, F., Silva, D.G., Luisa Quintino-de-Carvalho, I., Marianetti
1165 Soriani, F., Guimarães da Fonseca, F., César Vasconcelos, A., da Silva Barcelos, L.,
1166 Martins Teixeira, M., Lúcio Teixeira, A., Machado, F.S., Barbosa-Stancioli, E.F.,
1167 Rachid, M.A., 2016a. Role of the suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2) during
1168 meningoencephalitis caused by Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5). *Comparative*
1169 *Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 47, 26–31.
1170 <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.05.003>
- 1171 Braun, D.J., Kalinin, S., Feinstein, D.L., 2017. Conditional Depletion of Hippocampal
1172 Brain-Derived Neurotrophic Factor Exacerbates Neuropathology in a Mouse Model
1173 of Alzheimer’s Disease. *ASN Neuro* 9, 175909141769616.
1174 <https://doi.org/10.1177/1759091417696161>
- 1175 Calsavara, A.C., Soriani, F.M., Vieira, L.Q., Costa, P.A., Rachid, M.A., Teixeira, A.L.,
1176 Teixiera, A.L., 2015. TNFR1 absence protects against memory deficit induced by
1177 sepsis possibly through over-expression of hippocampal BDNF. *Metabolic brain*
1178 *disease* 30. <https://doi.org/10.1007/s11011-014-9610-8>
- 1179 Cardoso, T.C., Ferrari, H.F., Garcia, A.F., Bregano, L.C., Andrade, A.L., Nogueira, A.H.,
1180 2010. Immunohistochemical approach to the pathogenesis of clinical cases of bovine
1181 Herpesvirus type 5 infections. *Diagnostic pathology* 5, 57–64.
1182 <https://doi.org/10.1186/1746-1596-5-57>
- 1183 Cardoso, T.C., Ferreira, H.L., Okamura, L.H., Giroto, T.P., Oliveira, B.R.S.M., Fabri,
1184 C.U.F., Gameiro, R., Flores, E.F., 2016. Cellular response markers and cytokine
1185 gene expression in the central nervous system of cattle naturally infected with bovine
1186 herpesvirus 5. *The Veterinary Journal* 218, 71–77.
1187 <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.11.014>
- 1188 Cardoso, T.C., Ferreira, H.L., Okamura, L.H., Oliveira, B.R.S.M., Rosa, A.C.G.,
1189 Gameiro, R., Flores, E.F., 2015. Comparative analysis of the replication of bovine
1190 herpesvirus 1 (BHV1) and BHV5 in bovine-derived neuron-like cells. *Archives of*
1191 *Virology* 160, 2683–2691. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2537-5>
- 1192 Chowdhury, S.I., Onderci, M., Bhattacharjee, P.S., Al-Mubarak, A., Weiss, M.L., Zhou,
1193 Y., 2002. Bovine herpesvirus 5 (BHV-5) Us9 is essential for BHV-5
1194 neuropathogenesis. *Journal of Virology* 76, 3839–3851.
1195 <https://doi.org/10.1128/JVI.76.8.3839>

1196 De Miranda, A.S., Brant, F., Campos, A.C., Vieira, L.B., Rocha, N.P., Cisalpino, D.,
1197 Binda, N.S., Rodrigues, D.H., Ransohoff, R.M., Machado, F.S., Rachid, M.A.,
1198 Teixeira, A.L., 2015. Evidence for the contribution of adult neurogenesis and
1199 hippocampal cell death in experimental cerebral malaria cognitive outcome.
1200 *Neuroscience* 284, 920–933. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.10.062>

1201 De Miranda, A.S., Brant, F., Vieira, L.B., Rocha, N.P., Vieira, Hérica Leandro Marciano,
1202 Rezende, G.H.S., de Oliveira Pimentel, P.M., Moraes, M.F.D., Ribeiro, F.M.,
1203 Ransohoff, R.M., Teixeira, M.M., Machado, F.S., Rachid, M.A., Teixeira, A.L.,
1204 2016. A Neuroprotective Effect of the Glutamate Receptor Antagonist MK801 on
1205 Long-Term Cognitive and Behavioral Outcomes Secondary to Experimental
1206 Cerebral Malaria. *Molecular Neurobiology* 1–20. [https://doi.org/10.1007/s12035-](https://doi.org/10.1007/s12035-016-0226-3)
1207 [016-0226-3](https://doi.org/10.1007/s12035-016-0226-3)

1208 Del Medico Zajac, M.P., Romera, S. a, Ladelfa, M.F., Kotsias, F., Delgado, F., Thiry, J.,
1209 Meurens, F., Keil, G., Thiry, E., Muylkens, B., 2011. In vitro-generated interspecific
1210 recombinants between bovine herpesviruses 1 and 5 show attenuated replication
1211 characteristics and establish latency in the natural host. *BMC veterinary research* 7,
1212 19. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-7-19>

1213 Elias, F., Lucia, A., 2004. Meningoencefalite e encefalomalacia por Herpesvírus bovino
1214 -5 : distribuição das lesões no sistema ner voso central de bovinos naturalmente
1215 infectados. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 24, 123–131.
1216 <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2004000300003>

1217 Ladelfa, M.F., Del Médico Zajac, M.P., Kotsias, F., Delgado, F., Muylkens, B., Thiry, J.,
1218 Thiry, E., Romera, S. a, 2011. Comparative study on the in vitro and in vivo
1219 properties of two bovine herpesvirus-5 reference strains. *Acta veterinaria*
1220 *Scandinavica* 53, 37. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-53-37>

1221 Liu, B., Teschemacher, A.G., Kasparov, S., 2017. Astroglia as a cellular target for
1222 neuroprotection and treatment of neuro-psychiatric disorders. *Glia* 65, 1205–1226.
1223 <https://doi.org/10.1002/glia.23136>

1224 Machado, G.F., Bernardi, F., Hosomi, F.Y.M., Peiró, J.R., Weiblen, R., Roehe, P.M.,
1225 Alessi, A.C., Melo, G.D., Ramos, A.T., Maiorka, P.C., 2013. Bovine herpesvirus-5
1226 infection in a rabbit experimental model: immunohistochemical study of the cellular
1227 response in the CNS. *Microbial pathogenesis* 57, 10–6.
1228 <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2013.01.003>

1229 Marques, R.E., Del Sarto, J.L., Rocha, R.P.F., Gomes, G.F., Cramer, A., Rachid, M.A.,

1230 Souza, D.G., Nogueira, M.L., Teixeira, M.M., 2017. Development of a model of
1231 Saint Louis encephalitis infection and disease in mice. *Journal of*
1232 *Neuroinflammation* 14, 61. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0837-2>

1233 Megid, J., Ferreira Vicente, A., Appolinario, C.M., Allendorf, S.D., de Souza Ribeiro
1234 Mioni, M., Gasparini Baraldi, T., Cortez, A., Bryan Heinemann, M., Reinaldo Silva
1235 Fonseca, C., Cristina Pelícia, V., Devidé Ribeiro, B.L., Hiromi Okuda, L., Pituco,
1236 E.M., 2015. Outbreak Control and Clinical, Pathological, and Epidemiological
1237 Aspects and Molecular Characterization of a Bovine Herpesvirus Type 5 on a
1238 Feedlot Farm in São Paulo State. *BioMed Research International* 2015, 1–5.
1239 <https://doi.org/10.1155/2015/981230>

1240 Mesquita, L.P., Costa, R.C., Fusuma, M.M., Bruhn, F.R.P., Mori, E., Pituco, E.M., Mori,
1241 C.M.C., Weiblen, R., Maiorka, P.C., 2017. Susceptibility of mice to bovine
1242 herpesvirus type 5 infection in the central nervous system. *Veterinary Research*
1243 *Communications* 41, 279–288. <https://doi.org/10.1007/s11259-017-9699-4>

1244 Meyer, G., Bare, O., Thiry, E., 1999. Identification and characterization of bovine
1245 herpesvirus type 5 glycoprotein H gene and gene products 1, 2849–2859.

1246 Mocchetti, I., Bachis, A., 2004. Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB
1247 protects neurons from HIV-1/gp120-induced cell death. *Critical reviews in*
1248 *neurobiology* 16, 51–7. <https://doi.org/10.1615/CritRevNeurobiol.v16.i12.50>

1249 Myint, K.S.A., Kipar, A., Jarman, R.G., Gibbons, R. V., Perng, G.C., Flanagan, B.,
1250 Mongkolsirichaikul, D., Van Gessel, Y., Solomon, T., 2014. Neuropathogenesis of
1251 Japanese Encephalitis in a Primate Model. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8,
1252 e2980. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002980>

1253 Ojha CR, Rodriguez M, Karuppan MKM, Lapierre J, Kashanchi F, El-Hage N. Toll-like
1254 receptor 3 regulates Zika virus infection and associated host inflammatory response
1255 in primary human astrocytes. *PLoS One*. 2019;14(2):e0208543. Published 2019 Feb
1256 8. doi:10.1371/journal.pone.0208543

1257 Peng, H., Sun, L., Jia, B., Lan, X., Zhu, B., Wu, Y., Zheng, J., 2011. HIV-1-infected and
1258 immune-activated macrophages induce astrocytic differentiation of human cortical
1259 neural progenitor cells via the STAT3 pathway. *PLoS ONE* 6.
1260 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019439>

1261 Perez, S.E., Bretschneider, G., Leunda, M.R., Osorio, E. a, Flores, E.F., Odeón, a C.,
1262 2002. Primary infection, latency, and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in
1263 the bovine nervous system. *Veterinary pathology* 39, 437–444.

1264 <https://doi.org/10.1354/vp.39-4-437>

1265 Prajeeth, C.K., Kronisch, J., Khorooshi, R., Knier, B., Toft-Hansen, H., Gudi, V., Floess,
1266 S., Huehn, J., Owens, T., Korn, T., Stangel, M., 2017. Effectors of Th1 and Th17
1267 cells act on astrocytes and augment their neuroinflammatory properties. *Journal of*
1268 *Neuroinflammation* 14, 204. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0978-3>

1269 Rissi, D.R., Pierezan, F., e Silva, M.S., Flores, E.F., de Barros, C.S.L., 2008. Neurological
1270 disease in cattle in southern Brazil associated with Bovine herpesvirus infection.
1271 *Journal of veterinary diagnostic investigation* 20, 346–9.
1272 <https://doi.org/10.1177/104063870802000315>

1273 Suja, M. S., Mahadevan, A., Madhusudana, S. N., & Shankar, S. K. (2011). Role of
1274 apoptosis in rabies viral encephalitis: a comparative study in mice, canine, and
1275 human brain with a review of literature. *Pathology research international*, 2011,
1276 374286. <https://doi.org/10.4061/2011/374286>

1277 Victoria, E.C.G., De Brito Toscano, E.C., De Sousa Cardoso, A.C., Da Silva, D.G., De
1278 Miranda, A.S., Da Silva Barcelos, L., Sugimoto, M.A., Sousa, L.P., De Assis Lima, e,
1279 I.V., De Oliveira, A.C.P., Brant, F., Machado, F.S., Teixeira, M.M., Teixeira, A.L.,
1280 Rachid, M.A., 2017. Knockdown of C-C chemokine receptor 5 (CCR5) is protective
1281 against cerebral ischemia and reperfusion injury. *Current Neurovascular Research*
1282 14. <https://doi.org/10.2174/1567202614666170313113056>

1283 Vilar, M., Mira, H., 2016. Regulation of neurogenesis by neurotrophins during adulthood:
1284 Expected and unexpected roles. *Frontiers in Neuroscience* 10, 1–9.
1285 <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00026>

1286 Vilela, M.C., Lima, G.K., Rodrigues, D.H., Lacerda-Queiroz, N., Pedroso, V.S.P., de
1287 Miranda, A.S., Rachid, M.A., Kroon, E.G., Campos, M.A., Teixeira, M.M.,
1288 Teixeira, A.L., 2016. Platelet Activating Factor (PAF) Receptor Deletion or
1289 Antagonism Attenuates Severe HSV-1 Meningoencephalitis. *Journal of*
1290 *Neuroimmune Pharmacology* 11, 613–621. [https://doi.org/10.1007/s11481-016-](https://doi.org/10.1007/s11481-016-9684-7)
1291 [9684-7](https://doi.org/10.1007/s11481-016-9684-7)

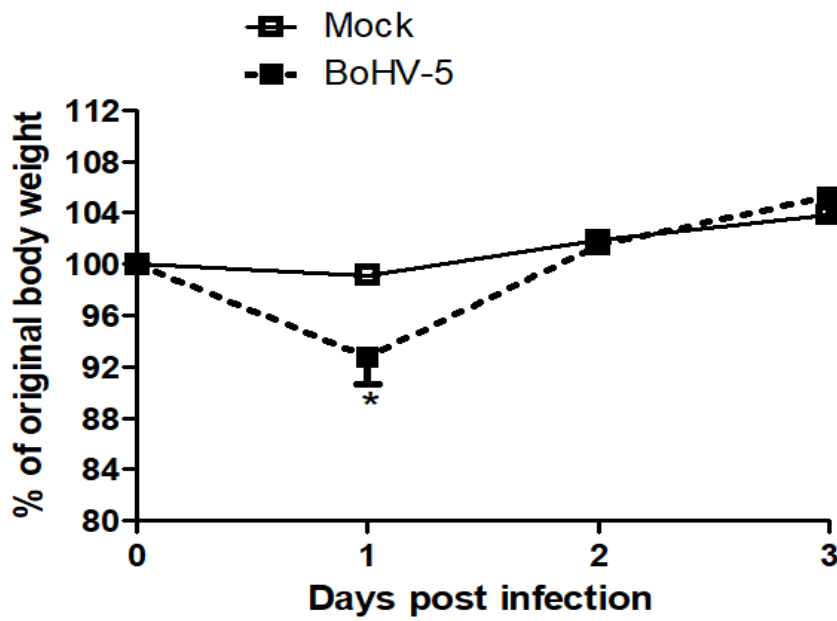
1292 Vogel, F.S.F., Caron, L., Flores, E.F., Weiblen, R., Winkelmann, E.R., Mayer, S.V.,
1293 Bastos, R.G., 2003. Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central
1294 nervous systems of latently, experimentally infected calves. *Journal of clinical*
1295 *microbiology* 41, 4512–20. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.10.4512>

1296 Walsh, J.G., Reinke, S.N., Mamik, M.K., McKenzie, B.A., Maingat, F., Branton, W.G.,
1297 Broadhurst, D.I., Power, C., 2014. Rapid inflammasome activation in microglia

1298 contributes to brain disease in HIV/AIDS. *Retrovirology* 11, 35.
1299 <https://doi.org/10.1186/1742-4690-11-35>
1300 Xu, D., Lian, D., Wu, J., Liu, Y., Zhu, M., Sun, J., He, D., Li, L., 2017. Brain-derived
1301 neurotrophic factor reduces inflammation and hippocampal apoptosis in
1302 experimental *Streptococcus pneumoniae* meningitis. *Journal of Neuroinflammation*
1303 14, 156. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0930-6>
1304
1305

1306 **Figures & Legends:**

1307

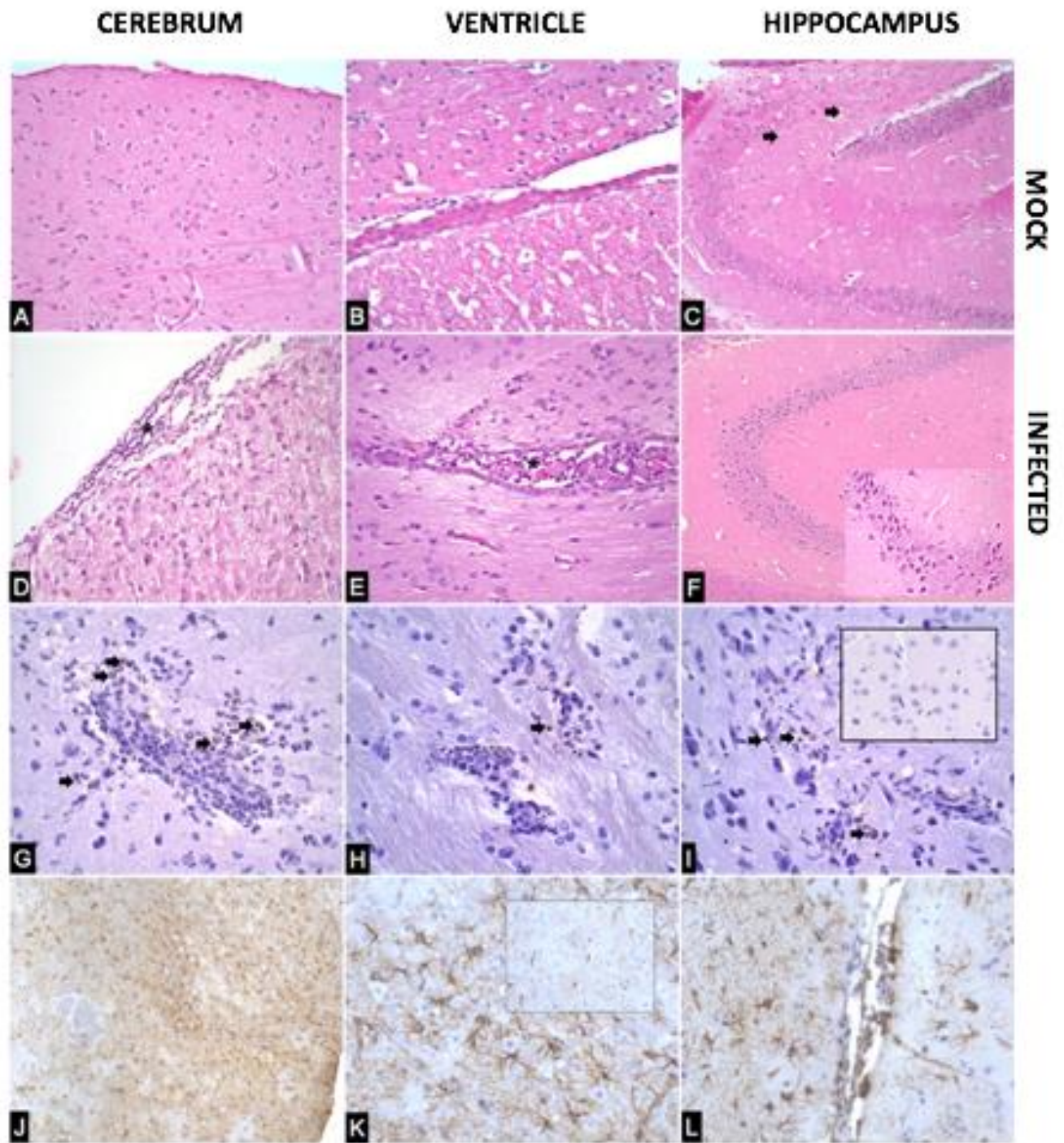


1308

1309

1310 **Fig. 1.** The percentage of initial body weight was not changed in uninfected mice. The
1311 infected mice showed a significant decrease ($p < 0.05$) in the percentage of body
1312 weight on day 01 after infection.

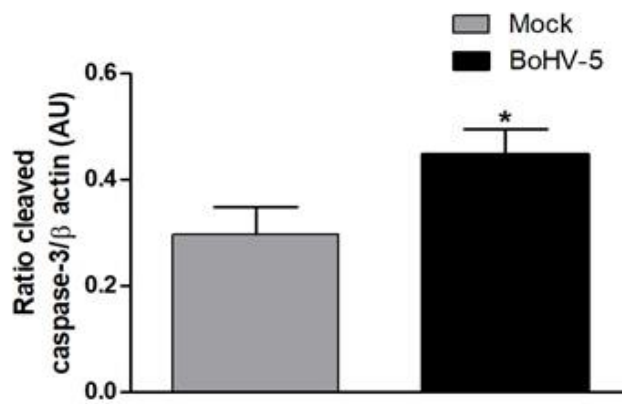
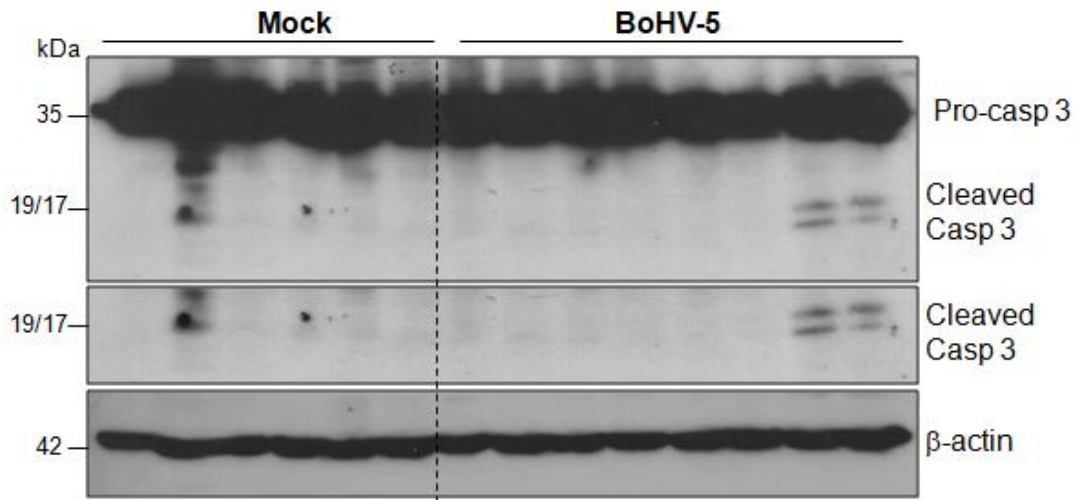
1313



13
1315
1316
1317
1318
1319
1320

1321
1322
1323
1324
1325
1326
1327
1328
1329
1330
1331
1332
1333
1334
1335
1336
1337
1338
1339
1340
1341
1342
1343
1344
1345
1346
1347
1348
1349

Fig. 2. Histopathological brain lesions three days after infection of mock and BoHV-5 infected C57BL/6 mice with inoculated 1×10^7 TCID₅₀, mock animals (n=5) and infected mice (n=7). From mock (A-C) and BoHV-5 infected mice (D-F). Normal histological appearance from cerebrum (A), ventricle (B) and CA region of hippocampus (C). Infected animals showed meningitis (asterisk) (D), ventriculitis (asterisk) (H) Shrinkage, hypereosinophilic neurons (arrows) in CA region of hippocampus, insert highlighting the neuronal changes (F). Haematoxylin & eosin staining x40. Immunohistochemical reaction for cleaved **caspase-3** (G-I) and **GFAP** (J-L) x40 in the brain of mock and BoHV-5 infected mice. Infected animal exhibiting immunopositive glial-inflammatory cells for cleaved caspase-3 around blood vessels (G) and in the neuropil (I). Activated **caspase-3** immunoreactivity was absent in tissue from control mice (insert) (I). Infected animals showing pronounced astrogliosis and increased immunoexpression of **GFAP** at cerebrum, brainstem and cerebellar regions. Mock animals showed some positive **GFAP** astrocytes with small cell bodies (insert) (K).



1350

1351

1352 **Fig. 3.** Densitometric analysis of Western Blot membranes by using ImageJ software are

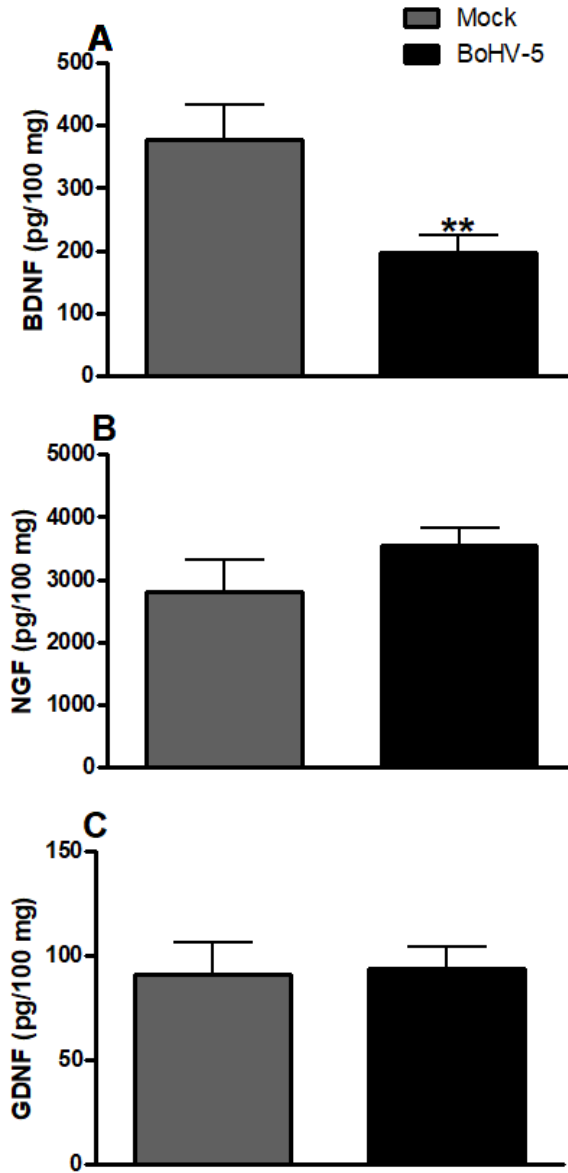
1353 presented as arbitrary units from mock (n=6) and BoHV-5 infected animals (n=8). Results

1354 are expressed as mean \pm SEM. Asterisks indicate statistical difference where $*p < 0.05$.

1355

1356

1357



1358

1359 **Fig. 4. Expression of neurotrophic factors BDNF (A), NGF (B) and GDNF (C) in**
 1360 brain tissues (ELISA), three days after infection of mock and BoHV-5 infected C57BL/6
 1361 mice with inoculated 1×10^7 TCID₅₀. Results are expressed as mean \pm SEM. **p<0.01,
 1362 compared BoHV-5 infected group (n=8) to mock group (n=5).

1363

1364

1365

1366

1367 **7. CAPÍTULO II**

1368 *“Influence of the expression of innate and adaptive immune mediators in*
1369 *meningoencephalitis caused by infection with bovine Herpesvirus type 5 (BoHV-5) in*
1370 *murine model”*

1371 Manuscrito será enviado para o periódico: PLoS One.

1372 **ABSTRACT**

1373 One of the pathogens affecting bovine species is bovine herpesvirus 5 (BoHV-5), which
1374 causes meningoencephalitis, a disease that can occur as outbreaks or isolated cases. It has
1375 a high mortality rate, no specific treatment, and no specific vaccine. The immune response
1376 that is triggered by the host against the presence and replication of BoHV-5 is not fully
1377 understood. One of the lines that have been studied to understand the pathogen-host
1378 relationship is related to the genes that are expressed throughout the process and the
1379 understanding of their pathways and how they interact with the immune response of the
1380 host to this neurotropic viral infection. In this sense, the present study aimed to evaluate
1381 the expression of cytokines and chemokines and possible genes of relevance related to
1382 the innate and adaptive immune process as well as expression of iba-1 protein in the brain
1383 from seven to nine-week-old male C57/BL6 mice infected with 10^7 TCID₅₀ of BoHV-5
1384 by intracranial route. The animals were evaluated clinically and individually from day 0
1385 to day 03 after infection, when they were sacrificed and the brains were collected and
1386 used for analysis. Immunohistochemistry and western blot techniques were used to
1387 express the Iba-1 marker. Infected mice showed microgliosis, with greater intensity of
1388 marking in both techniques, compared to uninfected mice. Frakitalquine expression was
1389 performed using the ELISA technique, there was no statistical difference between
1390 infected and uninfected mice. The levels of brain expression in infected and uninfected
1391 mice were measured by the CBA technique, being IL-12p70, IFN- γ , TNF, IL-6, IL-10
1392 and MCP-1 / CCL2. All infected mice showed a statistically increased level of expression
1393 of IL-12p70, IFN- γ , TNF, IL-6, IL-10 and MCP-1 / CCL2 in relation to uninfected mice.
1394 We analyzed the expression of 84 genes related to innate and adaptive immune responses,
1395 using RT-qPCR. The results demonstrate the involvement of the innate and adaptive
1396 immune response, the expression of some genes was significantly increased in infected
1397 mice compared to uninfected mice.

1398 **Keywords:** BoHV-5, Innate, adaptive, Immune responses, neuropathology, microglia

1399

1400 **INTRODUCTION**

1401 Some neuropathies of the nervous system in cattle may cause mortality, present danger
1402 to human health, as well as cause economic losses (Riet Correa et al., 1998; Salvador et
1403 al., 1998). Among these neuropathies, we describe meningoencephalitis caused by bovine
1404 herpesvirus 5 (BoHV-5), which presents a high mortality rate among young animals
1405 (Roizman et al., 1992). Epidemiological data indicate that outbreaks of
1406 meningoencephalitis caused by BoHV-5 have a high incidence in South American
1407 countries (Riet-Correa et al., 2006; Aquino Neto, 2009). The clinical signs in cattle are
1408 anorexia, weakness, nasal and ocular discharge, fever, bruxism, nystagmus, walking in
1409 circles, incoordination, blindness and convulsions (Elias et al., 2004; Rissi et al., 2008).
1410 BoHV-5 meningoencephalitis does not present a specific treatment, appropriate
1411 management procedures and prevention programs may contribute to minimize the onset
1412 of disease cases (Rissi et al., 2007). Infectious diseases, in general, involve complex
1413 interactions between pathogens and the host. The pathogens require different and
1414 specialized immune responses, depending on where they replicate, remain and their size.
1415 The host system works to efficiently eliminate the infectious agent (Abbas et al., 2012).
1416 Therefore, chemokines and cytokines play an important role in the pathogenesis of
1417 neuroinflammatory diseases; they can work as triggers recruiting inflammatory cells for
1418 the nervous system, and can be expressed by resident cells, such as neurons, microglia
1419 and astrocytes (Assensio, et al., 1999). The present work aimed to evaluate the innate and
1420 adaptative immune mediators involved in BoHV-5 infection.

1421

1422 **MATERIAL AND METHODS**

1423 **Animals**

1424 The project was submitted to and approved by the Ethics Committee for the Use of
1425 Animals (CEUA) of the Federal University of Minas Gerais (UFMG), under protocol
1426 number 272/11. Seven to nine-week-old male C57BL/6 mice obtained from Central
1427 Bioterium (UFMG) were used in our experiment.

1428

1429 **Study design**

1430 The mice were randomly divided into two groups, uninfected (mock) and infected with
1431 BoHV-5. After individual clinical evaluation of the mice, both groups were anesthetized
1432 intraperitoneally with a mixture of ketamine 100 mg/kg (10% Syntec) and xylazine 10
1433 mg/kg (2% Syntec), according to individual body weight. Then, they were inoculated

1434 intracranially to the right side of the sagittal suture in the direction of the eye. The infected
1435 group (n=15) received a 1×10^7 TCID₅₀ of BoHV-5 virus suspended at 10 μ L from PBS
1436 and the mock group (n=5) received 10 μ L from sterile PBS by the same route. The Mutum
1437 viral sample (GenBank AY916517) was used in this study (Aquino Neto et al., 2009). At
1438 the third dpi after being evaluated and weighed, the mice were euthanized with an
1439 overdose of 100 mg/kg (10% Syntec) and xylazine 10 mg/kg (2% Syntec),
1440 intraperitoneally, the brains were removed and stored for the appropriate analyzes
1441 described below.

1442

1443 **Immunohistochemistry for iba-1**

1444 Samples from the right cerebral hemispheres after fixation with buffered formalin were
1445 used for the immunohistochemical technique. Sections of 2 mm thick were made in the
1446 fixed right hemisphere, using a slicer matrix for mouse brains (Insight LTDA, Ribeirão
1447 Preto, São Paulo, SP, Brazil) and marked with antibody for Iba-1 monoclonal. Dewaxing
1448 and dehydration of the sections were performed; they were washed 1x in PBS solution.
1449 A solution of sodium citrate buffer (pH 6.0) was used in the antigenic recovery in
1450 microwaves for ten minutes. To block endogenous peroxidase activity, the sections were
1451 incubated for 30 minutes at room temperature with H₂O₂ and PBS solution (10%) for 30
1452 minutes. Subsequently, the protein blockade was performed with powdered milk
1453 skimmed to 6% (p/v) and Tween-20 to 0.1%. Tissues were incubated for 18 hours
1454 (overnight) in a 4° C humid chamber with iba-1 (Abcam, ab178846, USA) at a 1:2000
1455 dilution at 1% BSA. For amplification of the reactions, the sections were washed and
1456 incubated at room temperature in secondary antibody and biotin streptavidin complex
1457 (Universal LSABTM+ kit/HRP, Dako, California, USA). The reaction was revealed with
1458 diaminobenzidine-peroxidase solution (Liquid DAB Substrate Chromogen System®,
1459 Dako, California, USA) for one minute. All washes were performed in PBS. The sections
1460 were counter-corrected with Mayer hematoxylin for 30 seconds and mounted with
1461 Entellan (Merck, São Paulo) and examined microscopically.

1462

1463 **Western blot analysis**

1464 The Western blotting technique was performed with fragments of cerebral hemispheres
1465 contralateral to the inoculation of infected and control mice were weighed and
1466 individually macerated in a tissue homogenizer using a lysis buffer (Triton X-100 to
1467 0),5%, 100 mM Tris/HCl at pH 8.0, 20% glycerol, 0.5M EDTA at 0.2 mM, NaCl 200

1468 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, NaF 25 mM, 2.5 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml aprotinin and
1469 5 µg /ml sodium orthogandate). Centrifugation performed at 10,000 rpms for 15 min at
1470 4°C and quantified using Bio-Rad's Bradford assay reagent (Hercules, CA). The protein
1471 extracts (60 µg) were separated by electrophoresis in a 12% denaturant polyacrylamide-
1472 SDS gel and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked
1473 overnight at 4°C with PBS containing 5% (w/v) of skimmed milk powder and 0.1% of
1474 Tween-20, washed three times with PBS containing 0.1% of Tween-20. The membranes
1475 were incubated with primary iba1 antibodies (Abcam, ab178846, USA) using a 1:1000
1476 dilution in phosphate buffered saline solution containing 5% (w/v) of BSA and 0.1% of
1477 Tween-20 and β-actin (Sigma, 1:10000). After washing, the membrane was incubated
1478 with secondary antibody conjugated with Horseradish peroxidase (1:3000). The
1479 Immunoreactive bands were visualized using an ECL detection system as described by
1480 the manufacturer (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). The iba-1 levels were
1481 quantified by means of an ImageJ densitometric analysis software (Processing and Image
1482 Analysis in Java - NIH, Bethesda, MD, USA), and the values were normalized to the
1483 values of β-actin in the same sample. Changes in protein levels were estimated, and the
1484 results were expressed as an Iba-1 ratio, measured in arbitrary units.

1485

1486 **ELISA for fractalkine expression**

1487 Samples from the contralateral hemisphere from both groups were weighed and
1488 macerated individually using a lysis buffer, with the aid of a sonicator. After maceration,
1489 the samples were homogenized in an extraction solution (100 mg of tissue per milliliter)
1490 containing 0.4 M NaCl, 0.4 M NaCl, 0.05% Tween 20, 0.5% BSA, 0.1 mM phenyl
1491 methylsulfonyl fluoride, 0.1 mM benzothionium chloride, 10 mM EDTA and 20 KIU
1492 aprotinin using Ultra-Turrax. The lysates were centrifuged at 14,000 rpm for 20 min at
1493 4° C, supernatants were collected and stored at -70° C until use. The concentration of
1494 fractalkine CX3CL1 was determined by ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN)
1495 according to the manufacturer's instructions. Data were expressed in picograms per 100
1496 mg of tissue.

1497 **CBA**

1498 The samples stored at a temperature of - 80° C were used for the CBA (Cytometric Bead
1499 Array) technique. The brain tissue fragments were homogenized in a PBS buffer
1500 extraction solution containing a protease inhibitor cocktail. The lysates were centrifuged
1501 at 13,000 rpm for 10 min at 4°C and stored at -70°C until use. IL-12p70, IL-6, CCL2,

1502 TNF and IL-10 were quantified using the Bio-Rad Bradford Assay Reagent (Hercules,
1503 CA). Brain cytokine level analyses were determined using the BD mouse inflammation
1504 kit TM CBA (CBA; BD Biosciences, San Diego, CA) and analyzed by FACSCalibur
1505 (Becton Dickinson, San Jose, CA). Amounts of protein in BAC lysates were quantified
1506 using the Bio-Rad Bradford Assay Reagent (Hercules, CA).

1507

1508 **RT-qPCR for BoHV-5**

1509 Brain fragments were used and the total RNA of these samples was isolated according to
1510 the manufacturer's specifications. The qPCR technique was performed using the kit
1511 Mouse Innate & Adaptive Immune Responses RT² Profiler PCR Array (QIAGEN), the
1512 plate contained expression profiles for 84 genes involved in the host response to bacterial
1513 infection and sepsis, five housekeeping genes, namely: Actb, B2m, Gapdh, Gusb and
1514 Hsp90ab1 and the controls for RT and PCR reactions. The total RNA was transcribed in
1515 reverse, the resulting cDNA was diluted in nuclease free water and RT² SYBR Green
1516 qPCR Mastermixes (Qiagen) was added, which was subsequently aliquoted to each well
1517 of the PCR matrix for quantitative PCR. Thermal cycles and fluorescence detection were
1518 performed using an online web analysis from Biorad iQTM5 (BioRad Laboratories, Hemel
1519 Hempstead, United Kingdom). Cycle conditions were: 10 min denaturation at 95° C,
1520 followed by 40 cycles of 15 seconds at 95° C and 1 minute at 60° C. Six mock samples
1521 and six infected samples were used on individual plates and data were analyzed using the
1522 RT² Profiler PCR Array Data Analysis. The fold change was calculated by determining
1523 the relationship between the mRNA levels and the control using the Δ Ct method function
1524 $(2^{-\Delta Ct})$.

1525

1526 **RT-qPCR for expression of innate and adaptive immune response genes**

1527 In order to verify the expression of 84 genes related to the innate and adaptive immune
1528 responses, we performed RT-qPCR using a Mouse Innate and Adaptive Immune
1529 Responses RT² Profiler PCR Array (QIAGEN). Total cerebrum RNA was isolated using
1530 NucleoSpin RNA kit (Macherey-Nagel) according to manufacturer's instructions. Total
1531 RNA was subsequently treated with DNase I (Thermo Fisher Scientific), according to the
1532 manufacturer's protocol. 1 μ g of total RNA was then reverse transcribed using the High
1533 Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems/Thermo Fisher
1534 Scientific) and the cDNA quality was assessed by conventional PCR, using 0.5 μ M mouse
1535 beta-actin primers (forward: 5' CAGAGCAAGAGAGGTATCC 3', and reverse: 5'

1536 TCATTGTAGAAGGTGTGGTGC 3'), 0.2 mM dNTP mix, Taq DNA polymerase
1537 (Phoneutria), and 20 ng of cDNA. Subsequently, 1 µg of cDNA of each sample was
1538 loaded onto RT² Profiler PCR Array (QIAGEN), according to manufacturer's
1539 instructions. RT-qPCR analyses were performed using the ABI 7500 Real-Time PCR
1540 System (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific) and the conditions used were
1541 hold for 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C.
1542 QIAGEN's online web analysis tool was utilized to produce comparative heat maps and
1543 fold change was calculated by determining the ratio of infected group normalized mRNA
1544 levels to control group normalized values, using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. All data were
1545 normalized to an average arithmetic of four housekeeping genes beta-actin (*actb*),
1546 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*), beta-glucuronidase (*gusb*) and heat
1547 shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1 (*hsp90ab1*). The p values are
1548 calculated based on a Student's t-test of the replicate $2^{-\Delta Ct}$ values for each gene in the
1549 mock group and infected groups.

1550

1551 **Statistical analysis**

1552 The Kolmorov-Smirnov normality test was used in our data to evaluate the type of
1553 distribution. In relation to the normally distributed variables, the differences were
1554 compared using the Student's t-test. The software GraphPad Prism 5 (La Jolla, San Diego,
1555 CA, USA) was used in all analyses and its values expressed as mean and standard error
1556 of mean (SEM). The values of $p < 0.05$ were assumed for all statistical significance.

1557

1558 **RESULTS**

1559 **Immunohistochemical and Western blot analysis for Iba-1**

1560 Immunopositive cells for Iba-1 were visualized in the frontal cortex and hippocampus
1561 from mock and infected groups. BoHV-5-infected mice showed areas of microgliosis,
1562 with increased intensity of iba-1 immunomarcation, when compared with the mock mice.
1563 In the western blot technique, the same result was observed in the intensity of iba-1
1564 expression in the infected group. In BoHV-5 infected mice, densitometry measures
1565 revealed higher expression of Iba-1 ($p < 0.0001$) in comparison to non-infected mice (**Fig.**
1566 **1**).

1567

1568 **Expression of brain fractalkine CX3CL1)**

1569 Similar brain levels of fractalkine (CX3CL1) were observed in non-infected and BoHV-

1570 5 infected mice (**Fig. 2**).

1571

1572 **BoHV-5 infection promoted increased brain levels of inflammatory cytokines and**
1573 **chemokine**

1574 To evaluate the role of BoHV-5 in the brain expression of inflammatory mediators, we
1575 measured the cytokines IL-12p70, IFN- γ , TNF, IL-6, IL-10 and the chemokine CCL2.
1576 BoHV-5 infection induced an increase in the levels of all them three days after infection
1577 (**Fig. 3**).

1578

1579 **Expression of innate and adaptive immune response genes during BoHV-5 infection**

1580 BoHV-5 infection promoted higher expression of twenty-three genes. Nine innate
1581 immunity genes (C3, CASP1, CD40LG, CD8A, H2-Q10, IRF7, LYZ2, MX1, STAT 1)
1582 and five innate immunity cytokines (CCL5, CXCL10, IL-1beta, IL-2 and TNF) were
1583 more expression in BoHV-5 infected animals, compared with non-infected mice.
1584 Moreover, BoHV-5 infection showed higher expression of three pattern recognition
1585 receptors (TLR1, TLR2 and TLR8) and five related to adaptive immunity (CCR4,
1586 CXCR3, GATA 3, IL-10 and TBS21) (**Fig. 4**).

1587

1588 **DISCUSSION**

1589 After three days of BoHV-5 infection, of the 84 genes involved, in the C57 brain, twenty-
1590 three genes were significantly more expressed, and they are associated with
1591 inflammation, of these, five are related to the adaptive immune response, six are related
1592 to innate immunity cytokines, nine are related to innate immunity genes and three are
1593 related to standard recognition receptors (TLR1, TLR2 and TLR8). Rensetti and
1594 contributors (2018) suggest that in BoHV-5 infection, the cytokine response may play a
1595 predominant role in neuropathology and virus growth in neural tissue. And that the
1596 stimulation of TLRs may play an additional role in the neuropathogenesis of BoHV-5.
1597 The results demonstrate the involvement of both innate and adaptive immune response,
1598 for which the expression was significantly increased in infected mice compared to mock
1599 mice. In the literature, analyses of Zika virus infection, flow cytometry and RT-qPCR
1600 showed that the infection induced high levels of pro-inflammatory immune mediators,
1601 such as IL-6, TNF- α , IL-1 β and MCP-1 (Lum et al., 2017). The increased expression of
1602 Iba-1 in BoHV-5-infected mice demonstrates the importance of investigating the actions
1603 of glia cells against BoHV-5 infection. Since the importance of the microglia is known

1604 and it has several actions, regulating inflammation, stimulating repair, being a
1605 neuroprotector, but can also trigger neurotoxic pathways that can lead to progressive
1606 neurodegeneration (Correale, 2014). Studies carried out with infection with dengue virus
1607 in vitro and in vivo, showed that the infection levels of various cytokines and chemokines,
1608 such as IL-12, IFN- γ , MCP-1 and MCP-5 and within the same studies, the authors
1609 observed increased expression of microglies in infected animals (Tsai et al., 2016). The
1610 presented results showed that BoHV-5 infection promoted microglial activation
1611 associated with up-regulation of innate and adaptive immune genes and inflammatory
1612 mediators in mice.

1613

1614 **Declaration of Conflicting Interests**

1615 The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research,
1616 authorship, and/or publication of this article.

1617

1618

1619

1620

1621

1622

1623

1624

1625

1626

1627

1628

1629

1630

1631

1632

1633

1634

1635

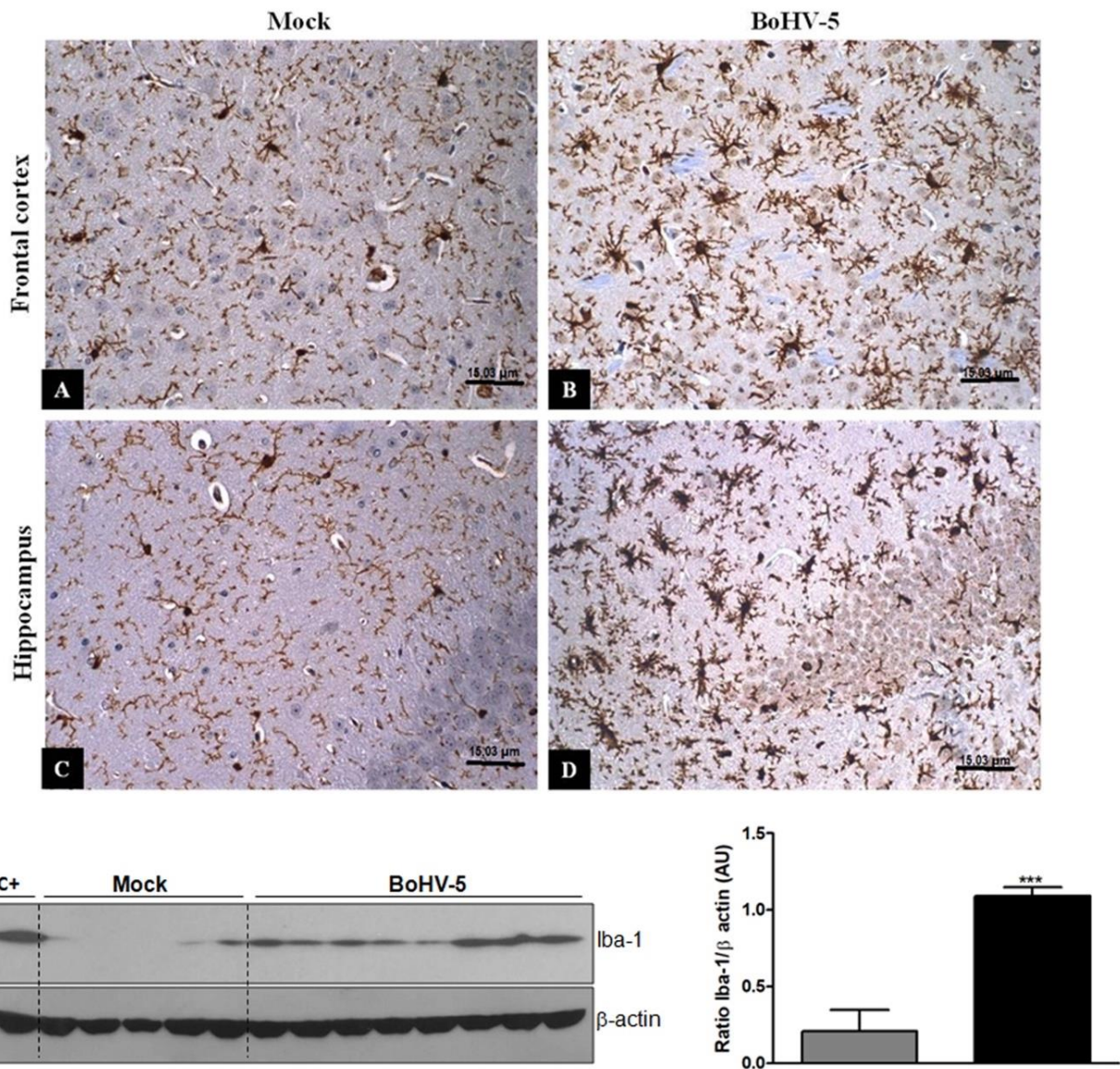
1636

1637

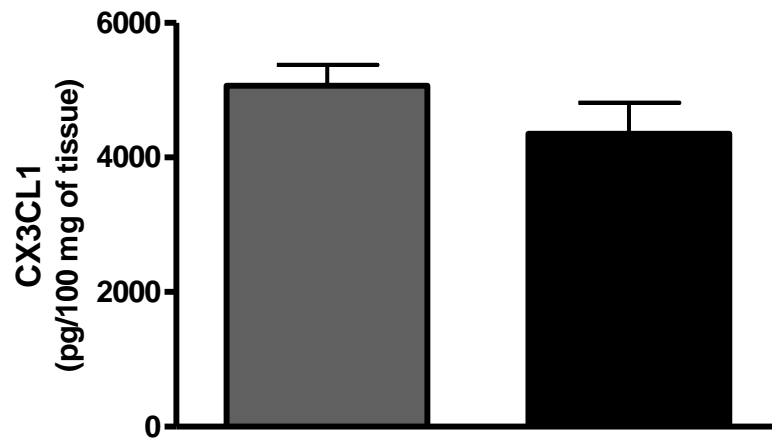
1638 **REFERENCES**

- 1639 ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**.In:Cap.02:
1640 Célula e tecidos do sistema imune. In: Appendices II: Citocinas. Elsevier.7ª edição. 2012.
1641
- 1642 AQUINO NETO, H. M. **Meningoencefalite por Herpesvirus bovino 5 em Minas Gerais:
1643 relato de caso clínico**. Arq. Bras. Med. Vet. v.61, n.1, p 1-5. 2009.
1644
- 1645 ASSENSIO, V. C.; CAMPBELL, I. L. **Chemokines in the CNS: plurifunctional mediators in
1646 diverse states**. Trends in Neuroscienses. V.22, n.11, p504-512, 1999.
1647
- 1648 CORREALE, J. **The role of microglial activation in disease progression**. Multiple Sclerosis
1649 Journal 2014, Vol. 20(10) 1288–1295 DOI: 10.1177/ 1352458514533230.
1650
- 1651 DOMINGUES, R. B. et al. **Neurotrophic factors in tension-type headache**. Arq
1652 Neuropsiquiatr. 73(5):420-424. 2015.
- 1653 ELIAS, F.; SCHILD, A. L.; RIET-CORREA, F. **Meningoencefalite e encefalomalacia por
1654 Herpesvírus bovino-5: distribuição das lesões no sistema nervoso central de bovinos
1655 naturalmente infectados**. Pesquisa Veterinária Brasileira. V. 20, n. 3, p. 123-131, 2004.
- 1656 GOMES, F. C. A.; TORTELLI, V. P.; DINIZ, L. **Glia: dos velhos conceitos às novas funções
1657 de hoje e as que ainda virão**. Estud. av.v.27, n.77. São Paulo, 2013.
- 1658 GOMES, L. I. et al. **Deteção de herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) em bovinos do sudeste
1659 brasileiro**. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 54:217-220. 2002.
- 1660 LAI, K. O. et al. **Cloning and expression of a novel neurotrophin, NT-7, from carp**. Mol Cell
1661 Neurosci.11: 64-76.1998.
- 1662 LUM, F.M. et al. **Zika Virus Infects Human Fetal Brain Microglia and Induces
1663 Inflammation**. Clin Infect Dis. 2017. doi: 10.1093/cid/ciw878.
- 1664 RENSETTI, D.E. et al. **Bovine herpesvirus type 5 replication and induction of apoptosis in
1665 vitro and in the trigeminal ganglion of experimentally-infected cattle**. Comparative
1666 Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, pages 8-14, 2018.
- 1667 RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; FERNANDES, C. G. **Enfermidades do sistema nervoso
1668 dos ruminantes no sul do Rio Grande do Sul**. Ciência Rural. v. 28, p.341-348, 1998.

- 1669 RIET-CORREA, G. et al. **Meningoencefalite e polioencefalomalacia causadas por**
1670 **Herpesvírus bovino-5 no Estado do Pará.** Pesquisa Veterinária Brasileira. v. 26, n. 1, p. 44-46,
1671 2006.
- 1672 RISSI, D. R. et al. **Epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões encefálicas em**
1673 **bovinos afetados por meningoencefalite por Herpesvírus bovino 5 (BoHV-5).** Pesq. Vet.
1674 Bras. v.26, n.2, Rio de Janeiro. Jun/2006.
- 1675 RISSI, D. R. et al. **Meningoencefalite por herpesvírus bovino tipo 5.** Pesquisa Veterinária
1676 **Brasileira.** v. 27, n. 7, p. 251 - 260, 2007.
- 1677 RISSI, D. R. et al. **Neurological disease in cattle in southern Brazil associated with Bovine**
1678 **herpesvirus infection.** J. Vet. Diagn. Invest. 20:346-349. 2008.
- 1679 ROIZMAN, B. et al. **The family Herpesviridae: an update.** Arch Virol. 123:425–449, 1992.
- 1680 SALVADOR, S. C. et al. **Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino-5**
1681 **no Mato Grosso do Sul e São Paulo, Brasil.** Pesquisa Veterinária Brasileira. v. 18, n. 2, p. 75-
1682 82, 1998.
- 1683 SEBBEN, A. D. et al. **Efeito de fatores neurotróficos sobre o reparo de nervo periférico.**
1684 Scientia Medica. v. 21, n.2, p. 81-89. 2011.
- 1685
- 1686 SUJA, M. S., et al. **Role of Apoptosis in Rabies Viral Encephalitis:**
1687 **A Comparative Study in Mice, Canine, and Human Brain with a Review of Literature.**
1688 Patholog Res Int. 2011 Aug 25.
- 1689
- 1690 TSAI, T.T. et al. **Micróglia retard dengue vírus- induced acute viral encephalitis.** Sci
1691 Rep. 2016. doi: 10.1038/srep27670.
- 1692 YAN, Q. et al. **Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat**
1693 **central nervous system.** Neuroscience.v.78, n.1.Mai /1997.
- 1694
- 1695



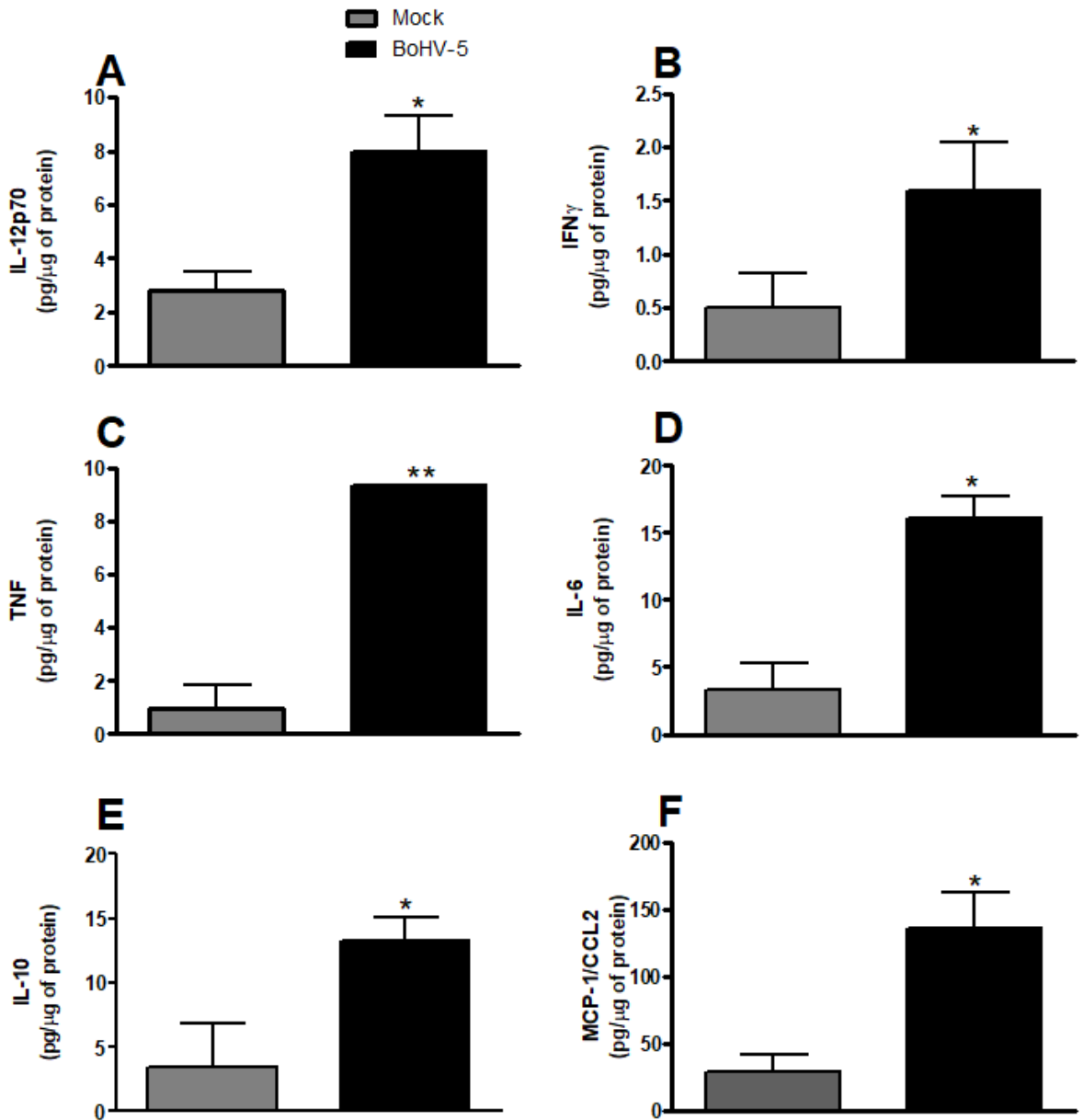
1698 **Fig 1:** Photomicrograph of the cerebral cortex (A-B) and hippocampus (C-D) from mock
 1699 (A, C) and BoHV-5 infected (B, D) animals, with more intense immunomarcation for
 1700 Iba-1, microglia with ameboid morphology. Western blot showed higher expression of
 1701 Iba-1 in BoHV-5 infected animals, compared with non-infected mice (***) $p < 0.0001$). The
 1702 densitometry data are presented graphically, using the positive control THP-1. For load
 1703 control, the membranes were reprocessed with anti-β-actin.
 1704



1705

1706 **Fig 2:** The figure shows the expression of CX3CL1 from mock and BoHv-5 infected
1707 animals. Similar brain levels of fractalkine were observed in both groups ($p=0.40$). The
1708 results are expressed as mean \pm SEM.

1709



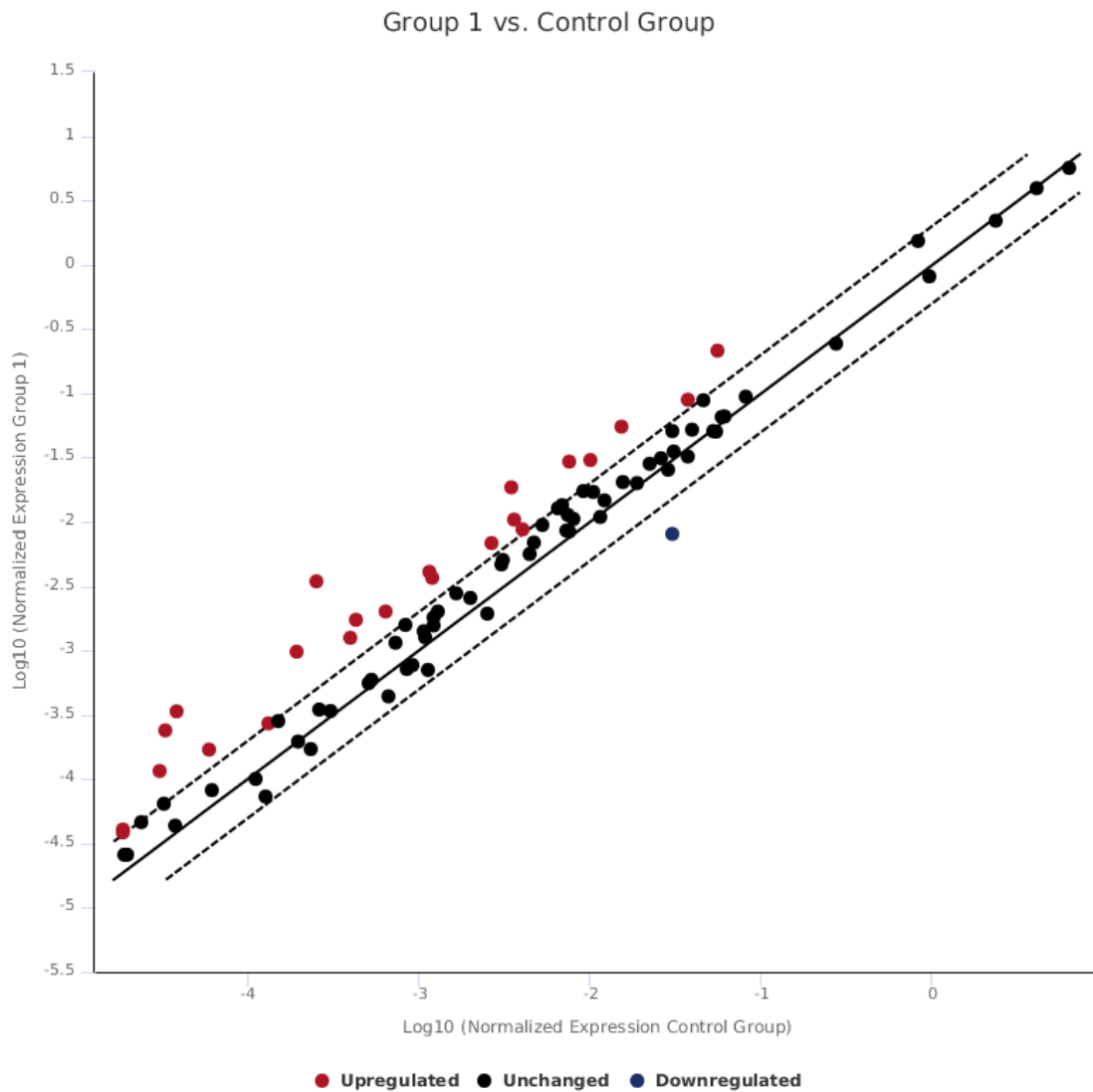
1710

1711 **Fig 3:** Brain expressions of IL-12p70 (A), IFN- γ (B), TNF (C), IL-6 (D), IL-10 (E) and
 1712 CCL2 (F) by CBA from mock and BoHV-5 infected mice three days after infection.
 1713 BoHV-5 infected animals showed higher brain levels of inflammatory mediators. The
 1714 results are expressed as mean \pm SEM. * p <0.05; ** p <0.005.

1715

1716

1717



1718
 1719
 1720
 1721
 1722
 1723
 1724
 1725
 1726
 1727
 1728
 1729
 1730

Fig 4: The scatterplot shows the genetic hyperexpression generated from RT-qPCR of the brains of mock mice infected with BoHV-5, three days after infection. The black line shows the expression at the normal level and the dashed black lines indicate the threshold of twice the gene expression allowed by the algorithm. The red dots are up-regulated genes, presenting 23 genes. The p values are calculated based on the Student's t test of the replicated values of $2^{-\Delta CT}$ for each gene in the mock group and in the infected group.

1731

| GENE SYMBOL | AVG ΔC_t | | FOLD CHANGE INFECTED/MOCK | P-VALUE |
|-------------|------------------|-------|------------------------------|-----------|
| | INFECTED | MOCK | | |
| C3 | 5.09 | 7.04 | 3,89 | 0.143841 |
| CASP1 | 6.83 | 7.93 | 2,13 | 0.146188 |
| CCL5 | 5.75 | 8.15 | 5,29 | 0,169895 |
| CCR4 | 12.53 | 14.04 | 2,85 | 0,1794472 |
| CD40LG | 14.59 | 15.70 | 2,17 | 0,120682 |
| CD8A | 8.96 | 9.58 | 3,13 | 0206747 |
| CXCL10 | 5.05 | 6.62 | 2,98 | 0,169736 |
| Cxcr3 | 10.00 | 12.34 | 5,08 | 0,191200 |
| Gata3 | 8.18 | 11.95 | 13,63 | 0,165108 |
| H2-Q10 | 11.85 | 12.87 | 2,03 | 0,035862 |
| IFNG | 12.03 | 14.87 | 7,17 | 0,006293 |
| IL10 | 11.54 | 14.66 | 8,75 | 0,262007 |
| IL1B | 7.93 | 9.76 | 3,54 | 0,165212 |
| IL2 | 14.66 | 15.70 | 2,05 | 0,086656 |
| IRF7 | 4.18 | 6.03 | 3,59 | 0,171394 |
| LY22 | 2.22 | 4.15 | 3,82 | 0,153263 |
| MX1 | 7.19 | 8.53 | 2,53 | 0,1447223 |
| STAT1 | 3.49 | 4.74 | 2,38 | 0,123829 |
| TBX21 | 13.07 | 14.99 | 3,77 | 0,114468 |
| TLR1 | 8.09 | 9.70 | 3,06 | 0,217556 |
| TLR2 | 6.58 | 8.11 | 2,88 | 0,169730 |
| TLR8 | 9.17 | 11.17 | 3,99 | 0,167406 |
| TNF | 8.96 | 10.60 | 3,12 | 0,330374 |

1732

1733

1734

1735

1736

1737

1738

1739

Fig 5: Table showing the distribution of 23 genes up-regulated among the 84 analyzed genes related to innate and adaptive immunity, investigated in the brain of mice infected with BoHV-5 and mock mice (p <0.05).

1740 **8. CAPÍTULO III:**

1741 *“Bovine herpesvirus type 5 infection (BoHV-5) and its implications in deficient*
1742 *mice”*

1743 Manuscrito será enviado para o periódico: Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.

1744 Daniele Gonçalves da Silva^{1*}, Iracema Luisa Quintino de Carvalho^{2*}, Eliana Cristina de
1745 Brito Toscano¹; Beatriz Senra Santos³, Marco Antônio Campos³, Quezya Mendes
1746 Camargos¹, Bruna da Silva Oliveira⁴, Gabriela Ferreira de Sousa¹, Marcelo Vidigal
1747 Caliaro¹, Antônio Lúcio Teixeira⁵, Aline Silva de Miranda⁴, Edel Figueiredo Barbosa
1748 Stancioli², Milene Alvarenga Rachid^{1#}

1749 *contributed equally

1750

1751 ¹Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de
1752 Minas Gerais, MG, Brasil.

1753 ²Laboratório de Virologia Básica e Aplicada do Departamentos de Microbiologia, Instituto de
1754 Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, MG, Brasil.

1755 ³Instituto René Rachou, Fiocruz Minas, Belo Horizonte. Brasil.

1756 ⁴Laboratório de Neurobiologia do Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas,
1757 Universidade Federal de Minas Gerais, MG, Brasil.

1758 ⁵Translational Psychiatry Program, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences⁶, School
1759 of Medicine, University of Texas Health Science Center at Houston, TX, USA.

1760

1761 **Corresponding author:**

1762 [#]Milene Alvarenga Rachid

1763 Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Patologia
1764 Celular e Molecular, Campus Pampulha, Av. Antônio Carlos 6.627 - Belo Horizonte, Minas
1765 Gerais, Brasil. 31270-901

1766 Tel/Fax: 55-31-34092878

1767 e-mail: milenerachid@gmail.com

1768

1769

1770

1771

1772

1773

1774 **ABSTRACT**

1775 Toll like receptors play a critical role in and viral innate immune response, leading to
1776 neuroinflammation. Specifically, TLR 3, 7, 8 and 9 have been related to the response to
1777 bovine herpesviruses infections in vitro and in vivo. The present study aimed to evaluate
1778 the effects of TLR3/7/9 deficiency during acute infection by Bovine herpesvirus 5
1779 (BoHV-5) in mice. C57BL/6 wild-type mice (WT) and TLR3/7/9 deficient mice
1780 (TLR3/7/9^{-/-}) were infected by intracranial inoculation of 1×10⁴ TCID₅₀ inoculum of
1781 purified BoHV-5. Mock animals received phosphate-buffered saline (PBS). Wild type
1782 and TLR3/7/9^{-/-} infected groups exhibited weight loss, serous ocular discharge, ruffled
1783 fur and apathy in a similar frequency. Moreover, infected WT and TLR3/7/9^{-/-} animals
1784 presented neuropathological changes characterized by the presence of meningitis,
1785 reactive blood vessels, and occasional vacuolization of neuropil. All infected animals also
1786 showed microgliosis throughout the neuropil from frontal cortex, hippocampus,
1787 brainstem and cerebellum. Higher expression of iba-1 was observed in both wild type and
1788 TLR3/7/9^{-/-} infected animals, compared with non-infected groups. Taken together, our
1789 study suggests that BoHV-5 infection induced clinicopathological changes associated
1790 with low brain levels of BDNF, there was a decrease in BDNF in groups of mock mice
1791 compared to groups of infected mice. The combined TLR3/7/9 does not alter these
1792 parameters, there was no statistical difference in BDNF levels between wild type and
1793 TLR3/7/9^{-/-} infected animals, suggesting that other pathways should be studied during
1794 acute infection.

1795
1796 **Keywords:** bovine herpesvirus 5, neuropathology; neurotrophic factors; mice.

1808 **Introduction**

1809 Meningoencephalitis caused by bovine alpha-herpesvirus 5 (BoHV5) infection is a
1810 frequent neurological disease of young cattle, being most frequently reported in southern
1811 Brazil and Argentina (Ladelfa et al., 2011; Perez et al., 2002; Rissi et al., 2008). The
1812 affected animals can present serous nasal and ocular discharges, anorexia with
1813 progression to depression, ataxia, circling, convulsions, and death (Del Médico Zajac et
1814 al., 2010; Perez et al., 2002). The most common histopathological lesions are meningitis,
1815 perivascular cuffing, gliosis, haemorrhages and neuronal loss (Meyer et al., 1999; Perez
1816 et al., 2002). The involvement of immune response in the development of neurological
1817 and neuropathological changes after infection with bovine alpha-herpesvirus has been
1818 broadly discussed (Abril et al., 2004; Del Médico Zajac et al., 2010). We previously
1819 demonstrated the participation of SOCS-2 in modulating the immune response to BoHV-
1820 5 infection in mice. BoHV-5 infection in SOCS-2 deficient mice lead to enhancement of
1821 neuropathology and brain inflammatory parameters associated with reduction in the
1822 expression of IFN α and IFN β and widespread viral distribution (Barbosa et al., 2016).
1823 One important anti-viral innate immune response is mediated by Toll-like receptors
1824 (TLRs) by inducing the secretion of type I interferons, and pro-inflammatory cytokines
1825 (Chattopadhyay et al., 2018; Zolini et al., 2014). The presence of pathogens increases the
1826 expression of TLRs on microglia and astrocytes and consequently activates the
1827 neuroinflammation in several neurologic diseases (Carroll et al., 2018; Kumar, 2019;
1828 Madhu et al., 2016). Specifically, TLR3, 7, 8 and 9 have been related to bovine
1829 herpesviruses infections response in vitro and in vivo (Marin et al., 2014b; Rensetti et al.,
1830 2016). The agonist stimulation of TLR 7/8 expressed by peripheral blood leukocytes
1831 promoted anti-viral activity on BoHV-5 infected MDBK cells (Marin et al., 2014a).
1832 Moreover, a significant up-regulation of TLR3, TLR7 and TLR8 mRNA levels were
1833 detected in different brain regions after acute BoHV-5 infection of cattle (Rensetti et al.,
1834 2016). Neurotrophic factors stimulate survival of brain cells, being brain-derived
1835 neurotrophic factor (BDNF) relevant to prevent neuronal death and to modulate the
1836 neurogenesis (Choi et al., 2019; Tejada et al., 2019). Interesting, the reduction in BDNF
1837 levels have been correlated with the pathology severity in different brain disorders
1838 (Bharani et al., 2019; Mocchetti and Bachis, 2004; Xu et al., 2017). To our knowledge,
1839 this is the first investigation about the effects of combined TLRs3/7/9 deficiency on the
1840 clinicopathological and neurochemical findings upon BoHV-5 infection in mice.

1841

1842 **Material and Methods**

1843 **Experimental design**

1844 BoHV-5 Mutum sample (GenBank AY916517) was isolated from central nervous system
1845 of an adult cow presenting neurological symptoms (Aquino Neto et al., 2009). The strain
1846 was maintained with minimal essential medium (Sigma, USA), containing 5% fetal
1847 bovine serum (FBS) inactive and free for Mycoplasma and Bovine Viral Diarrhea Virus
1848 (ThermoFisher Scientific, USA) and treated with penicillin (1.6 mg/L), streptomycin (0.4
1849 mg/L) and fungizone (2.5 mg/L) at 37 °C in 5% CO₂. The virus was propagated in CRIB-
1850 1 cells (CRL-11883, ATCC, USA; Flores & Donis, 1995) at a low multiplicity of
1851 infection (m.o.i 0.01) and titrated by the End-point method and calculated by Reed and
1852 Muench (1938). The viral titer obtained was 10^{8.79} TCID₅₀/ml.

1853 Sixteen 7 to 9-week-old male C57BL/6 wild-type (WT) mice and sixteen 7-9-week-old
1854 male TLR3/7/9^{-/-} mice were distributed into four groups: uninfected WT group,
1855 uninfected TLR3/7/9^{-/-} group, BoHV-5 infected WT group, and BoHV-5 infected
1856 TLR3/7/9^{-/-} group. C57BL/6 wild-type (WT) mice were obtained from the Animal Care
1857 Facilities of Instituto de Ciências Biológicas (ICB-UFMG), and combined TLR 3/7,9^{-/-}
1858 mice were kindly provided by Dr. Marco Antônio Campos (Centro de Pesquisas René
1859 Rachou, Fiocruz, Minas Gerais, Brazil). The experimental protocol was approved by the
1860 Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Universidade Federal de Minas
1861 Gerais (CEUA/UFMG, Permit Protocol Number 272/2011). Animals were anesthetized
1862 by intraperitoneal injection of a mixture of ketamine 100 mg/kg (10% Syntec) and
1863 xylazine 10 mg/kg (2% Syntec), and 1×10⁴ TCID₅₀ inoculum of the purified BoHV-5
1864 resuspended in 10 µl of phosphate-buffered saline (PBS) was injected intracranially in
1865 the right side of a sagittal suture at the level of the eyes (Vilela et al., 2008). The control
1866 group received 10 µl of PBS. Mice were housed in microisolator cages in our Bio Safety
1867 Level-2 facility and provided water and food ad libitum and were observed for 3 days
1868 following infection.

1869 Mice were euthanized with an overdose of sterilized mixture with ketamine 100 mg/kg
1870 (10% Syntec) and xylazine 10 mg/kg (2% Syntec), in PBS. We performed necropsy of
1871 all animals used in this study. Brains from mock and infected mice were collected and
1872 fixed in 10% buffered formalin solution, dehydrated, cleared, and embedded in paraffin.
1873 Sections of 4 µm thickness were obtained and stained with hematoxylin-eosin (H&E).
1874 The degree of meningitis was evaluated as 0: without inflammation; 1: a layer of
1875 inflammatory cells; 2: two layers of inflammatory cells; 3: three layers of inflammatory

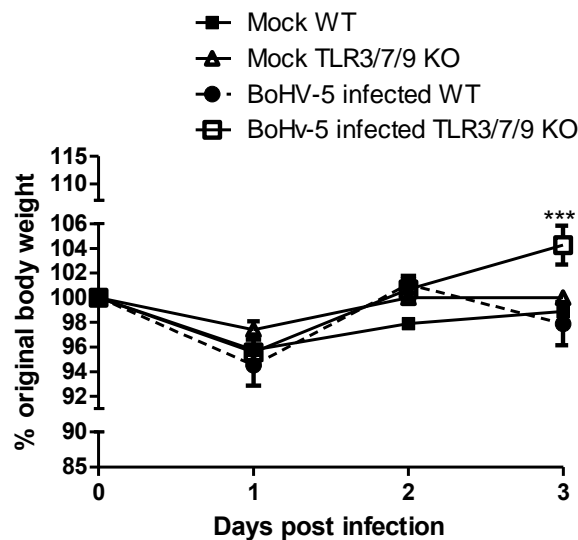
1876 cells; 4: four to six layers of inflammatory cells; 5: seven or more layers of inflammatory
1877 cells (Amaral et al., 2011). Other sections of these fragments were used to evaluate the
1878 microglia activation by immunohistochemistry, by ionized calcium binding adapter
1879 molecule 1 antibody monoclonal (Iba-1) (Faleiros et al., 2014). Antigen retrieval was
1880 done using sodium-citrate buffer (pH 6) for 12 min in microwave and blocked for
1881 endogenous peroxidase activity with H₂O₂ and PBS solution (10%) for 30 min. T, the
1882 protein block was made with non-fat dry milk in PBS 6% (w/v) and 0.1% Tween-20.
1883 After that, sections were incubated with rabbit monoclonal antibody against iba-1
1884 (Abcam), diluted in 1:2000 and incubated overnight at 4°C. Biotinylated polyclonal link
1885 and streptavidin-HRP (Leica) were applied and the sections were incubated with
1886 diaminobenzidine 5% (v/v) (Leica). After, the sections were counterstained with Harris
1887 haematoxylin. Brains from other of mock and infected groups were collected and stored
1888 at -80°C for detection of neurotrophic factors (BDNF, NGF, and GDNF) by sandwich
1889 ELISA. Then brain homogenates were obtained using an extraction solution (100 mg of
1890 tissue per milliliter), containing 0.4M NaCl, 0.05% Tween 20, 0.5% BSA, 0.1 mM phenyl
1891 methyl sulphonyl fluoride, 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA, and 20 KIU
1892 aprotinin, using Ultra-Turrax. Lysates were centrifuged at 13,000g for 10 min at 4°C.
1893 Concentrations of neurotrophins from the supernatants were assayed in an ELISA (R&D
1894 Systems, Minneapolis, MN, USA) setup, according to the manufacturer's procedures.
1895 The data were expressed as picogram per 100 mg of tissue.

1896
1897
1898
1899
1900
1901
1902
1903
1904
1905
1906
1907
1908
1909

1910 **Results**

1911 To investigate the participation specifically of the endosomal TLRs 3, 7 and 9 during
1912 BoHV-5 infection in vivo WT and TLR3/7/9 deficient mice (Schamber-Reis et al., 2013;
1913 Klein et al., 2017) were inoculated using 10^4 TCID₅₀ of BoHV-5 (Mutum sample) by
1914 intracranial route. Mock WT (n=5) and TLR3/7/9^{-/-} (n=5) animals did not show any
1915 clinical signs. In the other hand, BoHV-5 infected WT (n=11) and TLR3/7/9^{-/-} (n=11)
1916 mice presented weight loss (Fig. 1) and mild clinical signs characterized by serous ocular
1917 discharge, ruffled fur and apathy in a similar frequency.

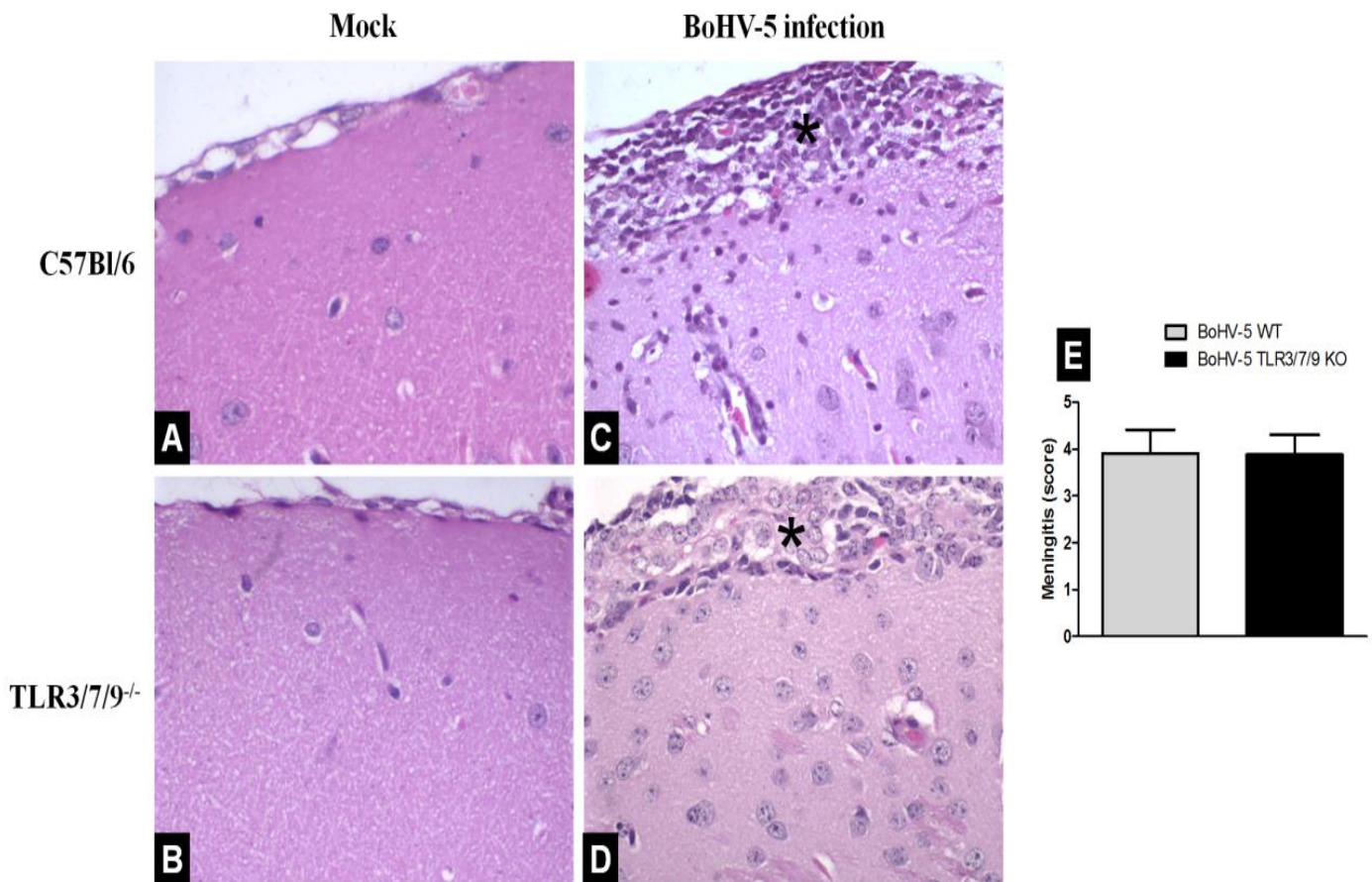
1918
1919



1920 **Figure 1 - Weight of animals inoculated intracranially with BoHV-5.** 7-week old male WT and
1921 TLR3/7/9 deficient animals were inoculated with 10^4 TCID₅₀ of BoHV-5, Mutum sample, or PBS
1922 by the intracranial route and weighed for three days post-infection. Values were expressed as the
1923 percentage of original weight. # $p > 0.05$ Non-infected WT versus non-infected TLR3/7/9^{-/-} mice,
1924 and BoHV-5 infected WT versus BoHV-5 infected TLR3/7/9^{-/-} mice. *** $p < 0.001$ Mock WT and
1925 TLR3/7/9^{-/-} mice versus BoHV-5 infected WT and TLR3/7/9^{-/-} mice.
1926

1927
1928
1929
1930
1931
1932

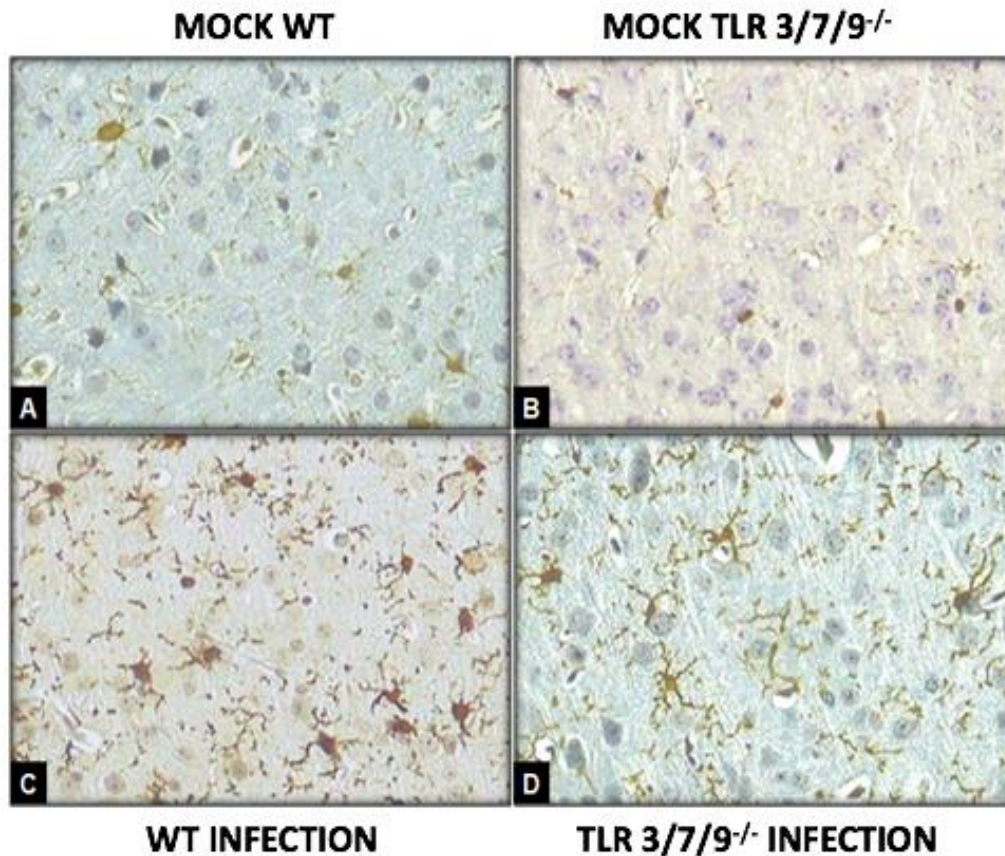
1933 No histopathological changes were observed in non-infected WT (n=5) and TLR3/7/9
 1934 deficient (n=5) animals (Fig 2 A-B). Both BoHV-5 infected groups (n=5 per group)
 1935 exhibited infiltration of mononuclear cells in the meninges (Fig.2C-D), reactive blood
 1936 vessels, and occasional vacuolization of neuropil. Moreover, WT and TLR3/7/9 deficient
 1937 mice presented similar degrees of meningitis (Fig.2E).
 1938



1940
 1941 **Figure 2 - Representative photomicrographs of H&E-stained brain sections and pathology**
 1942 **score for meningitis.** Cerebrum from non-infected WT (A) and TLR3/7/9 deficient mice (B)
 1943 showing frontal cortex with normal histological appearance; BoHV-5-infected WT (C) and
 1944 TLR3/7/9 deficient mice (D) with similar degree of meningitis (asterisks) in the cerebrum.
 1945 Magnification: A-D: x40. Similar score of meningitis was observed in both BoHV-5 WT and
 1946 TLR3/7/9 deficient groups (E).

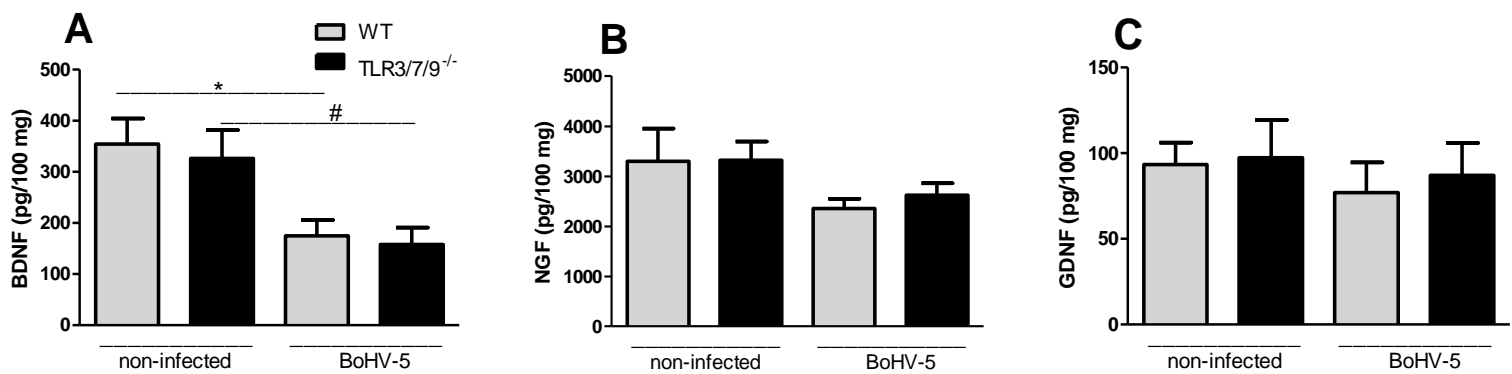
1947
 1948
 1949

1950 Both non-infected wild-type and TLR 3/7/9 deficiency mice presented occasional Iba-1
1951 immunopositive cells, with ramified aspect, distributed throughout the brain parenchyma.
1952 Both BoHV-5 infected groups exhibited focal areas containing reactive microglia, mainly
1953 in the neuropil region.
1954



1955
1956
1957 **Figure 3 – Photomicrograph of fragments of the prefrontal cortex immunoassayed for Iba-1**
1958 *Wild type mice in (A) and deficient for TLR3/7/9^{-/-} in (B) showing occasional immunopositive*
1959 *cells. Mice infected wild (C) and deficient for TLR3/7/9^{-/-} in (D), with an increase in Iba-1*
1960 *immunopositive cells in the neuropil (microgliosis).*
1961
1962
1963
1964
1965
1966

1967 The brain levels of neurotrophic factors BDNF, NGF e GDNF were measured at 3 day
 1968 post infection, n=6 per group (Fig 3). Similar levels of BDNF were detected in both non-
 1969 infected WT and TLR3/7/9 deficient mice. BoHV-5 infection promoted significantly
 1970 reduction in the brain levels of BDNF ($p<0.05$), compared with non-infected animals.
 1971 The absence of TLR3/7/9 did not alter this parameter and no statistical difference was
 1972 observed between infected WT and TLR3/7/9^{-/-} mice (Fig 3A). Similar brain levels of
 1973 NGF (Fig. 3B) and GDNF (Fig. 3C) were observed in all evaluated groups:
 1974



1975
 1976 **Figure 4** - Comparison of neurotrophic factors (BDNF, NGF and GDNF) after three days of
 1977 infection, in the brain of non-infected wild-type, non-infected TLR3/7/9^{-/-}, BoHV-5 infected wild-
 1978 type and BoHV-5 infected TLR3/7/9^{-/-} mice, n=5 per group. **Both wild-type and TLR 3/7/9^{-/-}**
 1979 **infected mice exhibited lower brain levels of BDNF ($p<0.05$), compared with non-infected**
 1980 **groups (A). NGF and GDNF levels did not present changes.**

1981
 1982
 1983
 1984
 1985
 1986
 1987
 1988
 1989
 1990
 1991
 1992
 1993
 1994
 1995
 1996
 1997
 1998

1999 **Discussion**

2000 In this study, we specifically focused on the role of the endosomal TLRs 3, 7 and
2001 9 during bovine herpesvirus 5 infection in mice. The infected animals presented similar
2002 clinical signs to those observed in an early phase of naturally infected cattle (Perez et al.,
2003 2002). Moreover, BoHV-5 infected mice developed different degrees of meningitis. The
2004 present findings corroborated with our previous study, which C57BL/6 mice infected
2005 with 10^4 TCID₅₀ of Mutum strain presented weight loss, ruffled fur and hunched posture
2006 associated with mild meningitis (Barbosa et al., 2016). However, BoHV-5 infection in
2007 triple TLR3/7/9 knockouts did not alter those parameters, suggesting that there was no
2008 change in susceptibility to BoHV-5 infection in combined TLRs 3, 7 and 9 deficiencies.

2009 This is the first study evaluating the effects of BoHV-5 infection in the absence of
2010 TLRs 3, 7 and 9 in C57BL/6 mice. There are few studies evaluating the role of TLRs
2011 during acute bovine herpesvirus-5 infection and those works are restricted to in vitro or
2012 in vivo inoculation in cattle (Marin et al., 2014b, 2014a; Oliveira et al., 2017; Rensetti et
2013 al., 2016). Calves infected by intranasal route with $10^{6.3}$ TCID₅₀ of BoHV-5 showed an
2014 increase in the brain expression of TLRs 3, 7, 8 and 9 (Marin et al., 2014b). Additionally,
2015 a significant augment of TLR3, TLR7 and TLR8 mRNA was detected in different brain
2016 regions from cattle after inoculation with $10^{6.3}$ TCID₅₀ of BoHV-5. Nevertheless, the
2017 TLR9 expression was not affected by BoHV-5 infection and viral reactivation promoted
2018 a distinguishable TLR expression (Rensetti et al., 2016). In agreement to found after acute
2019 infection, an in vitro study showed that the agonist stimulation of TLR 7/8 expressed by
2020 peripheral blood leukocytes promoted anti-viral activity on BoHV-5 infected MDBK
2021 cells (Marin et al., 2014a).

2022 The role of TLRs has been also evaluated in Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1)
2023 infection in mice. TLR9 or TLR2/9 deficient mice showed higher susceptibility to HSV-
2024 1 infection by intranasal inoculation (Lima et al., 2010). And the pretreatment with the
2025 TLR3 stimulation before HSV-1 infection induced early expression of several immune
2026 genes in the brain and resulted in a significantly lower virus load (Boivin et al., 2008).
2027 Controversial results have been observed after the infection with West Nile virus (WNV)
2028 in mice. Some authors described that the absence of TLR3 resulted in enhancement of
2029 susceptibility to WNV (Daffis et al., 2008). In contrast, other work showed that the
2030 survival of WNV-infected TLR3^{-/-} mice were improved compared to wild-type mice
2031 (Wang et al., 2004). Interesting, TLR3 seems to be dispensable for the innate miRNA
2032 response to WNV infection (Chugh et al., 2014). Speculating, our results suggested that

2033 other pathways should be involved to activate immune response to BoHV-5 in infection
2034 C57BL/6 mice. Abril and collaborators described the occurrence of clinical signs as
2035 weakness, depression, arched back and death in 129Sv/Ev mice knockout for alpha and
2036 beta interferon receptors but having gamma functional interferon system that were
2037 infected by BoHV-5 (sample N569) by intraperitoneal route. No illness was observed in
2038 animals that had, in addition to the above-mentioned deletions, absence of gamma
2039 interferon receptors. This indicated the importance of these molecules for the occurrence
2040 of effective replication of BoHV-5 in the central nervous system of mice and the
2041 consequent development of clinical neurological signs (Abril et al., 2004). As C57BL/6
2042 mice produce preferentially Th1 cytokines, presenting high basal levels of interferon
2043 gamma when compared to other mice strains (Watanabe et al., 2004) is possible to deduce
2044 that, possibly, the profile of immune response of C57BL/6 may be important to define
2045 their higher susceptibility to BoHV-5 infection. It is important to emphasize that other
2046 aspects of the host and of the viral sample used (Mutum) cannot be discarded when trying
2047 to understand the results obtained, and there may be other factors that can influence the
2048 disease course of the animals.

2049 In the present work, we observed several microglial cells with “activated” form,
2050 characterized by amoeboid morphology scattered throughout the neuropil, similar to
2051 described in other infections (Graeber and Streit, 2010; Kozlowski and Weimer, 2012).
2052 Microglia plays an important role in brain homeostasis as well as to immune response, as
2053 sentinel cells. Those cells are able to detect invasive pathogens, triggering phagocytosis,
2054 antigen presentation, synaptic stripping, and repair (Correale, 2014). During viral
2055 infection, activated microglia contributes to TLR expression and production of
2056 inflammatory mediators that can compromise brain function (Furr and Marriott, 2012;
2057 Guo et al., 2015). Mouse microglia stimulated by HSV-1 can activate NF- κ B and increase
2058 TNF and IL-6 expression via TLR2 and TLR9 (Guo et al., 2015). On the other hand, it is
2059 important to note that microglia can also mediate beneficial effects by limit viral
2060 replication through the production of type I IFNs (Hatton and Duncan, 2019) and
2061 promoting neuroprotection by secretion of anti-inflammatory cytokines and neurotrophic
2062 factors (Correale, 2014). We also studied the effects of TLR 3/7/9 on the brain levels of
2063 neurotrophic factors BDNF, NGF and GDNF. BoHV-5 infection promoted a significant
2064 decrease in the BDNF concentrations in the brain and the absence of TLR 3/7/9 does not
2065 alter this pattern. Those results suggested that low brain BDNF levels could be a common
2066 factor in the meningoencephalitis caused by BoHV-5. BDNF modulates brain plasticity

2067 and plays an essential role in the neuronal survival and plasticity (Lima Giacobbo et al.,
2068 2019; Mocchetti and Bachis, 2004). Loss of BDNF has been implicated in a number of
2069 brain disorders (Bharani et al., 2019; Mocchetti and Bachis, 2004; Tejada et al., 2019; Xu
2070 et al., 2017). Moreover, studies have demonstrated that the neuronal degeneration
2071 observed in in NeuroAIDS patients may be promoted by lowering BDNF levels
2072 (Mocchetti and Bachis, 2004).

2073 In summary, our study demonstrates mild clinical associated with brain
2074 inflammation, activated microglia and reduction expression of BDNF upon acute
2075 infection by BoHV-5 in mice. Moreover, we demonstrated that combined TLR3/7/9
2076 deficiency does not alter those characteristics, suggesting that other signals should be
2077 relevant for activate neuroinflammation and consequently brain pathology during BoHV-
2078 5 infection.

2079

2080 **Conflict of Interest Statement**

2081 The authors report no conflict of interests.

2082

2083 **Acknowledgements**

2084 This work was supported by “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico”
2085 (CNPq) [grant number 449963/2014-4] and “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas
2086 Gerais” (FAPEMIG) [grant number APQ-02437-14]; UFMG, Brazil. I.L. Quintino-de-Carvalho,
2087 L.P. Souza, F.G. Fonseca, E.F. Barbosa Stancioli and M.A. Rachid received fellowships from
2088 CNPq.

2089

2090

2091

2092

2093

2094

2095

2096

2097

2098

2099

2100

2101

2102

2103 **REFERENCES**

2104

2105 Abril, C. et al. Both Viral and Host Factors Contribute to Neurovirulence of Bovine Herpesviruses
2106 1 and 5 in Interferon Receptor-Deficient Mice. *Journal of Virology* 78, 3644–3653. 2004.
2107 <https://doi.org/10.1128/JVI.78.7.3644>

2108

2109 Amaral, D.C.G., Rachid, M.A., Vilela, M.C., Campos, R.D.L., Ferreira, G.P., Rodrigues, D.H.,
2110 Lacerda-Queiroz, N., Miranda, A.S., Costa, V.V., Campos, M.A., Kroon, E.G., Teixeira, M.M.,
2111 Teixeira, A.L., 2011. Intracerebral infection with dengue-3 virus induces meningoencephalitis
2112 and behavioral changes that precede lethality in mice. *Journal of Neuroinflammation* 8.
2113 <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-23>

2114

2115 Aparecida Silva Barbosa, A., Freitas Versiani, A., Fonseca da Cunha Sousa, L., Silva de Miranda,
2116 A., Gasparini, M.R., Brant, F., Silva, D.G., Luisa Quintino-de-Carvalho, I., Marianetti Soriani,
2117 F., Guimarães da Fonseca, F., César Vasconcelos, A., da Silva Barcelos, L., Martins Teixeira, M.,
2118 Lúcio Teixeira, A., Machado, F.S., Barbosa-Stancioli, E.F., Rachid, M.A., 2016. Role of the
2119 suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2) during meningoencephalitis caused by Bovine
2120 herpesvirus 5 (BoHV-5). *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 47,
2121 26–31. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.05.003>

2122

2123 Aquino Neto, H.M., Carvalho, A.U., Facury Filho, E.J., Ferreira, P.M., Barbosa-Stancioli, E.F.,
2124 Lobato, Z.I.P., Alvarenga, M.R., Serrano, A.L., Martins, R.A., Afonso, D.A.F., 2009.
2125 Meningoencefalite por Herpesvirus bovino 5 em Minas Gerais: relato de caso clínico. *Arquivo*
2126 *Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 61, 1–5. [https://doi.org/10.1590/S0102-](https://doi.org/10.1590/S0102-09352009000100001)
2127 [09352009000100001](https://doi.org/10.1590/S0102-09352009000100001)

2128

2129 Bharani, K.L., Ledreux, A., Gilmore, A., Carroll, S.L., Granholm, A.C., 2019. Serum pro-BDNF
2130 levels correlate with phospho-tau staining in Alzheimer’s disease. *Neurobiology of Aging* 1–11.
2131 <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2019.11.010>

2132

2133 Boivin, N., Sergerie, Y., Rivest, S., Boivin, G., 2008. Effect of Pretreatment with Toll-like
2134 Receptor Agonists in a Mouse Model of Herpes Simplex Virus Type 1 Encephalitis. *The Journal*
2135 *of Infectious Diseases* 198, 664–672. <https://doi.org/10.1086/590671>

2136

2137 Carroll, J.A., Race, B., Williams, K., Chesebro, B., 2018. Toll-like receptor 2 confers partial
2138 neuroprotection during prion disease. *PLoS ONE* 13, 1–20.
2139 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208559>

2140

2141 Chattopadhyay, D., Mukhopadhyay, A., Ojha, D., Sadhukhan, P., Dutta, S., 2018. Immuno-
2142 metabolic changes in herpes virus infection. *Cytokine* 112, 52–62.
2143 <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.06.028>

2144

2145 Choi, S.H., Bylykbashi, E., Chatila, Z.K., Lee, S.W., Pulli, B., Clemenson, G.D., Kim, E.,
2146 Rompala, A., Oram, M.K., Aronson, J., Zhang, C., Miller, S.J., Lesinski, A., Chen, J.W., Kim,
2147 D.Y., Praag, H. Van, Spiegelman, B.M., Gage, F.H., 2019. Exercise on Cognition in an Alzheimer
2148 ’ s Mouse Model 361. <https://doi.org/10.1126/science.aan8821>. Induced

2149

2150 Chugh, P.E., Damania, B.A., Dittmer, D.P., 2014. Toll-like receptor-3 is dispensable for the
2151 innate microRNA response to West Nile Virus (WNV). *PLoS ONE* 9.

- 2152 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104770>
2153
- 2154 Correale, J., 2014. The role of microglial activation in disease progression. *Multiple Sclerosis* 20,
2155 1288–1295. <https://doi.org/10.1177/1352458514533230>
2156
- 2157 Daffis, S., Samuel, M.A., Suthar, M.S., Gale, M., Diamond, M.S., 2008. Toll-Like Receptor 3 Has
2158 a Protective Role against West Nile Virus Infection. *Journal of Virology* 82, 10349–10358.
2159 <https://doi.org/10.1128/jvi.00935-08>
2160
- 2161 Del Médico Zajac, M.P., Ladelfa, M.F., Kotsias, F., Muylkens, B., Thiry, J., Thiry, E., Romera,
2162 S.A., 2010. Biology of bovine herpesvirus 5. *The Veterinary Journal* 184, 138–145.
2163 <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.03.035>
2164
- 2165 Faleiros, B.E., Miranda, A.S., Campos, A.C., Gomides, L.F., Kangussu, L.M., Guatimosim, C.,
2166 Camargos, E.R.S., Menezes, G.B., Rachid, M. a., Teixeira, A.L., 2014. Up-regulation of brain
2167 cytokines and chemokines mediates neurotoxicity in early acute liver failure by a mechanism
2168 independent of microglial activation. *Brain Research* 1578, 49–59.
2169 <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.07.001>
2170
- 2171 Furr, S.R., Marriott, I., 2012. Viral CNS infections: Role of glial pattern recognition receptors in
2172 neuroinflammation. *Frontiers in Microbiology* 3, 1–12.
2173 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00201>
2174
- 2175 Graeber, M.B., Streit, W.J., 2010. Microglia: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica* 119,
2176 89–105. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0622-0>
2177
- 2178 Guo, Y.J., Luo, T., Wu, F., Mei, Y.W., Peng, J., Liu, H., Li, H.R., Zhang, S.L., Dong, J.H., Fang,
2179 Y., Zhao, L., 2015. Involvement of TLR2 and TLR9 in the anti-inflammatory effects of
2180 chlorogenic acid in HSV-1-infected microglia. *Life Sciences* 127, 12–18.
2181 <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.01.036>
2182 Hatton, C.F., Duncan, C.J.A., 2019. Microglia Are Essential to Protective Antiviral Immunity:
2183 Lessons From Mouse Models of Viral Encephalitis. *Frontiers in Immunology* 10.
2184 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02656>
2185
- 2186 Kozlowski, C., Weimer, R.M., 2012. An automated method to quantify microglia morphology
2187 and application to monitor activation state longitudinally in vivo. *PLoS ONE* 7, 1–10.
2188 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031814>
2189
- 2190 Kumar, V., 2019. Toll-like receptors in the pathogenesis of neuroinflammation. *Journal of*
2191 *Neuroimmunology* 332, 16–30. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2019.03.012>
2192
- 2193 Ladelfa, M.F., Del Médico Zajac, M.P., Kotsias, F., Delgado, F., Muylkens, B., Thiry, J., Thiry,
2194 E., Romera, S. a, 2011. Comparative study on the in vitro and in vivo properties of two bovine
2195 herpesvirus-5 reference strains. *Acta veterinaria Scandinavica* 53, 37.
2196 <https://doi.org/10.1186/1751-0147-53-37>
2197
- 2198 Lima, G.K., Zolini, G.P., Mansur, D.S., Lima, B.H.F., Wischhoff, U., Astigarraga, R.G., Dias,
2199 M.F., Silva, M.D.G., Béla, S.R., Antonelli, L.R.D.V., Arantes, R.M., Gazzinelli, R.T., Báfica, A.,
2200 Kroon, E.G., Campos, M.A., 2010. Toll-Like Receptor (TLR) 2 and TLR9 expressed in trigeminal
2201 ganglia are critical to viral control during herpes simplex virus 1 infection. *American Journal of*

- 2202 Pathology 177, 2433–2445. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.100121>
2203
- 2204 Lima Giacobbo, B., Doorduyn, J., Klein, H.C., Dierckx, R.A.J.O., Bromberg, E., de Vries, E.F.J.,
2205 2019. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Brain Disorders: Focus on Neuroinflammation.
2206 Molecular Neurobiology 56, 3295–3312. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1283-6>
2207
- 2208 Madhu, B.P., Singh, K.P., Saminathan, M., Singh, R., Tiwari, A.K., Manjunatha, V., Harish, C.,
2209 Manjunathareddy, G.B., 2016. Correlation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) inhibition
2210 with TNF- α , caspase-1, FasL and TLR-3 in pathogenesis of rabies in mouse model. Virus Genes
2211 52, 61–70. <https://doi.org/10.1007/s11262-015-1265-y>
2212
- 2213 Marin, M.S., Quintana, S., Faverín, C., Leunda, M.R., Odeón, A.C., Pérez, S.E., 2014a. Toll-like
2214 receptor activation and expression in bovine alpha-herpesvirus infections. Research in Veterinary
2215 Science 96, 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.11.015>
2216
- 2217 Marin, M.S., Quintana, S., Leunda, M.R., Odeón, A.C., Pérez, S.E., 2014b. Toll-like receptor
2218 expression in the nervous system of bovine alphaherpesvirus-infected calves. Research in
2219 Veterinary Science 97, 422–429. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.06.014>
2220 Meyer, G., Bare, O., Thiry, E., 1999. Identification and characterization of bovine herpesvirus
2221 type 5 glycoprotein H gene and gene products 1, 2849–2859.
2222
- 2223 Mocchetti, I., Bachis, A., 2004. Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB protects
2224 neurons from HIV-1/gp120-induced cell death. Critical reviews in neurobiology 16, 51–7.
2225 <https://doi.org/10.1615/CritRevNeurobiol.v16.i12.50>
2226
- 2227 Oliveira, B.R.S.M., Vieira, F. V., de S. Vieira, D., da Silva, S.E.L., Gameiro, R., Flores, E.F.,
2228 Cardoso, T.C., 2017. Expression of miR-155 associated with Toll-like receptors 3, 7, and 9
2229 transcription in the olfactory bulbs of cattle naturally infected with BHV5. Journal of
2230 NeuroVirology 23, 772–778. <https://doi.org/10.1007/s13365-017-0564-6>
2231
- 2232 Perez, S.E., Bretschneider, G., Leunda, M.R., Osorio, E. a, Flores, E.F., Odeón, a C., 2002.
2233 Primary infection, latency, and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous
2234 system. Veterinary pathology 39, 437–444. <https://doi.org/10.1354/vp.39-4-437>
2235
- 2236 Rensetti, D., Marin, M., Quintana, S., Morán, P., Verna, A., Odeón, A., Pérez, S., 2016.
2237 Involvement of toll-like receptors 3 and 7/8 in the neuropathogenesis of bovine herpesvirus types
2238 1 and 5. Research in Veterinary Science 107, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.04.009>
2239
- 2240 Rissi, D.R., Pierezan, F., e Silva, M.S., Flores, E.F., de Barros, C.S.L., 2008. Neurological disease
2241 in cattle in southern Brazil associated with Bovine herpesvirus infection. Journal of veterinary
2242 diagnostic investigation 20, 346–9. <https://doi.org/10.1177/104063870802000315>
2243
- 2244 Tejeda, G.S., Esteban-Ortega, G.M., San Antonio, E., Vidaurre, Ó.G., Díaz-Guerra, M., 2019.
2245 Prevention of excitotoxicity-induced processing of BDNF receptor TrkB-FL leads
2246 to stroke neuroprotection. EMBO Molecular Medicine 11, 1–20.
2247 <https://doi.org/10.15252/emmm.201809950>
2248
- 2249 Vilela, M.C., Mansur, D.S., Lacerda-Queiroz, N., Rodrigues, D.H., Arantes, R.M.E., Kroon, E.G.,
2250 Campos, M.A., Teixeira, M.M., Teixeira, A.L., 2008. Traffic of leukocytes in the central nervous

- 2251 system is associated with chemokine up-regulation in a severe model of herpes simplex
2252 encephalitis: An intravital microscopy study. *Neuroscience Letters*.
2253 <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.08.072>
2254
- 2255 Wang, T., Town, T., Alexopoulou, L., Anderson, J.F., Fikrig, E., Flavell, R.A., 2004. Toll-like
2256 receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nature*
2257 *Medicine* 10, 1366–1373. <https://doi.org/10.1038/nm1140>
2258
- 2259 Watanabe, H., Numata, K., Ito, T., Takagi, K., Matsukawa, A., 2004. Innate immune response in
2260 Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock* 22, 460–466.
2261 <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000142249.08135.e9>
2262
- 2263 Xu, D., Lian, D., Wu, J., Liu, Y., Zhu, M., Sun, J., He, D., Li, L., 2017. Brain-derived
2264 neurotrophic factor reduces inflammation and hippocampal apoptosis in experimental
2265 *Streptococcus pneumoniae* meningitis. *Journal of Neuroinflammation* 14, 156.
2266 <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0930-6>
2267
- 2268 Zolini, G.P., Lima, G.K., Lucinda, N., Silva, M.A., Dias, M.F., Pessoa, N.L., Coura, B.P.,
2269 Cartelle, C.T., Arantes, R.M.E., Kroon, E.G., Campos, M.A., 2014. Defense against HSV-1 in a
2270 murine model is mediated by iNOS and orchestrated by the activation of TLR2 and TLR9 in
2271 trigeminal ganglia. *Journal of Neuroinflammation* 11, 1–12. [https://doi.org/10.1186/1742-2094-](https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-20)
2272 11-20
2273

2274 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

2275 O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) foi capaz de infectar e se replicar no encéfalo de
2276 camundongos C57BL/6 selvagens e deficientes para TLR3/7/9^{-/-} por meio da via
2277 intracraniana, sem diferença aparente entre eles. A resposta imunológica do hospedeiro
2278 frente ao BoHV-5 é de suma importância frente a infecção, sendo o equilíbrio entre as
2279 atividades pró- e anti-inflamatórias essenciais, nesta neuropatia. As citocinas e
2280 quimiocinas expressas nesse tipo de resposta como as encontradas neste estudo, IL-
2281 12p70, TNF, IL-10, IFN- γ , IL-6 e CCL-2, podem estar contribuindo para o
2282 desenvolvimento desta meningoencefalite, e podem nos trazer mais informações a
2283 respeito da multiplicação e desenvolvimento da doença no hospedeiro. São necessários
2284 mais estudos para entender sobre o envolvimento destas citocinas e quimiocinas
2285 expressas e suas consequências em relação ao BoHV-5. Os genes envolvidos na
2286 inflamação foram especialmente expressos e se mostraram importantes dentro dessa
2287 patologia, podendo futuras pesquisas contribuir para um maior conhecimento de quais
2288 caminhos são desencadeados pelo vírus no hospedeiro e como o sistema imune reage na
2289 tentativa de proteger e eliminar o agressor. Ao contrário de outros estudos “in vitro” e “in
2290 vivo” em bovinos, a deleção dos Tolls 3/7/9 em conjunto não trouxe diferença em
2291 parâmetros clínicos no modelo em estudo, indicando outros possíveis caminhos utilizados
2292 pelo vírus, podendo ser estudados para uma maior compreensão destes mecanismos. Em
2293 relação à apoptose, pode estar contribuindo para a multiplicação e sobrevivência do vírus
2294 como estratégia do BoHV-5 no hospedeiro. Observamos o aumento das atividades
2295 microglial e astrocitária nos animais infectados, sendo células relevantes para a ativação
2296 da resposta imune do hospedeiro, o que torna seu estudo mais aprofundado importante
2297 para sabermos se estão sendo apenas favoráveis no auxílio a resposta imune ou se a
2298 presença constante e em grande quantidade possa estar agindo provocando agravamento
2299 das lesões encefálicas.

2300

2301

2302

2303

2304 **10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 2305 ABBAS, A. K. et al. **Imunologia Celular e Molecular. In: Cap.02: Célula e tecidos do**
2306 **sistema imune. In: Appendices II: Citocinas.** Elsevier.7ª edição. 2012.
2307
- 2308 ABBOT, N. J. et al. **Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier.**
2309 *Nature Reviews Neuroscience*.v.7, p.41-53. 2006.
2310
- 2311 ABRIL, C. et al. **Both Viral and Host Factors Contribute to Neurovirulence of Bovine**
2312 **Herpesviruses 1 and 5 in Interferon Receptor-Deficient Mice.** *J Virol*. 2004.
2313
- 2314 ACHEK, A. et al. **Toll-like receptors: promising therapeutic targets for**
2315 **inflammatory diseases.** *Arch. Pharm. Res.* p.1032–1049. 2016. DOI: 10.1007/s12272-
2316 016-0806-9.
2317
- 2318 AKIRA, S. TAKEDA, K. **Toll- like receptor signaling.** *Nat Rev Immunol.* p. 499-511.
2319 2004.
2320
- 2321 ALLEN, S. J.; DAWBAM, D. **Clinical relevance of the neurotrophins and their**
2322 **receptors.** *Clin Sci (Lond).* p. 175-191. 2006.
2323
- 2324 AMARAL, D. C. G. **Intracerebral infection with dengue-3 virus induces**
2325 **meningoencephalitis and behavioral changes that precede lethality in mice.** *J.*
2326 *Neuroinflammation.* 2011. doi:10.1186/1742-2094-8-23
- 2327 AQUINO NETO, H. M. **Infecção experimental de coelhos com o isolado mutum de**
2328 **herpesvirus bovino 5 (bohv-5).** Dissertação apresentada ao Departamento de Clínica e
2329 Cirurgia Veterinária da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.
2330 2008.
- 2331 AQUINO NETO, H. M. **Meningoencefalite por Herpesvirus bovino 5 em Minas**
2332 **Gerais: relato de caso clínico.** *Arq. Bras. Med. Vet.* v.61, n.1, p 1-5. 2009.
2333
- 2334 ARRUDA, L. P. et al. **Deteccção molecular de herpesvírus bovino 1 e 5 em amostras**
2335 **de encéfalo conservadas em formol e emblocadas em parafinas provenientes de**
2336 **bovinos com doença neurológica.** *Pesq. Vet. Bras.* Rio de Janeiro. v. 30, n. 8, p. 646-
2337 650. 2010.
2338
- 2339 ASHOUR, D. S. **Toll-like receptor signaling in parasitic infections.** *Journal Expert*
2340 *Review of Clinical Immunology.* v.11. n.5. 2015.
2341
- 2342 BABRI, S. et al. **Amygdala and serum neurotrophic factor levels depend on rearing**
2343 **condition in male rats.** *Journal of Developmental Origins of Health and Disease.* 2018.
2344
- 2345 BARBOSA, A. A. S. et al. **Role of the suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2)**
2346 **during meningoencephalitis caused by Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5).** *Comparative*
2347 *Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*.v.47, p.26-31. 2016.

2348

2349 BARROS, C. S. L. et al. **Doenças do sistema nervoso de bovinos no Brasil.** São Paulo:
2350 Agnes. p.166-171. 2006.
2351

2352 BARTON, G. M.; MEDZHITOV, R. **Toll-like receptors and their ligands.** Curr Top
2353 Microbiol Immunol. 2002.
2354

2355 BÉCHADE, C. et al. **Microglial control of neuronal activity.** Front Cell Neurosci. 2013.
2356 doi: 10.3389/fncel.2013.00032.
2357

2358 BÉLANGER, M. et al. **Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron**
2359 **metabolic cooperation.** Cell Metal. 2011.
2360

2361 BELTRÃO, N. et al. **Infecção e enfermidade neurológica pelo herpesvírus bovino tipo**
2362 **5 (BHV-5): coelhos como modelo experimental.** Pesquisa Veterinária Brasileira. v.20,
2363 n. 4. 2000.
2364

2365 BLUME, G. R. et al. **Caracterização etiológica, epidemiológica e clínico-patológica**
2366 **da meningoencefalite por herpesvírus bovino em bovinos no Estado de Goiás.** Pesq.
2367 Vet. Bras. 2018. DOI: 10.1590/1678-5150-PVB-5341
2368

2369 BOCHE, D. et al. **Review: Activation patterns of microglia and their identification**
2370 **in the human brain.** Neuropathology and applied neurobiology. V. 39. p. 3-18. 2012.
2371

2372 BOYD, J. G.; GORDON, T. **Neurotrophic factors and their receptors in axonal**
2373 **regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury.** Molecular
2374 Neurobiology. v.27. n.3. 2003.
2375

2376 BUDNI, J. et al. **The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and**
2377 **Alzheimer's disease.** Aging Dis. p. 331-41. 2015.
2378

2379 CAGNINI, D. Q. et al. **Histopathological, immunohistochemical, and molecular**
2380 **study of BHV-5 infection in the central nervous system of experimentally infected**
2381 **calves.** Pesq. Vet. Bras. 2015. DOI: 10.1590/S0100-736X2015000400004
2382

2383 CAGNINI, D. Q. et al. **Retrospective study of Bovine herpesvirus 5**
2384 **meningoencephalitis in cattle from São Paulo State, Brazil.** Arq. Bras. Med. Vet.
2385 Zootec. v. 69, n. 2, p. 299-304. 2017. DOI:10.1590/1678-4162-9190.
2386

2387 CAHOY, J. D. et al. **A transcriptome database for astrocytes, neurons, and**
2388 **oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and**
2389 **function.** J. Neurosci. v.28. p.264-78. 2008.
2390

2391 CARPENTIER, P. A. et al. **Differential activation of astrocytes by innate and**
2392 **adaptive immune stimuli.** Glia. v.49. n.3. p.360-374. 2005.
2393

- 2394 CARON, L. et al. **Latent infection by bovine herpesvirus type-5 in experimentally**
2395 **infected rabbits: virus reactivation, shedding and recrudescence of neurological**
2396 **disease.** Veterinary Microbiology. V.84. p: 285-295. 2002.
2397
2398
2399
2400
- 2401 CASCIO, K. E. et al. **Encephalitis induced by bovine herpesvirus 5 and protection by**
2402 **prior vaccination or infection with bovine herpesvirus 1.** J. Vet. Diagn. Invest. p:134-
2403 139. 1999.
2404
- 2405 CHAO, M. V. **Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many**
2406 **signalling pathways.** Nat. Rev. Neurosci. v.4. p. 299–309. 2003.
2407
- 2408 CHEN, Z. et al. **The role of microglia in viral encephalitis: a review.** Journal of
2409 Neuroinflammation. 2019. DOI: 10.1186/s12974-019-1443-2
2410
- 2411 CHERRY J. D. Et al. **Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and**
2412 **the inflamed.** J Neuroinflammation. 2014. DOI:10.1186/1742-2094-11-98.
2413
- 2414 CHOWDHURY, S. I. et al. **Bovine Herpesvirus 5 (BHV-5) Us9 Is Essential for BHV-**
2415 **5 Neuropathogenesis.** J. Virol. v. 76. n. 8. 2002.
2416
- 2417 COLODEL, E. M. et al. **Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por**
2418 **herpesvírus bovino no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil.** Ciência Rural. Santa
2419 Maria, 32:293-298. 2002.
2420
- 2421 DASH, S. K. Herpes Meningoencephalitis: Causes, Diagnosis, and Treatment.
2422 **In: Meningoencephalitis: Disease Which Requires Optimal Approach in Emergency**
2423 **Manner.** p. 49. 2017. DOI:10.5772/intechopen.68553
2424
- 2425 DEISTER, C.; SCHMIDT, C. E. **Optimizing neurotrophic factor combinations for**
2426 **neurite outgrowth.** Journal of Neural Engineering. n.2. 2006.
- 2427 DELHON, G. et al. **Genome of bovine herpesvirus 5.** Journal of Virology. v. 77. p.
2428 10339-10347. 2003.
- 2429 DEL MEDICO ZAJAC, M. P. et al. **BHV-1 vaccine induces cross-protection against**
2430 **BHV-5 disease in cattle.** Research in Veterinary Science. Edinburg. v.81. p.327–334.
2431 2006.
2432
- 2433 DEL MEDICO ZAJAC, M. P. et al. **Biology of bovine herpesvirus 5 Research in**
2434 **Veterinary Science.** The veterinary journal. V.184. p.138 – 145. 2010.
2435
- 2436 DEL PUERTO, H. L. et al. **Canine distemper virus induces apoptosis in cervical**
2437 **tumor derived cell lines.** Virol J. 2011.
2438

- 2439 DELVES, P. J.; ROITT, D. **The Immune System - First of two parts.** N Engl J Med. p:
2440 37-50. 2000.
- 2441 DESPRÈS, P. et al. **Apoptosis in the mouse central nervous system in response to**
2442 **infection with mouse-neurovirulent dengue viruses.** J Virol. v.72. n.1. 1998.
- 2443 DIEL, D. G. et al. **O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) pode utilizar as rotas**
2444 **olfatória ou trigeminal para invadir o sistema nervoso central de coelhos,**
2445 **dependendo da via de inoculação.** Pesq. Vet. Bras. p:164-170. 2005.
- 2446 DOMINGUES, R. B. et al. **Neurotrophic factors in tension-type headache.** Arq
2447 Neuropsiquiatr. 73(5):420-424. 2015.
- 2448 DOYLE, S. et al. **IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene**
2449 **program.** Immunity.17(3). 2002.
- 2450 ELIAS, F.; SCHILD, A. L.; RIET-CORREA, F. **Meningoencefalite e encefalomalacia**
2451 **por Herpesvírus bovino-5: distribuição das lesões no sistema nervoso central de**
2452 **bovinos naturalmente infectados.** Pesquisa Veterinária Brasileira. V. 20, n. 3, p. 123-
2453 131, 2004.
- 2454 EL- MENYAR, A. A.; DAVIDSON, B. L. **Clinical implications of cytokines in the**
2455 **critical-care unit.** Expert Rev Cardiovasc Ther.7(7): 835-45. 2009.
- 2456 ELY, R. W. et al. **Bovine herpesviral encephalitis: a retrospective study on archived**
2457 **formalin-fixed, paraffin- embedded brain tissue.** Journal of Veterinary Diagnostic
2458 **Investigation.** Columbia, v. 8, n. 4, p. 487-492. 1996.
- 2459 ENGELS, M.; ACKERMANN, M. **Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections.**
2460 Veterinary Microbiology, v.53, p. 3-15. 1996.
- 2461 FARINA, C. et al. **Preferential expression and function of Toll-like receptor 3 in**
2462 **human astrocytes.** J Neuroimmunol.v.159, n.1, p.12-19. 2005.
- 2463 FAVIER, P. A. et al. **Latency of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) in tonsils and**
2464 **peripheral blood leukocytes.** The Veterinary Journal. Pg. 134-140. 2014.
- 2465 FENNER, F.J. et al. **Veterinary Virology.** 2a ed. San Diego: Academic Press. 1993.
- 2466 FILHO, G. B. Bogliolo: Patologia Geral. In: PEREIRA, F. E. L. **Inflamações.** 5.ed. Rio
2467 de Janeiro: Guanabara Koogan. cap.4. p.66. 2013.
- 2468
2469 FLORES, E. F.; SILVA, A. M.; WEIBLEN, R. **Neuropatogenicidade do herpesvírus**
2470 **bovino tipo 5 (HVB-5). In: Simpósio internacional sobre herpesvírus bovino (tipo 1**
2471 **e 5) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV).** Anais Santa Maria, RS. p. 127-136. 1998.
- 2472 FLORES, E. F. **Herpesviridae. In: Virologia Veterinária.** Editora UFSM, p. 454-457,
2473 2007.

- 2474 FLORES, E. F. et al. **Neuropatogênese experimental da infecção pelo herpesvírus**
2475 **bovino tipo 5 em coelhos.** Pesquisa Veterinária Brasileira. v.29, n.1, Rio de Janeiro.
2476 2009.
- 2477 FRANCO, R.; FERNÁNDEZ-SUÁREZ, D. **Alternatively activated microglia and**
2478 **macrophages in the central nervous system.** Volume 131, Pg. 65-86. 2015.
2479
- 2480 FUCHIKAMI, M. et al. **Single immobilization stress differentially alters the**
2481 **expression profile of transcripts of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF)**
2482 **gene and histone acetylation at its promoters in the rat hippocampus.** International
2483 Journal of Neur.v.12. n.1. 2009.
- 2484 GARCEZ, A. C. C. et al. **Meningite asséptica e doença autoimune / Aseptic meningitis**
2485 **and autoimmune disease.** Rev. méd. Minas Gerais. S46-S51. 2010.
- 2486 GAZZINELLI, R. T.; DENKERS, E. Y. **Protozoan encounters with Toll-like receptor**
2487 **signalling pathways: Implications for host parasitism.** Nat. Rev. Immunol.v.6, p. 895-
2488 906. 2006.
- 2489 GOMES, F. C. A.; TORTELLI, V. P.; DINIZ, L. **Glia: dos velhos conceitos às novas**
2490 **funções de hoje e as que ainda virão.** Estud. av.v.27, n.77. São Paulo. 2013.
- 2491 GOMES, L. I. et al. **Deteção de herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) em bovinos do**
2492 **sudeste brasileiro.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 54:217-220. 2002.
- 2493 GRIFFITHS, P. D. **Herpesviruses.** Viral infections.v.37, n.12, p.668-672. 2009.
- 2494 GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. **Morte celular por apoptose.** Revista
2495 Brasileira de Cancerologia. n.53, p.335-343. 2007.
- 2496 HALFEN, D.C.; VIDOR, T. **Meningoencefalite por hepesvírus tipo 5.** p. 97-108. In:
2497 Riet-Correa F., Schild A. L., Méndez M. C. & Lemos R. A. A.(ed.) Doenças de
2498 Ruminantes e Equinos. Vol. 1. 2ª ed. Editora Varela, São Paulo, SP. 2001.
- 2499 HARADA, K.; KAMIYA, T.; TSUBOI, T. **Gliotransmitter Release from Astrocytes:**
2500 **Functional, Developmental, and Pathological Implications in the Brain.** Front
2501 Neurosci.12;9:499. 2016.
- 2502 HARDWICK, J. M. **Apoptosis in viral pathogenesis.** Cell death differentiation. v. 8, p.
2503 109-110. 2001.
- 2504 HAY, S.; KANNOURAKIS, G. **A time to kill: viral manipulation of the cell death**
2505 **program.** Journal of General Virology.v.83. 2002.
- 2506 HAYDON, P. G.; CARMIGNOTO, G. **Astrocyte control of synaptic transmission and**
2507 **neurovascular coupling.** Physiol Rev.v.86, n.3. 2006.
- 2508 **IBGE**, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Brasil, 2016. Disponível em:
2509 [https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-](https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/16994-rebanho-de-bovinos-tem-maior-expansao-da-serie-historica.html)
2510 [noticias/noticias/16994-rebanho-de-bovinos-tem-maior-expansao-da-serie-](https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/16994-rebanho-de-bovinos-tem-maior-expansao-da-serie-historica.html)
2511 [historica.html](https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/16994-rebanho-de-bovinos-tem-maior-expansao-da-serie-historica.html). Acesso em: 28/11/2019.

- 2512 **ICTV** - International Committee on Taxonomy of Viruses, 2014. Disponível em
 2513 <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2014&bhcp=1>. Acesso em:
 2514 20/11/2019.
- 2515 **JONES, C. Herpes Simplex Virus Type 1 and Bovine Herpesvirus 1 Latency.** Clin.
 2516 Microbiol. Rev.v.16, n.1. 2003.
 2517
- 2518 **JURK, M. et al. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the**
 2519 **antiviral compound R-848.** Nat Immunol, 3(6):499. 2002.
- 2520 **KEATING, S. E. et al. IRAK-2 participates in multiple Toll-like receptor signaling**
 2521 **pathways to NFκB via activation of TRAF6 ubiquitination.** J Biol Chem. 282: 33435-
 2522 33443. 2007.
- 2523 **KETTENMANN, H. et al. Physiology of microglia.** Physiol Rev. 2011. Doi:
 2524 10.1152/physrev.00011.2010.
- 2525 **KUMAR, N. et al. Isolation and characterization of bovine herpes virus 5 (BoHV5)**
 2526 **from cattle in India.** Plos One, vol. 15. 2020. Doi: 10.1371/journal.pone.0232093
- 2527 **KURHADE, C. et al. Type I interferon response in olfactory bulb, the site of tick-**
 2528 **borne flavivirus accumulation, is primarily regulated by IPS-1.** J
 2529 Neuroinflammation.13:22. 2016.
- 2530 **LAI, K. O. et al. Cloning and expression of a novel neurotrophin, NT-7, from carp.**
 2531 **Mol Cell Neurosci.**11: 64-76. 1998.
- 2532 **LAURO, C. et al. Fractalkine in the nervous system: neuroprotective or neurotoxic**
 2533 **molecule?** Ann. N.Y. Acad. Sci. ISSN 0077-8923. 2015.
- 2534 **LAUW, F. N. et al. Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin.** Trends
 2535 Immunol. 26(10):509-11. 2005.
- 2536 **LIMA, G. K. et al. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR9 expressed in trigeminal**
 2537 **ganglia are critical to viral control during herpes simplex virus 1 infection.** Am J
 2538 Pathol.177(5): 2433-2445. 2010.
- 2539 **LINDQVIST, R. et al. Fast type I interferon response protects astrocytes from**
 2540 **flavivirus infection and virus-induced cytopathic effects.** J
 2541 Neuroinflammation.13:277. 2016.
- 2542 **LOURENCO, E. V.; LA CAVA, A. Cytokines in systemic lupus erythematosus.** Curr
 2543 Mol Med.9(3): 242-54. 2009.
- 2544 **LUM, F. M. et al. Zika Virus Infects Human Fetal Brain Microglia and Induces**
 2545 **Inflammation.** Clin Infect Dis. 2017. P. 914-920. doi:10.1093/cid/ciw878
- 2546 **LUO, P. et al. Fractalkine/CX3CR1 is involved in the cross-talk between neuron and**
 2547 **glia in neurological diseases.** Brain Research Bulletin. Vol. 146. 2019. Pages 12-21. Doi:
 2548 10.1016/j.brainresbull.2018.11.017.

- 2549 MACHADO, G. F. et al. **Bovine herpesvirus-5 infection in a rabbit experimental**
2550 **model: Immunohistochemical study of the cellular response in the CNS.** Microbial
2551 Pathogenesis. v.57, p.10-16. 2013.
- 2552 MANSUR, D. S. et al. **Lethal encephalitis in myeloid differentiation factor 88-**
2553 **deficient mice infected with herpes simplex virus 1.** Am J Pathol.166(5):1419-26.
2554 2005.
- 2555 **MAPA**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasil, 2015. Disponível
2556 em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 28/11/2019.
- 2557 MARIN, M. S. et al. **Toll-like receptor activation and expression in bovine alpha-**
2558 **herpesvirus infections.** Research in Veterinary Science.v.96, n.1, p.196-203. 2014.
- 2559 MAYER, S. V. et al. **Dexamethasone-induced reactivation of bovine herpesvirus type**
2560 **5 latent infection in experimentally infected rabbits' results in a broader distribution**
2561 **of latent viral DNA in the brain.** Braz J Med Biol Res. v. 39, n. 3. 2006.
2562
- 2563 MENDES, P. G. M.; SOUZA, C. A. J. **Aplicação de modelos animais na pesquisa**
2564 **biomédica experimental.** *Revista de Saúde-RSF* 4.2. 2017.
2565
- 2566 MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. Jr. **Innate Immunity.** N Engl J Med. 343:338-44.
2567 Ago/2000.
2568
- 2569 MEYER, G. et al. **Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves**
2570 **with bovine herpesvirus types 1 and 5.** Arch. Virol., v. 146, p. 633-652, 2001.
2571
- 2572 MENASRIA, R. et al. **Protective role of CX3CR1 signalling in resident cells of the**
2573 **central nervous system during experimental herpes simplex virus encephalitis.**
2574 Journal of General Virology. 2017. DOI 10.1099/jgv.0.000667
2575
- 2576 MONTEMEZZO, A. et al. **Encefalomielite disseminada aguda: relato de caso.** Anais
2577 de Medicina. v. 1, n. 1, p. 20. 2014.
2578
- 2579 MORICHI, S. et al. **Brain-derived neurotrophic factor and interleukin-6 levels in the**
2580 **serum and cerebrospinal fluid of children with viral infection-induced**
2581 **encephalopathy.** Neurochem Res. p. 2143-2149. 2014. DOI:10.1007/s11064-014-1409-
2582 9.
2583
- 2584 MURER, M. G.; YAN, Q.; RAISMAN-VOZARI, R. **From acquisition to**
2585 **consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in**
2586 **hippocampal-dependent learning.** Prog neurobiol.v.63, n.1. 2001.
2587
- 2588 NALBANDIAN, A.; CRISPIN, J. C.; TSOKOS, G. C. **Interleukin-17 and systemic**
2589 **lupus erythematosus: current concepts.** Clin Exp Immunol.157(2): 209-15.2009.
2590
- 2591 NAMURA, S. et al. **Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by**
2592 **experimental cerebral ischemia.** Journal of Neuroscience. V.18, n.10. 1998.
2593

- 2594 NISHIYA, T.; DEFRANCO, A. L. **Ligand-regulated chimeric receptor approach**
2595 **reveals distinctive subcellular localization and signaling proper ties of the Toll-like**
2596 **receptors.** J Biol Chem. 279(18):19008-17. 2004.
2597
- 2598 OLIVEIRA, R. A. M. et al. **Meningoencefalite necrosante em bovinos associada ao**
2599 **herpesvírus bovino-5 em Pernambuco-Brasil.** Acta Scientiae Veterinarie. 2014.
2600
- 2601 OLIVEIRA, R. A. M. et al. **Prevalência das infecções latentes por BoHV-1 e BoHV-5**
2602 **em bovinos de corte no Estado do Paraná.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.67, n.5,
2603 p.1217-1225. 2015.
2604
- 2605 OLSON, J. K.; MILLER, S. D. **Microglia initiate central nervous system innate and**
2606 **adaptive immune responses through multiple TLRs.** J Immunol.173(6)3916-3. 2004.
2607
- 2608 PALUDAN, S.R. et al. **Recognition of herpesviruses by the innate immune**
2609 **system.** Nat. Rev. Immunol.11:143–154. 2011.
2610
- 2611 PAOLICELLI, R. C. et al. **Fractalkine regulation of microglial physiology and**
2612 **consequences on the brain and behavior.** Front. Cell. Neurosci. 2014.
2613 Doi:10.3389/fncel.2014.00129.
- 2614 PARKER, L. C.; PRINCE, L. R.; SABROE, I. **Translational Mini-Review Series on**
2615 **Toll-like Receptors: Networks regulated by Toll-like receptors mediate innate and**
2616 **adaptive immunity.** Clin Exp Immunol.147(2):199-207. 2007.
- 2617 PEREZ, S. E. et al. **Análisis restrospectivo de casos con diagnóstico de necrosis**
2618 **cerebrocortical y su relación con herpesvirus bovino tipo 5.** Revista Argentina de
2619 Microbiología. v. 35, p. 69 - 73. 2003.
- 2620 PERITO, M. E. S.; FORTUNATO, J. J. **Marcadores Biológicos da Depressão: Uma**
2621 **revisão sobre a expressão de fatores neurotróficos.** Rev. Neurocienc. 20(4):597-603.
2622 2012.
- 2623 PERRY, V. H.; TEELING, J. **Microglia and macrophages of the central nervous**
2624 **system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic**
2625 **neurodegeneration.** Semin Immunopathol. 2013. Doi: 10.1007/s00281-013-0382-8
2626
- 2627 PRAJEETH, C. K et al. **Regulation of neuroinflammatory properties of glial cells by**
2628 **T cell effector molecules.** Neural Regeneration Research. 2018. P. 234–236.
2629 <https://doi.org/10.4103/1673-5374.226385>.
2630
- 2631 QUEIROZ, R. G. et al. **Cerebrospinal fluid changes in cattle with rabies or with**
2632 **BoHV-5 meningoencephalitis and its correlation with the severity of CNS**
2633 **inflammatory process.** Research in Veterinary Science. 2018.
2634
- 2635 QURESHI, A. et al. **AVPdb: a database of experimentally validated antiviral**
2636 **peptides targeting medically important viruses.** Nucleic Acids Research. Vol. 42,
2637 2014.

- 2638
- 2639 RANSOHOFF, R. M., PERRY, V. H. **Microglial physiology: unique stimuli,**
2640 **specialized responses.** Annu Rev Immunol. 2009. doi:
2641 10.1146/annurev.immunol.021908.132528.
2642
- 2643 RATTRAY, M. **Is there nicotinic modulation of nerve growth factor? Implications**
2644 **for cholinergic therapies in Alzheimer's Disease.** Society of Biological
2645 Psychiatry.v.49, p. 185-193. 2001.
- 2646 REED, L. J., MUENCH, H. American Journal of Epidemiology. In: **A simple method of**
2647 **estimating fifty per cent endpoints.** v. 27. Issue 3. 1938. p. 493–497.
2648 DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408
- 2649 RENSETTI, D. E. et al. **Involvement of toll-like receptors 3 and 7/8 in the**
2650 **neuropathogenesis of bovine herpesvirus types 1 and 5.** Research in Veterinary
2651 Science. v.107. p. 1-7. 2016.
- 2652 RENSETTI, D. E. et al. **Bovine herpesvirus type 5 replication and induction of**
2653 **apoptosis *in vitro* and in the trigeminal ganglion of experimentally-infected cattle.**
2654 *Comp. Im. Microb. and Infect. Disease.* v. 57, p. 8-14. 2018.
- 2655 RIET-CORREA, F. et al. **Meningoencefalite e necrose do córtex cerebral em bovinos**
2656 **causadas por herpesvírus bovino-1.** Pesquisa Veterinária Brasileira.v. 9, p. 13-16. 1989.
- 2657 RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L. **Doenças diagnosticadas pelo Laboratório**
2658 **Regional de Diagnóstico no ano de 1994 e comentários sobre algumas doenças.**
2659 *Boletim do Laboratório Regional de Diagnostico no.15, Pelotas.* 46p. 1995.
- 2660 RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; FERNANDES, C. G. **Enfermidades do sistema**
2661 **nervoso dos ruminantes no sul do Rio Grande do Sul.** *Ciência Rural.* v. 28, p.341-
2662 348. 1998.
- 2663 RIET-CORREA, G. et al. **Meningoencefalite e polioencefalomalacia causadas por**
2664 **Herpesvírus bovino-5 no Estado do Pará.** Pesquisa Veterinária Brasileira. v. 26, n. 1,
2665 p. 44-46. 2006.
- 2666 RISSI, D. R. et al. **Epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões encefálicas**
2667 **em bovinos afetados por meningoencefalite por Herpesvírus bovino 5 (BoHV-5).**
2668 *Pesq. Vet. Bras.* v.26, n.2, Rio de Janeiro. 2006.
- 2669 RISSI, D. R. et al. **Meningoencefalite por herpesvírus bovino tipo 5.** Pesquisa
2670 **Veterinária Brasileira.** v. 27, n. 7, p. 251 – 260. 2007.
- 2671 RISSI, D. R. et al. **Neurological disease in cattle in southern Brazil associated with**
2672 **Bovine herpesvirus infection.** *J. Vet. Diagn. Invest.* 20:346-349. 2008.
- 2673 ROIZMAN, B. et al. **The family Herpesviridae: an update.** *Arch Virol.* 123:425–449,
2674 1992.

- 2675 ROOS, T. B. et al. **Probiotics *Bacillus toyonensis* and *Saccharomyces boulardii***
2676 **improve the vaccine immune response to Bovine herpesvirus type 5 in sheep.** Res
2677 Vet Sci. 2018. P. 260-265. DOI:10.1016/j.rvsc.2017.12.022
- 2678 SALVADOR, S. C. et al. **Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus**
2679 **bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo, Brasil.** Pesquisa Veterinária Brasileira.
2680 v. 18, n. 2, p. 75-82. 1998.
- 2681 SCOTT, I. **The role of mitochondria in the mammalian antiviral defense system.**
2682 Mitochondrion.v.10, p.316-320.Jun/2010.
- 2683 SCHOENEMEYER, A. et al. **The interferon regulatory factor, IRF5, is a central**
2684 **mediator of toll-like receptor 7 signaling.** J Biol Chem. 280(17):17005-12. 2005.
- 2685 SEBBEN, A. D. et al. Efeito de fatores neurotróficos sobre o reparo de nervo periférico.
2686 **Scientia Medica.** v. 21, n.2, p. 81-89. 2011.
- 2687 SHIMIZU, S. The Laboratory Mouse. **In: Routes of Administration.** 2004. p.538.
2688 <http://www.usp.br/bioterio/Artigos/Procedimentos%20experimentais/Routeadministrati>
2689 [on-4.pdf.](http://www.usp.br/bioterio/Artigos/Procedimentos%20experimentais/Routeadministrati)
2690
- 2691 SHISHMANOVA-DOSEVA, M. et al. **Single immobilization stress differentially**
2692 **alters the expression profile of transcripts of the brain-derived neurotrophic factor**
2693 **(BDNF) gene and histone acetylation at its promoters in the rat hippocampus.**
2694 Pharmacol Biochem Behav.v.169, p.1-9. 2018.
- 2695 SILVA, A. M. et al. **Infecção aguda e latente em ovinos inoculados com o herpesvírus**
2696 **bovino tipo 5 (BHV-5).** Pesquisa Veterinária Brasileira. v.18, n.3-4, p.99-106, 1998.
- 2697 SINGH, R. K.; SRIVASTAVA, A.; SINGH, N. **Toll-like receptor signalling: A**
2698 **perspective to develop vaccine against leishmaniasis.** Microbiological Research.v.167,
2699 p.445-451. 2012.
- 2700 SPILKI, F. R. et al. **Neurovirulência e neuroinvasividade de herpesvírus bovinos tipos**
2701 **1 e 5 em coelhos.** Pesq. Vet. Bras. 22:58-63. 2002.
- 2702 STIPURSKY, J. et al. **Neuron-astroglial interactions in cell fate commitment in the**
2703 **central nervous system.** In: ULRICH, A.H. (Org.). Stem Cells: from tools for studying
2704 mechanism of neuronal differentiation towards therapy.Springer.v.1, p.145-164, 2010.
- 2705 STOCK, A. T. et al. **Rapid recruitment and activation of CD8+ T cells after herpes**
2706 **simplex virus type 1 skin infection.** Immunol Cell Biol. P. 143-8. 2011
- 2707 SUJA, M. S. et al. **Role of Apoptosis in Rabies Viral Encephalitis: A Comparative**
2708 **Study in Mice, Canine, and Human Brain with a Review of Literature.** Pathology
2709 Research International. doi:10.4061/2011/374286. 2011.
- 2710 TAKEDA, K.; AKIRA, S. **Toll-like receptors in innate immunity.** Int Immunol.
2711 17(1):1-14. 2005.

- 2712 TYLER, W. J. et al. **From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived**
2713 **neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning.** Learn Mem.v.9,
2714 n.5. 2002.
- 2715 VILELA, M. C. et al. **Role of IL-4 in an experimental model of encephalitis induced**
2716 **by intracranial inoculation of herpes simplex virus-1 (HSV-1).** Arq. Neuro-
2717 Psiquiatria. v.69, n.2^a, São Paulo. 2011.
- 2718 VOGEL, F. S. F. et al. **Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central**
2719 **nervous systems of latently, experimentally infected calves.** Journal of Clinical
2720 **Microbiology.** Washington, v. 41, n. 10, p. 4512-4520. 2003.
- 2721 WHATERHOUSE, E. G.; XU, B. **New insights into the role of brain-derived**
2722 **neurotrophic factor in synaptic plasticity.** Mol Cell Neurosci.v.42. n.2. 2009.
- 2723 WEIKANG, C. et al. **Insulin regulates astrocyte gliotransmission and modulates**
2724 **behavior.** J Clin Invest. 2018.
- 2725 YAN, Q. et al. **Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult**
2726 **rat central nervous system.**Neuroscience.v.78, n.1. 1997.
- 2727 ZOLINI, G. P. et al. **Defense against HSV-1 in a murine model is mediated by iNOS**
2728 **and orchestrated by the activation of TLR2 and TLR9 in trigeminal ganglia.** Journal
2729 of neuroinflammation. vol. 11. 2014. DOI:10.1186/1742-2094-11-20.
- 2730 ZHANG, D. et al. **A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic**
2731 **bacteria.** Science. 303:1522-1526. 2004.
- 2732
- 2733
- 2734