

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**Ativação da Resposta Imune Inata
Mediada por Receptores do Tipo Toll na
Infecção com Vírus Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1)
em Modelo Murino**

por

Guilherme Pimenta de Pádua Zolini

Belo Horizonte
Fevereiro/ 2012

TESE

DBCM - CPqRR

G.P.P. ZOLINI

2012

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**Ativação da Resposta Imune Inata
Mediada por Receptores do Tipo Toll na
Infecção com Vírus Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1)
em Modelo Murino**

por

Guilherme Pimenta de Pádua Zolini

Tese apresentada com vistas à obtenção
do título de Doutor em Ciências na área
de concentração de Biologia Celular e
Molecular.

Orientação: Dr. Marco Antônio da Silva Campos

Coorientação: Dra. Erna Geessien Kroon

Belo Horizonte
Fevereiro/ 2012

Catálogo-na-fonte

Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ

Biblioteca do CPqRR

Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

Z86a **Zolini, Guilherme Pimenta de Pádua.**

2012

Ativação da Resposta Imune Inata Mediada por Receptores do Tipo Toll em Infecção por Vírus Herpes Simplex tipo 1(HSV-1) em Modelo Murino / Guilherme Pimenta de Pádua Zolini. – Belo Horizonte, 2012.

xxiv, 105 f: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 117 - 129

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Herpes Simples/virologia 2. Herpesvirus Humano 1/imunologia 3. Encefalite/virologia 4. Imunidade Inata/imunologia 5. Receptores Toll Like/genética I. Título. II. Campos Marco Antônio da Silva (Orientação). III. Kroon, Erna Geesien (Coorientação).

CDD – 22. ed. – 616.522



Ministerio da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa René Rachou

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Ata da quinquagésima sexta defesa de tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, do aluno Guilherme Pimenta de Pádua Zolini sob a orientação do Dr. Marco Antônio Silva Campos e co-orientação da Dr^a. Erna Geessien Kroon.

Aos vinte e oito dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e doze, às quatorze horas, realizou-se na sala de aula Araxá da Escola de Saúde Pública do Estado de Minas Gerais, o exame da quinquagésima sexta defesa de tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular. A tese do aluno Guilherme Pimenta de Pádua Zolini intitula-se "Ativação da Resposta Imune Inata Mediada por Receptores do Tipo Toll na Infecção com Virus Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1) em modelo murino". A banca examinadora foi constituída pelos professores: Dr. Marco Antônio Silva Campos - CPqRR/FIOCRUZ (orientador/Presidente); Dra. Jaqueline Germano de Oliveira - CPqRR/FIOCRUZ (Titular); Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva - CPqRR/FIOCRUZ (Titular); Dr. Gabriel Magno de Freitas Almeida - UFMG (Titular) e Dra. Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes - UFMG (titular). Após arguir o aluno e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização na apresentação dos dados, a Banca Examinadora assim se pronunciou: De acordo com o regulamento do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, o aluno foi considerado APROVADO. Uma vez encerrado o exame, eu, Marco Antônio Silva Campos, presidente da Banca, assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora. Belo Horizonte, vinte e oito de fevereiro de dois mil e doze.

Dr. Marco Antônio Silva Campos

Dra. Jaqueline Germano de Oliveira

Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva

Dr. Gabriel Magno de Freitas Almeida

Dra. Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes

“TO BE PART OF THE WAVE CAN’T STOP...”
(Can` t Stop – Red Hot Chili Peppers)

DEDICATÓRIA

À Deus, pela realização deste projeto, por toda caminhada,
desafios, vitórias e ensinamentos adquiridos;

À minha família, principalmente meu pai, mãe, irmãos e sobrinhos,
por toda força, apoio e amor a mim dedicados,
em todo e qualquer momento;

Aos que me inspiraram na trajetória da ciência médica e biológica,
meus tios Hécio Ribeiro Pimenta (em memória)
e João de Deus Pimenta;

Respeitosamente aos animais que com suas vidas,
contribuíram para a realização deste projeto.

AGRADECIMENTOS

➤ Órgãos Financiadores:



FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz (PAPES IV / PAPES V);

PAPES IV, processo 400085/2006-2;

PAPES V, processo 403521/2008-4;

CPqRR – Centro de Pesquisa René Rachou;

Ajuda de custo institucional;

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico;

Edital Universal CNPq até 2010, processo 478973/2007-1

Edital Universal CNPq a partir de 2011, processo 472628/2011-9

Produtividade em Pesquisa CNPq até fev 2011, processo 301205/2007-8

Produtividade em Pesquisa CNPq a partir de março 2011, processo 303672/2010-2

FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais;

Edital Universal Fapemig, processo APQ-01603-09

Programa Pesquisador Mineiro, Fapemig, processo Fundep 17653

INCTV – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Vacinas.

INCTV, Fapemig, processo Fundep 14529*3

- À direção e coordenação de pós-graduação do Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR)/ FIOCRUZ;

- Especialmente ao Prof. Dr. Marco Antônio da Silva Campos, pela paciência e orientação, responsabilidade em transmitir conhecimentos e pelo exemplo de conduta como pesquisador e professor;

- À minha coorientadora Dra. Erna Geessien Kroon, pelo apoio, disponibilidade e ajuda sempre que precisávamos;

- Aos professores da banca de qualificação do doutorado, Dr. João Marques pela colaboração, ajuda e esclarecimentos e à Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli, por toda colaboração, ajuda, ensinamentos e amizade;

- À banca que participa da minha defesa de doutorado (Dr. Carlos Eduardo, Dr. Gabriel Magno, Dra. Jaqueline Germano e Dra. Maria Isabel Guedes);

- À colaboradora Dra. Rosa Arantes, que deu suporte de suma importância na parte de histopatologia e os demais integrantes do NIPE, Chris Cartelle, Paloma, Isabel, Ismael, Carol, Daniel, Camila por toda ajuda;

- Ao Dr. Ricardo Gazzinelli que ajudou com sugestões, suporte e também os animais;

- Aos demais pesquisadores do Laboratório de Imunopatologia - LAIM (Dr. Alexandre) e Labvírus/ UFMG (Dr. Jônatas, Dra. Giliane, Dr. Paulo e Dr. Cláudio) pela acolhida e pelos ensinamentos partilhados no dia-a-dia do laboratório;

- À Dra. Isabela, Dra. Fernanda e à plataforma PDTIS de Real Time PCR pelo apoio técnico;

- À Tiza, e à plataforma PDTIS de Citometria pelo apoio técnico;

- À Gra, que com toda paciência, amizade e transmissão de conhecimento me ajudou durante todo meu doutorado; uma companheira de pesquisa fantástica e uma amiga incrível pro resto da vida;

- Aos ICs do grupo, Ruiz, Bráulio, Marcela, Uschi, Mari, Paulinha, Nati e Isa. Fico orgulhoso do caminho que cada um tem construído e estão construindo, e fico feliz por ter contribuído um pouco nessa caminhada. Obrigado pela ajuda e amizade;

- A todo pessoal do LAIM (CPqRR) e Laboratório de Imunoparasitologia – IMPAR (UFMG), Luara, Paula, Bárbara, Babi, Polidoro, Mirinha, Carla Zirke, Rafael Assis, Brunão, Marco Ataíde, Warrison, Humberto, Fred, Carol, Érica, Bruno, Clécia, Carla, Carla N., Maria Helena, Lorena e Marina pela amizade, ajuda e gratificante convivência;

- Em especial a todos os amigos e colegas que conviveram comigo no LAIM 301 (Fernanda, Fabi, Roberta, Samantha, Adriana, Miriam, Ari, Pedrão, Camila, Suelen, Thalita, Ana Paula, Tati e Débora), pelo ótimo convívio, amizade, troca de conhecimentos, risadas e bom humor durante a caminhada do doutorado;

- Aos caríssimos labvirianos (que são tantos que posso me esquecer de alguns, desculpem aí!!!), Jônatas (ainda era aluno quando lá cheguei), Iara, John John, Gabriel, Lara, Aninha, Ana P., Kety, Andréia, Pedro, Danilo, Quelé, Cíntia, Jaque Maria, Lu, Lu Bessa, Lu Garcia, Flavia Gama, Carla, Alice, Mari, Flavinha, Gi, Marcela, Jonas, Felipe, Alê, André, Kátia, Eliseu, Lêle, Tércia, Brunin, Rafael, Fernanda, Léo, André Bahia, Geraldão, Bárbara, Leandro, Rodrigo, Lorena, Poli, Grazi, Breno, tia Ângela, Hilda, Deza, por toda amizade, troca de conhecimento, alegria e momentos de descontração... e salve o boi da manta!!!

- Aos demais amigos de outros laboratórios, Rafinha, Jacque Fiúza, Fernanda (LICM), Laís, Fernanda Freire (LBDM), Juvana (LPCM), Flavinha, Flora (LAMAL), Marcinha (UFV), Pati Corsetti (lab. Sergio Costa), Diana, Ana Paula, Anita (Faculdade de Veterinária da UFMG), etc; pelas conversas, troca de informações e ajuda. Muito obrigado;

- À direção do Biotério do CPqRR, Ana Carolina, Kátia e Fernanda Trima e aos funcionários do Biotério Vera, Thiago, Moisés e Jaci pela ajuda e disponibilidade sempre;

- À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta tese, também pela catalogação e normalização da mesma.

- Aos demais funcionários do CPqRR por toda ajuda, apoio e boa convivência;

- À Prefeitura de Varginha e seu Secretário da Saúde Dr. Fausto Geraldeli Carvalho, meu ex-chefe Dr. Richardson e principalmente ao meu grande amigo Dr. José Eduardo, que com sua ajuda e empenho conseguiu a liberação para que eu pudesse finalizar o doutorado neste último ano, muito obrigado!!!

- E a todos os meus familiares e amigos, especialmente à Carol (em memória), que onde quer que estejam, mesmo distantes, torceram por mim e pelo meu sucesso.

SUMÁRIO

Lista de figuras	xv
Lista de quadros e tabelas	xviii
Lista de abreviaturas e símbolos	xix
Resumo	xxiii
Abstract	xxiv
1 INTRODUÇÃO	25
2 OBJETIVOS	27
2.1 <i>Objetivo Geral</i>	27
2.2 <i>Objetivos Específicos</i>	27
3 REVISÃO DA LITERATURA	29
3.1 <i>Vírus Herpes Simplex 1 (Human herpesvirus 1) e a família Herpesviridae</i>	29
3.2 <i>Estrutura</i>	30
3.3 <i>Ciclo de multiplicação</i>	31
3.4 <i>Expressão gênica</i>	34
3.5 <i>Patogênese e clínica</i>	34
3.6 <i>Epidemiologia</i>	37
3.7 <i>Interações vírus-hospedeiro</i>	39
3.8 <i>Aspectos gerais da imunidade do hospedeiro</i>	40
3.9 <i>PRRs e TLRs</i>	41
3.10 <i>Imunidade na infecção por HSV-1</i>	45
3.11 <i>Modelos animais no estudo do HSV-1</i>	48
4 MATERIAIS E MÉTODOS	52
4.1 <i>Desenho Experimental</i>	52

<i>4.2 Células Vero</i>	53
<i>4.3 Vírus</i>	53
<i>4.4 Multiplicação Viral</i>	53
<i>4.5 Purificação</i>	54
<i>4.6 Titulação por contagem de placas</i>	54
<i>4.7 Animais</i>	54
<i>4.8 Anestesia</i>	55
<i>4.9 Infecção Intranasal</i>	55
<i>4.10 Extração de RNA de tecidos animais</i>	55
<i>4.11 Tratamento de RNAs com DNase</i>	56
<i>4.12 Reação de transcrição reversa (RT-PCR)</i>	56
<i>4.13 PCR em tempo real para transcritos de citocinas/ quimiocinas e TLRs</i>	57
<i>4.14 Coloração por hematoxilina e eosina (HE) e análise histopatológica</i>	59
<i>4.15 Imunofluorescência</i>	59
<i>4.16 Preparação de células e citometria de fluxo</i>	61
<i>4.17 Avaliação da produção de Óxido Nítrico (NO) por reação de Griess</i>	63
<i>4.18 Análises Estatísticas</i>	64
5 RESULTADOS	65
<i>5.1 Cinética de VP-16 e expressão dos mRNAs de TLRs em animais C57BL/6 (WT) e KOs infectados por HSV-1</i>	65
<i>5.2 Curva de sobrevivência dos camundongos</i>	73
<i>5.3 Expressão de citocinas em animais WT e KOs infectados por HSV-1</i>	75
<i>5.4 Histologia e imunofluorescência dos gânglios trigêmeos de animais WT e KOs infectados</i>	77
<i>5.5 Citometria de fluxo dos gânglios trigêmeos e linfonodos de animais WT infectados</i>	83

5.6 Expressão de citocinas nos linfonodos de animais WT e KOs infectados por HSV-1	85
5.7 Expressão de gp91 ^{phox} , p22 ^{phox} e iNOS nos gânglios trigêmeos	87
5.8 Avaliação da produção de óxido nítrico em ensaio “in vitro” pela reação de Griess	88
6 DISCUSSÃO	89
7 CONCLUSÃO	96
8 ANEXOS	98
8.1 Coorientações em trabalhos de conclusão de curso de graduação	98
8.2 Coorientações em iniciação científica	98
8.3 Colaborações	99
8.4 Participação em eventos	100
8.5 MS/ FIOCRUZ/ VPLL/ Comissão de Ética no Uso de Animais: Licença LW-6/ 11	101
8.6 UFMG/ CETEA: Certificado	102
8.7 Artigo publicado: Lima GK, Zolini GP, Mansur DS, Freire Lima BH, Wischhoff U, Astigarraga RG, Dias MF, das Graças Almeida Silva M, Béla SR, do Valle Antonelli LR, Arantes RM, Gazzinelli RT, Báfica A, Kroon EG, Campos MA. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR9 expressed in trigeminal ganglia are critical to viral control during herpes simplex virus 1 infection. <i>Am J Pathol.</i> 2010 Nov;177(5):2433-45. Epub 2010 Sep 23. PubMed PMID: 20864677; PubMed Central PMCID: PMC2966801. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2966801/pdf/JPATH177002433.pdf >. Acesso em: 04 jun. 2012	103
9 REFERÊNCIAS	117

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do HSV-1.	30
Figura 2. Estrutura do genoma de HSV-1.	31
Figura 3. Interações moleculares para fusão do HSV-1.	32
Figura 4. Ciclo de multiplicação do HSV-1.	33
Figura 5. Patogênese de HSV-1.	35
Figura 6. Manifestações Clínicas de HSV-1.	37
Figura 7. TLRs - vias de sinalização.	42
Figura 8. Diversidade de PRRs.	45
Figura 9. Modelo intranasal de infecção por HSV-1.	51
Figura 10. Cinética de VP-16 nos gânglios trigêmeos de camundongos C57BL/6 (WT).	65
Figura 11. Expressão de TLRs em camundongos WT.	66
Figura 12. Expressão de TLR1	67
Figura 13. Expressão de TLR2	68
Figura 14. Expressão de TLR3	69
Figura 15. Expressão de TLR6	70
Figura 16. Expressão de TLR7	71

Figura 17. Expressão de TLR9	72
Figura 18. Painel demonstrativo da interação entre TLRs	73
Figura 19. Sinais clínicos de infecção por HSV-1.	74
Figura 20. As taxas de sobrevivência de camundongos.	75
Figura 21. Expressão de VP-16 viral e quimiocinas e citocinas do hospedeiro.	76
Figura 22. Histologia e imunofluorescência de gânglios trigêmeos de camundongos C57BL/6 WT.	78
Figura 23. Histologia dos gânglios trigêmeos de camundongos C57BL/6 WT e KOs	80
Figura 24. Imunofluorescência de gânglios trigêmeos de camundongos C57BL/6 WT e TLR2/9 KO	82
Figura 25. Aspectos macroscópicos dos linfonodos cervicais superficiais de C57BL/6 WT.	83
Figura 26. “Gates” utilizados para selecionar população de interesse nas amostras.	83
Figura 27. Gânglio trigêmeo (GT) de camundongos C57BL/6 WT infectados com HSV-1 apresentam aumento populacional de macrófagos e aumento de produção de IFN γ pelas células CD8.	84
Figura 28. Linfonodos cervicais superficiais de camundongos C57BL/6 WT infectados com HSV-1 apresentam aumento de produção de IFN γ pelas células NK e pelas CD4 e NK quando estimuladas com PMA	85

Figura 29. Expressão de quimiocinas e citocinas no linfonodo cervical superficial dos animais	86
Figura 30. Expressão de gp91 ^{phox} , p22 ^{phox} e iNOS nos gânglios trigêmeos dos animais	87
Figura 31. Produção de óxido nítrico (NO) em células peritoniais em ensaio de reação de Griess	88
Figura 32. Taxas de sobrevivência de camundongos WT e KOs para TLRs	90
Figura 33. Modelo Proposto	97

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Principais Toll Like Receptors (TLRs) e seus PAMPs.	43
Quadro 2. Iniciadores utilizados na PCR em Tempo Real para citocinas/ quimiocinas e TLRs.	57
Quadro 3. Anticorpos primários utilizados nas imunofluorescências.	60
Tabela 1. Cinética de multiplicação de HSV-1 em órgãos de animais C57BL/6.	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATCC	American Type Culture Collection
APS	Persulfato de amônio
α TIF	Fator trans-indutor alfa
CCL3	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 3</i>
CD4	<i>Cluster of Differentiation 4</i> (correceptor de células de defesa)
CD8	<i>Cluster of Differentiation 8</i> (correceptor de células de defesa)
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal (UFMG)
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais (FIOCRUZ)
CMC	Carboxi-metil-celulose
DAI	<i>DNA-dependent activator of IRFs</i>
DEPC	Dimetil pirocarbonato
dsRNA	RNA de dupla fita
DMEM	Meio Mínimo de Eagle Modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dpi	dias pós-infecção
EDTA	Ácido etileno diamino tetra acético
g	Força gravitacional
G	Guanina
gB	Glicoproteína B
gD	Glicoproteína D
gH	GlicoproteínaH
gL	Glicoproteína L
gp91phox	Citocromo b-245 beta

HSV	Vírus Herpes simplex
HPRT	Hipoxantil ribosil transferase
ICTV	Comitê internacional de taxonomia de vírus
ICP	Proteína da célula infectada
IFN γ	Interferon gama
IL	Interleucina
iNOS	<i>isoenzyme Nitric Oxide Synthases</i>
IP-10	<i>IFN gamma-inducible protein10 (CXCL10)</i>
KO	Nocautes
LAT	Transcrito associado à latência
mRNA	RNA mensageiro
mL	Mililitros
mg	Miligramas
μL	microlitros
mM	milimolar
M	Molar (mol/L)
m.o.i	Multiplicidade de infecção
MEM	Meio mínimo de Eagle
MCP-1	<i>Macrophage chemoattractant protein1(CCL2)</i>
MIP 1 α	<i>Macrophage inflammatory protein 1 alpha(CCL3)</i>
M-MLV RT	Transcriptase reversa do <i>Moloney murine leukemia virus</i>
MDA	<i>Melanoma differentiation-associated</i>
ng	Nanogramas
NK	Células matadoras naturais (natural killer)
NO	Óxido Nítrico

p22phox	Citocromo b-245 alfa
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PAMP	Padrão molecular associado a patógeno
pMoles	Picomoles
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PKR	Proteína quinase dependente de RNA dupla-fita
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PRR	Receptor de reconhecimento de padrões
RAG	<i>recombinase activating gene</i>
RIG	<i>retinoic acid-inducible</i>
RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
rpm	Rotações por minuto
RT	Transcrição reversa
SFB	Soro fetal bovino
ssRNA	Fita simples de RNA
TBE	Tris borato EDTA
TCID₅₀	Dose infectiva para 50% da cultura de tecidos
TEMED	Tetrametiletilenediamina
TG	<i>Trigeminal ganglia</i>
TK	Timidina quinase
TLR	Receptor do tipo toll
Tm	Temperatura de dissociação (melting temperature)

U	Uracila
UL	(Segmento) Único longo
US	(Segmento) Único curto
u.f.p	Unidades Formadoras de placa
VHS	Proteína <i>Virus host shutoff</i>
VP	Proteína do vírion
WT	Wild Type (selvagem)

RESUMO

Este trabalho foi realizado no laboratório de Imunopatologia do Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR) e no Laboratório de Vírus (Labvirus) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os herpesvirus possuem genoma DNA e são envelopados. Aproximadamente 70% dos adultos já tiveram contato com Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1). O HSV-1 causa úlceras ou até mesmo lesões mais graves como encefalite, e após a infecção, o vírus comumente fica latente e pode ser ou não reativado. Células do sistema imune inato, através dos “Receptores do Tipo Toll” (TLRs), reconhecem “padrões moleculares associados a patógenos” (PAMPs) orquestrando a resposta imune contra o vírus. Quando ativados, TLRs iniciam uma cascata de sinalização que culmina na ativação de genes relacionados à defesa imune inata (óxido nítrico-NO, citocinas e quimiocinas). Outros estudos do grupo mostraram que animais nocautes (KO) para TLR9 ou TLR2/9 apresentam alta mortalidade na infecção por HSV-1, ao contrário dos C57BL/6 selvagens (WT) e TLR2KO, que são capazes de controlar o vírus. Objetivamos pesquisar a interrelação na expressão dos TLRs 1, 2, 3, 6, 7 e 9 em animais TLR2 KO, TLR9 KO e TLR2/9 KO infectados por HSV-1 e principais citocinas, células e mecanismos imune celulares contra infecção por HSV-1. No presente trabalho camundongos WT, TLR2KO, TLR9KO e TLR2/9KO foram infectados via intranasal com 10^6 u.f.p. de HSV-1, e seus controles receberam PBS. A eutanásia dos animais foi realizada no 5º dia após infecção (dpi), que previamente já foi demonstrado ser o pico da infecção neste modelo, e então gânglios trigêmeos (TG) e cérebros foram coletados. A expressão de TLRs 1, 2, 3, 6, 7 e 9 foi avaliada por PCR em Tempo Real. Camundongos WT infectados apresentaram diferença significativa na expressão destes TLRs comparados com seus respectivos controles no TG, mas não no cérebro. Nos KOs, houve aumento da expressão dos TLRs tanto nos TGs (mas com níveis mais moderados comparado aos WT) quanto nos cérebros. Também foi avaliada a expressão de gp91^{phox}, p22^{phox} e iNOS. A expressão de iNOS em C57BL/6 WT infectados foi maior que nos outros grupos, mas o mesmo não ocorreu para gp91^{phox}, p22^{phox}. Adicionalmente, foi mensurada a produção de NO por macrófagos intraperitoneais, através da reação de Griess, que demonstrou maior produção por macrófagos WT, comparados aos grupos TLR KOs. Ensaio de histopatologia e imunofluorescência demonstraram maior celularidade nos TGs infectados, além de confirmar a presença de CD8, macrófagos, e aumento da produção de iNOS nos C57BL/6 WT infectados, o que não ocorreu com os camundongos TLRs KO. Em ensaio de sobrevivência com C57BL/6 WT, CCL3 KO, CD8 KO, RAG KO e iNOS KO a importância das células T e do iNOS foi confirmada, uma vez que CD8 KO, RAG KO e iNOS KO tiveram 0% de sobrevivida. Camundongos C57BL/6 WT, RAG KO, CCL3 KO e iNOS KO tiveram seus TGs analisados por PCR em tempo real para verificar a expressão do gene viral VP-16 e MCP-1, iNOS, IP-10, Rantes e TNF- α no 5º dpi. Estes dados indicaram a relevância de iNOS e das células T na resposta inata contra o HSV-1, uma vez que os RAG KO foram irresponsivos à expressão das citocinas, enquanto os iNOS KO apresentaram uma resposta exacerbada das mesmas. Ensaio de citometria indicou que IFN γ produzido pelas células T CD8, nos TGs, e produzido pelas células T CD4 e *Natural Killer* (NK), nos linfonodos regionais, são um possível mecanismo de controle contra a infecção de HSV-1 dos animais WT infectados. Hipotetizamos que a expressão coordenada de TLRs reflete na orquestração eficiente do sistema imune inato, através da produção equilibrada de quimiocinas e citocinas e da atividade imune celular adequada, com produção de NO por macrófagos e ação de células T CD8, T CD4 e NK controlando a infecção por HSV-1.

ABSTRACT

This work was carried out in the Immunopathology laboratory of the Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR) and Virus laboratory (Labvirus) of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Herpes viruses have DNA genome and are enveloped. Approximately 70% of adult people have had contact with the Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1). After infection, HSV-1 cause cold sores, or more serious injuries such as encephalitis, and after infection, the virus usually become latent and may be reactivated or not. Cells of innate immune system recognize the “pathogen associated molecular patterns” (PAMPs) through “Toll Like Receptors” (TLRs), orchestrating the immune response against the virus. When activated, TLRs start a signalization cascade that culminates in the activation of genes related to the innate immune defense (NO, cytokines and chemokines). Previous research from our group demonstrated that knockout (KO) mice to TLR9 and TLR2/9 showed high mortality after HSV-1 infection, unlike C57BL/6 wild type (WT) and TLR2KO, which were able to control the virus. Research aimed in interrelation of the expression of TLRs 1, 2, 3, 6, 7 and 9 in TLR2 KO, TLR9 KO and TLR2 / 9 KO mice infected with HSV-1 and the main cytokines, cells and cellular immune mechanisms against infection by HSV-1. In this work, TLR2KO, TLR9KO, TLR2/9KO and C57BL/6 WT mice were intranasally infected with 10^6 p.f.u. of HSV-1, and their respective controls received PBS. Mice euthanasia was at the 5th day post infection (dpi), previously showed to be the viral multiplication peak in our model, and then trigeminal ganglia (TG) and brain were collected. The expression of TLRs 1, 2, 3, 6, 7 and 9 were measured by Real Time PCR. Infected WT mice showed significant increase in the expression of these TLRs compared to respective controls in TG, but not in brain. KOs mice had increased expression of TLRs in TG (but in more moderated levels compared to WT) and in the brains. The expression of gp91^{phox}, p22^{phox} and iNOS were also measured. iNOS expression in infected C57BL/6 WT was higher than in other groups, that not occurs to gp91^{phox}, p22^{phox}. In addition, NO production by intraperitoneal macrophages was measured through Griess reaction, that demonstrated a more pronounced production by WT macrophages, compared to TLR KOs groups. Histopathology and immunofluorescence assays demonstrated higher cellularity in infected TG, and besides confirmed the CD8 and macrophages presence and increase of iNOS production in infected C57BL/6 WT, what did not occurred with TLR KO mice. In survival assay with C57BL/6 WT, CCL3 KO, CD8 KO, RAG KO and iNOS KO, we showed the importance of the T cells and iNOS, because CD8 KO, RAG KO and iNOS KO had 0% of survival. C57BL/6 WT, RAG KO, CCL3 KO and iNOS KO mice had their TG analyzed by Real Time PCR, to verify the expression of viral gene VP-16 and MCP-1, iNOS, IP-10, Rantes and TNF- α in 5th dpi. These data show us that iNOS and T cells are important in innate responses against HSV-1, once RAG KO were irresponsive to cytokines expression, while iNOS KO showed an excessive response to cytokines expression. The cytometry assay indicated that IFN γ produced by T CD8 cells, in the TG, and by T CD4 and Natural Killer cells (NK), in region lymph nodes, are a possible mechanism to control HSV-1 infection of WT infected mice. We hypothesize that coordinated expression of TLRs leads to an efficient orchestration of the innate immunity system, through cytokines and chemokines stable production and proper cellular immune activity, with NO production by macrophages and T CD8, T CD4 e NK cells action controlling HSV-1 infection.

1 INTRODUÇÃO

Os herpesvírus são vírus grandes (100-200 nm) compostos de quatro elementos: cerne, tegumento, capsídeo e envelope. Os herpesvírus possuem uma fita dupla de DNA variando de 120 a 230 Kpb, que codifica 84 proteínas. Aproximadamente 70% das pessoas já tiveram contato com o Herpes simplex vírus tipo 1 (HSV-1). HSV-1 é o agente etiológico de herpes labial, herpes cutâneo, lesões oftalmológicas, ceratite, cerato-conjuntivite, e nos imunossuprimidos podem ocorrer lesões sérias oculares, e também lesões no sistema nervoso central e até mesmo infecções sistêmicas. Além disso, há o fenômeno de latência e recorrência, com os vírus ficando latentes em um determinado gânglio, por exemplo, no nervo trigêmio ⁽¹⁾.

A resposta imune a patógenos microbianos é baseada em componentes do sistema imune inato e adaptativo. A resposta imediata inata é largamente mediada por leucócitos, tais como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, as quais são células que fagocitam e matam os patógenos e que, concomitantemente, coordenam respostas adicionais com a consequente síntese de uma ampla variedade de mediadores inflamatórios e citocinas. Receptores “Toll-like” (TLRs) têm sido identificados como receptores que conferem especificidade ao sistema imune inato, permitindo o reconhecimento de ‘Padrões Moleculares Associados a Patógenos’ (PAMPs), incluindo moléculas de microrganismos (bactérias, protozoários, fungos e vírus). Após a ativação por PAMPs, a maioria dos TLRs recruta a proteína MyD88, ativando vários genes relacionados à defesa imune inata (NO, citocinas e quimiocinas)^(2; 3). Pesquisadores demonstraram que o DNA de HSV-2 é reconhecido por TLR9 ⁽⁴⁾. Outro grupo demonstrou que TLR2 faz a mediação da indução de citocinas em resposta à inoculação intravenosa de HSV-1 em camundongos, e em camundongos TLR2 nocaute (KO) foi detectada uma redução nos sintomas de encefalite após este tipo de inoculação ⁽⁵⁾. Entretanto, nosso grupo demonstrou que o HSV-1 ativa a resposta imune através de TLR2, que funciona como heterodímero junto a TLR1 ou TLR6, mas não é capaz de ativar imunidade através do TLR4 ⁽⁶⁾.

Como o HSV-1 é um vírus complexo, codificando 84 proteínas, é esperado que os TLRs reconheçam diferentes componentes do vírus, como ocorre com as bactérias, com diferentes moléculas ativando mais do que um tipo de TLR. Conseqüentemente, o início da resposta imune é mediada possivelmente também por diferentes tipos de células de defesa.

O aumento no número de indivíduos portadores de doenças imunossupressoras, como a AIDS, ou mesmo de pessoas submetidas a tratamentos que sejam imunossupressores propiciam o aparecimento de infecções graves causadas pelo HSV-1, sendo a pior delas a encefalite, que pode levar à morte. Por isso torna-se relevante as informações obtidas sobre a imunidade do organismo em um modelo de encefalite herpética.

Neste projeto, mais especificamente, buscamos elucidar algumas questões abordando o comportamento da imunidade inata e celular nesta infecção viral em modelo experimental murino. Tais estudos são fundamentais para o desenvolvimento de novas estratégias de combate ao vírus, e elaboração de tratamento cada vez mais adequado das pessoas afetadas por doenças causadas por este agente etiológico.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo Geral*

Caracterizar a resposta imune inata contra o HSV-1, em modelo murino, avaliando sua ativação mediada por Receptores do Tipo Toll (TLRs) na infecção com Vírus Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1), verificando expressão de diferentes TLRs e pesquisando principais citocinas e tipos celulares no controle da infecção.

2.2 *Objetivos Específicos*

Verificar a interrelação na expressão de TLRs (1, 2, 3, 6, 7 e 9) no cérebro e gânglio trigêmeo de camundongos selvagens (WT) ou nocautes (KOs) para TLRs (TLR2, TLR9, TLR2/9) infectados por HSV-1, no 5º dia após infecção (dpi), se na ausência de um determinado TLR, outro(s) TLR(s) varia(m) sua expressão.

Pesquisar curva de sobrevivência para camundongos WT, CCL3 (MIP-1 α) KO, iNOS KO, CD8 KO e RAG KO para indicação de tipos celulares envolvidos na defesa contra HSV-1.

Pesquisar a expressão em nível da transcrição de VP-16, MCP-1, iNOS, IP-10, Rantes e TNF- α , no gânglio trigêmeo de camundongos WT, CCL3 (MIP-1 α) KO, iNOS KO e RAG KO, no 5º dpi, para indicação de tipos celulares envolvidos na defesa contra HSV-1.

Analisar a relação da expressão de VP-16, MCP-1, iNOS, IP-10, Rantes e TNF- α nos camundongos WT, CCL3 (MIP-1 α) KO, iNOS KO e RAG KO com a curva de sobrevivência.

Realizar histopatologia e imunofluorescência de gânglio trigêmeo dos camundongos WT e KOs, no 5º dpi, e caracterizar lesão causada pela infecção por HSV-1, além de identificar e relacionar as principais células à enzima alvo pesquisada.

Verificar por citometria de fluxo os tipos celulares mais importantes no gânglio trigêmeo e linfonodo cervical superficial para a resposta imune após infecção por HSV-1 e relacionar as principais células à citocina alvo pesquisada.

Pesquisar no linfonodo cervical superficial a expressão transcricional de IFN γ , IL1-beta, IL-12, IP-10 e MCP-1 de camundongos WT e KOs para TLRs (2, 9 e 2/9) durante infecção por HSV-1.

Verificar pela expressão de iNOS, gp91 *phox* e p22 *phox* em gânglio trigêmeo, no 5º dpi, se a produção de ROS (Espécies Reativas de Oxigênio) e RNS (Espécies Reativas de Nitrogênio) são importantes mecanismos de defesa inata contra este modelo de infecção.

Avaliar produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais de camundongos WT e KOs para TLRs (2, 9 e 2/9), através do ensaio *in vitro* de Reação de Griess.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Vírus Herpes Simplex 1 (*Human herpesvirus 1*) e a família *Herpesviridae*

A nomenclatura oficial estabelecida pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) denomina o vírus herpes simplex 1 (HSV-1) como *Human herpesvirus 1* (HHV-1). No entanto, a comunidade científica internacional utiliza o nome Herpes simplex vírus 1 (HSV-1), razão pela qual usaremos este nome em nosso trabalho. O HSV-1 é integrante da família *Herpesviridae*, dentro da subfamília *Alphaherpesvirinae* e do gênero *Simplexvirus* ⁽⁷⁾.

Recentemente, a antiga família *Herpesviridae* foi revisada pelo ICTV, e dividida em três novas famílias, que foram incorporadas na ordem *Herpesvirales* ⁽⁸⁾. As novas famílias incluem *Herpesviridae* (que contém vírus de mamíferos, aves, e répteis), *Alloherpesviridae* (que contém vírus de peixes e anfíbios) e *Malacoherpesviridae* (que contém vírus de bivalves). Os herpesvírus são bastante disseminados na natureza, sendo que a maioria das espécies animais alberga ao menos uma espécie de herpesvírus, e alguns podem infectar mais de uma espécie, e provavelmente o número de espécies do grupo excede as 200 identificadas até o momento ⁽¹⁾.

Oito herpesvírus já foram isolados de humanos ⁽⁷⁾. Eles incluem os vírus do herpes labial e genital (HHV 1 e 2, respectivamente), gênero *Simplexvirus*; e do varicela-zóster (HHV 3), gênero *Varicellovirus*, na subfamília *Alphaherpesvirinae*; o vírus Epstein-Barr (HHV 4), gênero *Lymphocryptovirus*, e vírus do sarcoma de Kaposi (HHV 8), gênero *Rhadnovirus*, na subfamília *Gammaherpesvirinae*; e o citomegalovírus (HHV 5), gênero *Cytomegalovirus*, e os vírus do exantema súbito infantil (HHV 6 e 7), gênero *Roseolovirus*, na subfamília *Betaherpesvirinae*. Os membros da subfamília *Alphaherpesvirinae*, inclusive o HSV-1, apresentam ciclo de multiplicação relativamente curto, rápida disseminação em cultura de tecidos, destruição eficiente das células infectadas e capacidade de estabelecer latência, especialmente em gânglios nervosos ^(1;8).

3.2 Estrutura

O HSV-1 consiste de quatro componentes (Figura 1): um cerne elétron-denso contendo o DNA viral, um capsídeo icosaédrico, uma camada amorfa de proteínas denominada tegumento que separa o capsídeo da camada mais externa composto ao menos por 20 proteínas virais, e um envelope constituído por uma bicamada lipídica com aproximadamente 11 diferentes glicoproteínas virais embutido nele ^(9; 10; 11). O diâmetro do vírus varia entre 120 e 200 nm ⁽⁷⁾.

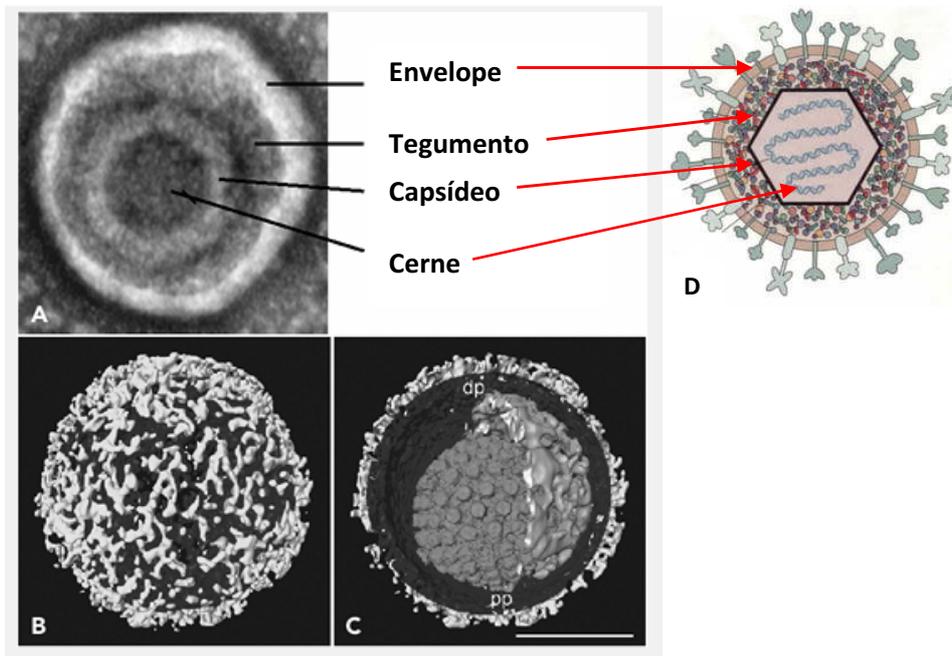


Figura 1 - Estrutura do HSV-1. Microscopia eletrônica mostrando vírus HSV-1 e suas estruturas (A), imagem superficial do HSV-1 com tomografia crioelétrica (B) imagem em corte do HSV-1 com tomografia crioelétrica evidenciando as estruturas (C) e desenho esquemático mostrando a estrutura do vírus (D). As setas indicam o envelope, o tegumento, o capsídeo e o cerne onde encontra-se o DNA viral. Fonte: ROIZMAN, B. *et al*, 2007; e www.tulane.edu (modificados).

O genoma viral é composto de DNA linear, de fita dupla, e contém aproximadamente 152 Kpb, com proporção G+C de 68%. Consiste de dois segmentos covalentemente ligados (Figura 2), designados como L (longo) e S (curto). Cada segmento é composto de sequências únicas (UL, US) flanqueadas por repetições invertidas relativamente grandes. Pelo menos 84 glicoproteínas são codificadas pelo genoma viral ⁽¹¹⁾.

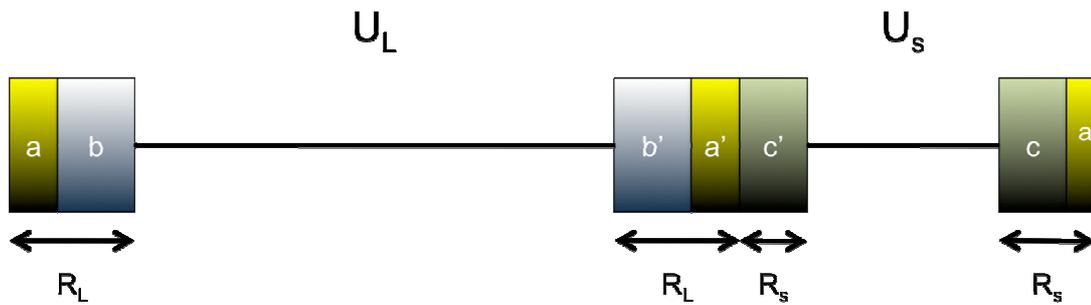


Figura 2 – Estrutura do genoma de HSV-1. Cada molécula de DNA é formada por dois segmentos covalentemente ligados, um longo (L) e um curto (S). Cada um destes segmentos é composto de seqüências únicas (UL e US) flanqueadas por repetições invertidas (caixas). As repetições do segmento longo são designadas com *ab* e *a'b'*; e as do segmento curto como *a'c'* e *ca*. O número de repetições pode ser variado. Fonte: ROIZMAN *et al*, 2007 (modificado).

O capsídeo possui entre 100 e 110 nm de diâmetro, e é formado por 162 capsômeros, em simetria icosaédrica ⁽⁷⁾. É composto por quatro proteínas virais estruturais, VP5 (U_L19), VP26 (U_L35), VP23 (U_L18) e VP19C (U_L38) ^(11; 12).

O tegumento é uma estrutura amorfa, presente entre o capsídeo e o envelope. Às vezes, ocupa posição excêntrica ⁽¹³⁾. O envelope é a camada externa do vírus, sendo formado por lipídeos, proteínas e glicoproteínas, com uma aparência tipicamente trilaminar. É derivado de regiões alteradas das membranas das células ^(11; 14).

3.3 Ciclo de multiplicação

A infecção se inicia com a adsorção do vírus à célula hospedeira (Figura 3), através da interação das glicoproteínas gB e gC virais com regiões ricas em glicosaminoglicanas do heparan sulfato celular ^(9; 15; 16). Outros receptores, ainda não-descritos, podem ser utilizados na interação de gB com a superfície celular. A glicoproteína D viral, também interage com receptores celulares para mediar a entrada do vírus: HVEM (*Herpesvirus entry mediator* – membro da família de receptores de TNF), nectina-1 (membro da superfamília das imunoglobulinas) ou heparan sulfato 3-O-sulfatado podem ser utilizados, sendo provável que o receptor alvo varie conforme o tipo celular a ser infectado. Em seguida, ocorre a fusão do envelope viral com a membrana plasmática da célula hospedeira, passo mediado pelas glicoproteínas gB, gH e gL em interação com gD ^(9; 15; 16).

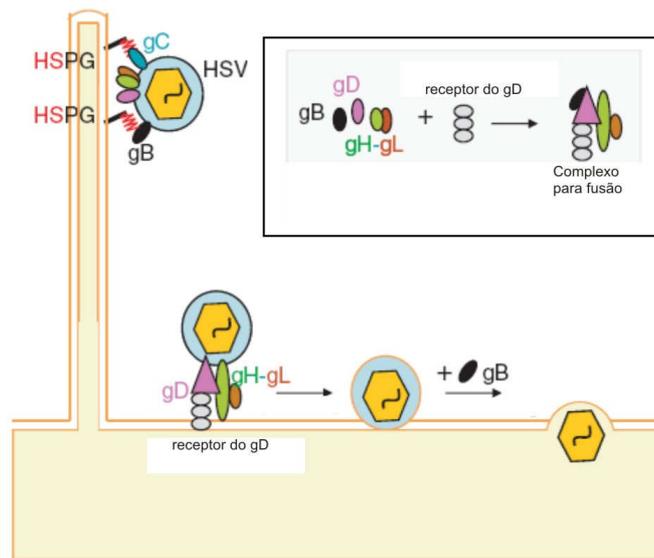


Figura 3 – Interações moleculares para fusão do HSV-1. Fixação inicial às células é mediada pelas glicoproteínas gC e /ou gB. Interação entre gD, gH-GL e um receptor de gD parece ser suficiente para produzir mudanças conformacionais no gD e provocar fusão das membranas viral e celular. No entanto, uma quarta glicoproteína, a gB, também é necessária para a fusão completa, que resulta na liberação do tegumento e nucleocapsídeo no citoplasma. Fonte: AKHTAR & SHUKLA, 2009 (modificado)

Outros trabalhos descrevem vias alternativas para a penetração do vírus na célula, realizados por endocitose mediada por um mecanismo pH dependente ^(17; 18).

Após a peptídeofusão (Figura 4), algumas proteínas do tegumento permanecem no citoplasma como a *virus host shutoff protein* – ou VHS, que inibe a tradução de mRNAs da célula hospedeira, enquanto outras são transportadas para o núcleo (como VP16/alfaTIF, que regula a transcrição dos genes α), e outras, ainda, permanecem associadas ao capsídeo. Por meio do sistema de microtúbulos, o capsídeo então é transportado até o núcleo, onde o DNA viral é liberado no núcleo através de seus poros ^(13; 19; 20).

No núcleo, o DNA viral rapidamente se circulariza, mesmo na ausência de síntese proteica viral ^(21; 22). A partir de então, inicia-se a transcrição deste DNA, mediada pela RNA polimerase II do hospedeiro, e a síntese das proteínas correspondentes no citoplasma ⁽¹¹⁾.

Os primeiros genes expressos são conhecidos como imediatamente precoces, ou genes α . Estes genes codificam proteínas relacionadas à regulação gênica da próxima etapa da transcrição, e têm sua própria transcrição estimulada por uma proteína que o vírus carrega em seu tegumento, a VP16/ alfa TIF (*alfa gene trans-inducing factor*) conjuntamente com a

proteína Oct-1 (*cellular octamer DNA-binding protein*)^(11, 13; 21; 23). O máximo da síntese das α -proteínas ocorre entre 2 e 4 horas após a infecção da célula⁽²¹⁾.

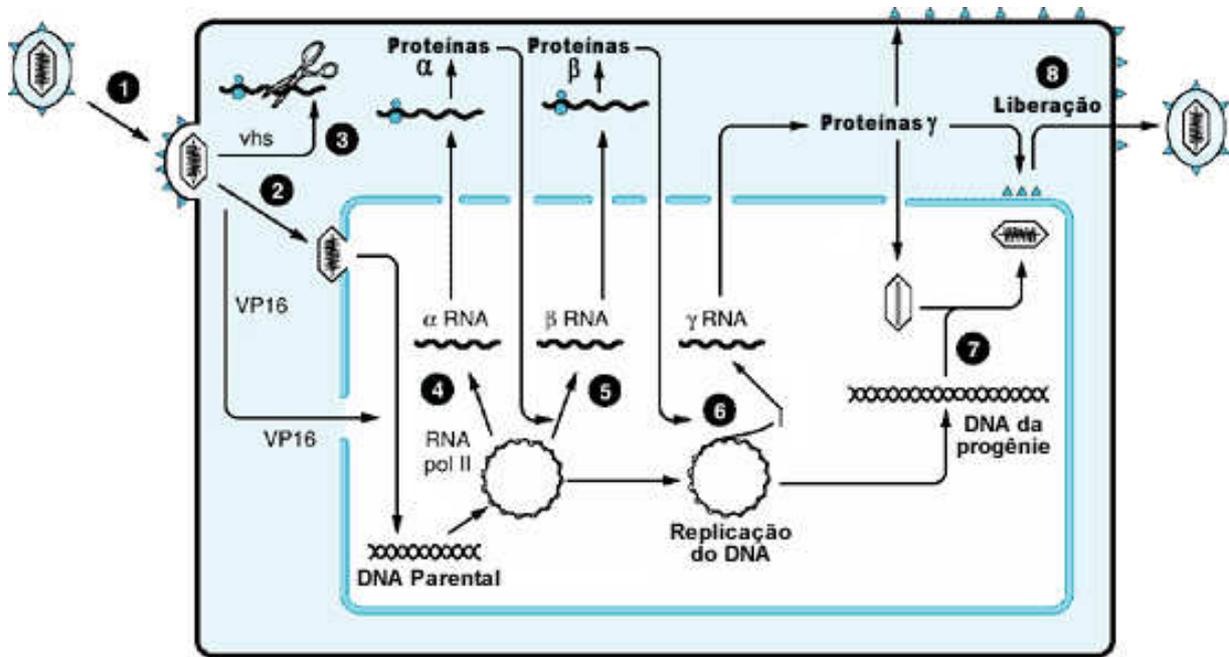


Figura 4 – Ciclo de multiplicação do HSV-1. 1) Fusão do envelope viral com a membrana plasmática, liberando o capsídeo no citoplasma. 2) Entrada do capsídeo pelos poros nucleares e liberação de VP-16. 3) Liberação da proteína VHS. 4) Transcrição dos genes α . 5) Transcrição dos genes β . 6) Replicação do DNA e expressão dos genes γ . 7) Encapsidação do DNA. 8) Liberação das novas partículas por brotamento. Fonte: ROIZMAN *et al.*, 2007. (modificado).

Começa então uma nova etapa de transcrição, responsável pela síntese das proteínas β (ou precoces) que estão ligadas ao metabolismo de ácidos nucleicos e ao início da replicação do DNA viral. O pico da síntese dessas proteínas ocorre entre 5 a 7 horas após a infecção⁽²¹⁾.

Após a síntese dos genes β inicia-se a transcrição e tradução dos genes γ (ou tardios), que codificam componentes estruturais do HSV-1. Os capsídeos então são montados nesta fase, primeiramente um pré capsídeo contendo um “esqueleto” interno, que quando o DNA viral é inserido ao capsídeo, este esqueleto é perdido. Após esta etapa da montagem viral ser concluída, a liberação do vírus é a próxima etapa que ocorre após o envelopamento do capsídeo que acontece durante este processo. Os modelos supostos de como isto ocorre são: modelo de duplo envelopamento; modelo nuclear de simples envelopamento e modelo citoplasmático de simples envelopamento. Todos culminando na liberação do vírus já maduro na superfície da célula⁽¹¹⁾. O processo completo de multiplicação dura entre 18 e 20 horas⁽²⁴⁾.

3.4 Expressão gênica

Pelo menos duas séries de eventos ocorrem nos primeiros minutos após a entrada do HSV em uma célula. A primeira série, composta pela ativação da sinalização de cálcio (menos bem entendido), a ativação do NF- κ B (fator nuclear-kappa B), e a indução da via do IFN. A ativação do NF- κ B no início da infecção é um evento transitório; NF- κ B é ativado novamente, mais tarde na infecção. A indução da via IFN, pela ativação dos genes que codificam IFN, foi detectada após a exposição das células ao vírus irradiado por UV e foi rapidamente desativada e pode mesmo não resultar da infecção mas sim da exposição ao vírus, mesmo inativado. Um evento adicional, também independente da síntese *de novo* dos produtos do gene viral é a degradação do mRNA pela proteína VHS.

A segunda série de eventos ocorre após a entrada do DNA viral no núcleo e é resultado da infecção. Por um lado, algumas proteínas celulares com afinidade pelo DNA tentam silenciá-lo. Por outro lado, ativadores transcricionais tentam ativar a expressão desses genes. Este resultado é criado por algumas proteínas virais ⁽¹¹⁾.

Em geral, os promotores dos genes α contêm numerosas regiões de ligação para fatores de transcrição celulares, nas seqüências que antecedem o TATA *box*. Os promotores dos genes β contêm sítios de ligação para dois ou três fatores de transcrição celulares, antes do local de início da transcrição, enquanto os promotores dos genes γ possuem apenas um ou dois sítios, após o TATA *box* ⁽²⁵⁾.

3.5 Patogênese e clínica

A patogênese em humanos depende do contato pessoal íntimo de um indivíduo susceptível com alguém que esteja eliminando o vírus ⁽¹¹⁾. Após a infecção primária, geralmente na mucosa oral, ocorre a primeira multiplicação do vírus nesse local e posterior infecção das terminações nervosas deste tecido, e o vírus então é transportado para os gânglios nervosos, através de fluxo axonal retrógrado (Figura 5). O gânglio trigêmeo torna-se colonizado e passa a abrigar o DNA do vírus latente ^(12; 23). A infecção sistêmica é rara. Este evento, apesar de incomum, pode ocorrer principalmente em infecções neonatais e em pacientes imunodeprimidos ⁽²⁶⁾. Recorrências ocorrem quando o vírus latente é reativado, sendo transportado, mais comumente, por fluxo axonal anterógrado até a região da infecção primária ^(27; 28). Mas em alguns casos, principalmente em pacientes imunossuprimidos, o

HSV-1 pode ser reativado e direcionar-se ao sistema nervoso central causando assim um quadro de encefalite ⁽²⁹⁾. A reativação está normalmente associada a fatores como estresse, variações hormonais, exposição à luz ultravioleta e imunossupressão ^(30, 31). Entretanto, pesquisa utilizando modelos matemáticos demonstrou que o HSV-2 é constantemente liberado dos neurônios em pequenas quantidades, ativando desta forma o sistema imune para que a multiplicação viral seja interrompida, e que devido esse equilíbrio não ocorre reativação da doença, refutando assim a teoria de latência ⁽³²⁾.

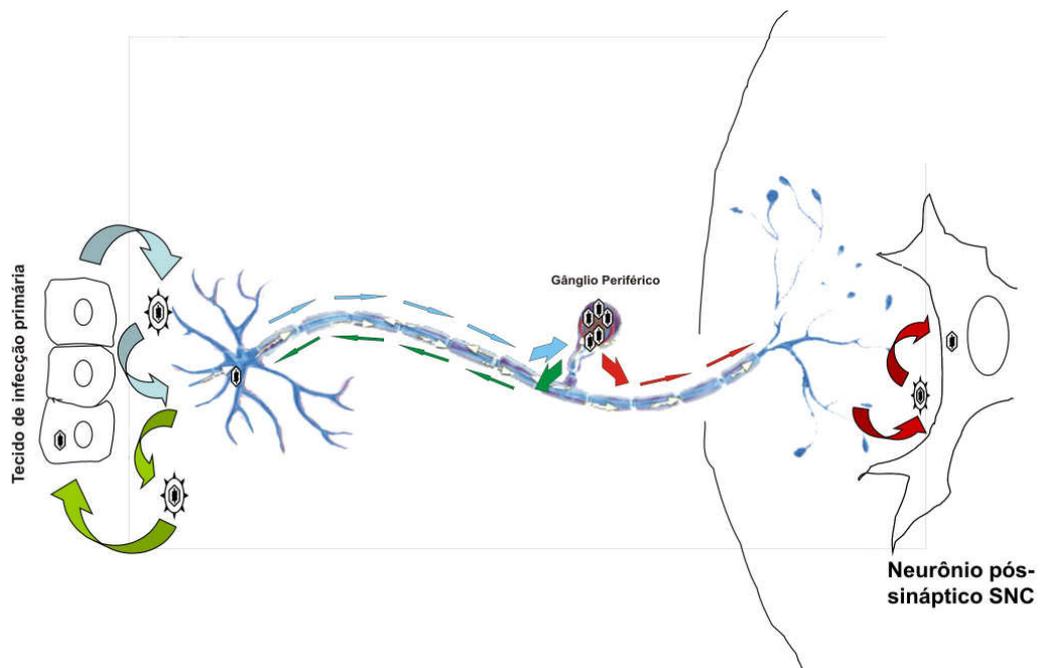


Figura 5 – Patogênese de HSV-1. O sítio primário de infecção ocorre nas células epiteliais, com infecção produtiva. As partículas são levadas por transporte retrógrado através de axônios até os gânglios sensoriais, sítios secundários da infecção e local de latência (**setas azuis**). Eventualmente, pode ocorrer a reativação, e o vírus é conduzido por transporte anterógrado até às células epiteliais (**setas verdes**), onde novamente há infecção produtiva. Pode também ocorrer reativação e condução do vírus ao sistema nervoso central, que ocorre mais raramente (**setas vermelhas**).

Infecção primária de HSV-1 em crianças são assintomáticas ou após um período de incubação de cerca de uma semana dão origem a erupções vesiculares mucocutâneas. A gengivoestomatite herpética tipicamente afeta a língua, lábios, gengivas, mucosa oral e do palato duro e mole. A infecção por HSV-1 recorrente dentro da boca é incomum em pacientes saudáveis, mas em pacientes imunocomprometidos, a infecção recorrente pode ser mais extensa e/ ou agressiva. As modificações patológicas provocadas pela multiplicação do HSV-1 representam uma combinação da morte celular mediada pelo vírus e da resposta inflamatória associada. A histopatologia da lesão na pele inclui o aumento de tamanho das células infectadas e o aparecimento de cromatina condensada nos núcleos, seguidas da degeneração do núcleo celular ^(11; 12). A patologia é similar, tanto para a infecção primária

quanto para as recorrências, variando a extensão da citopatologia. A intensidade da resposta inflamatória é significativamente menor na doença recorrente ⁽¹¹⁾.

O período de incubação varia de 1 a 26 dias para a doença primária. O início da fase aguda é abrupto, e a sintomatologia clínica da infecção primária por HSV-1 é variável, podendo incluir febre, calafrios, náuseas, anorexia, irritabilidade, mal-estar, linfadenite submandibular e dor de cabeça. Estas entidades patológicas variam do inócuo herpes labial a meningoencefalite fatal ⁽³³⁾. A infecção assintomática é a regra, e não a exceção ^(34; 35).

A recorrência das lesões orolabiais (*herpes labialis*) (Figura 6), forma mais comum da doença, é precedida por um período prodrômico de dor, queimação, coceira ou formigamento, que geralmente dura menos de 6 horas, seguido pela formação de vesículas em 24 a 48 horas. As vesículas evoluem para pústulas ou úlceras, que formarão uma crosta entre 72 e 96 horas. A dor é mais intensa no início das manifestações clínicas. A cura geralmente se completa espontaneamente entre 8 e 10 dias ⁽¹¹⁾. Existe, além desta, um grande espectro de doenças causadas por HSV-1 (Figura 6): infecção neonatal e congênita, eczema herpeticum, HSV-1 visceral em imunocomprometidos, encefalites, eritema multiforme, infecção das pálpebras, conjuntiva, córnea e de retina, e extensas lesões durante a quimioterapia ^(35; 36). Até mesmo infecções genitais por HSV-1 têm aumentado nos últimos anos ⁽³⁷⁾, e isso também é refletido em um aumento na incidência de herpes neonatal ^(36; 36).

O HSV-1 ocular é a maior causa de lesões da córnea e perda da visão nos EUA, como resultado da lesão causada pela sinergia do efeito citopático provocado pelo vírus e a atividade da resposta imune contra o agente no local da infecção ^(34; 35; 36).

A encefalite causada por HSV-1 é uma manifestação clínica da infecção que representa uma grande ameaça à vida do indivíduo acometido. Em neonatos, ela ocorre em 35% dos bebês com herpes, e a lesão neurológica progressiva é reconhecida como uma seqüela à encefalite por herpes simplex. Postula-se que isso ocorra como resultado da acumulação de danos causados por reativações frequentes do HSV-1 no cérebro. ⁽³⁴⁾. A encefalite pelo HSV-1 tem uma predileção pelos lobos frontal e temporal, mas ocasionalmente afeta o tronco cerebral ⁽³⁸⁾.

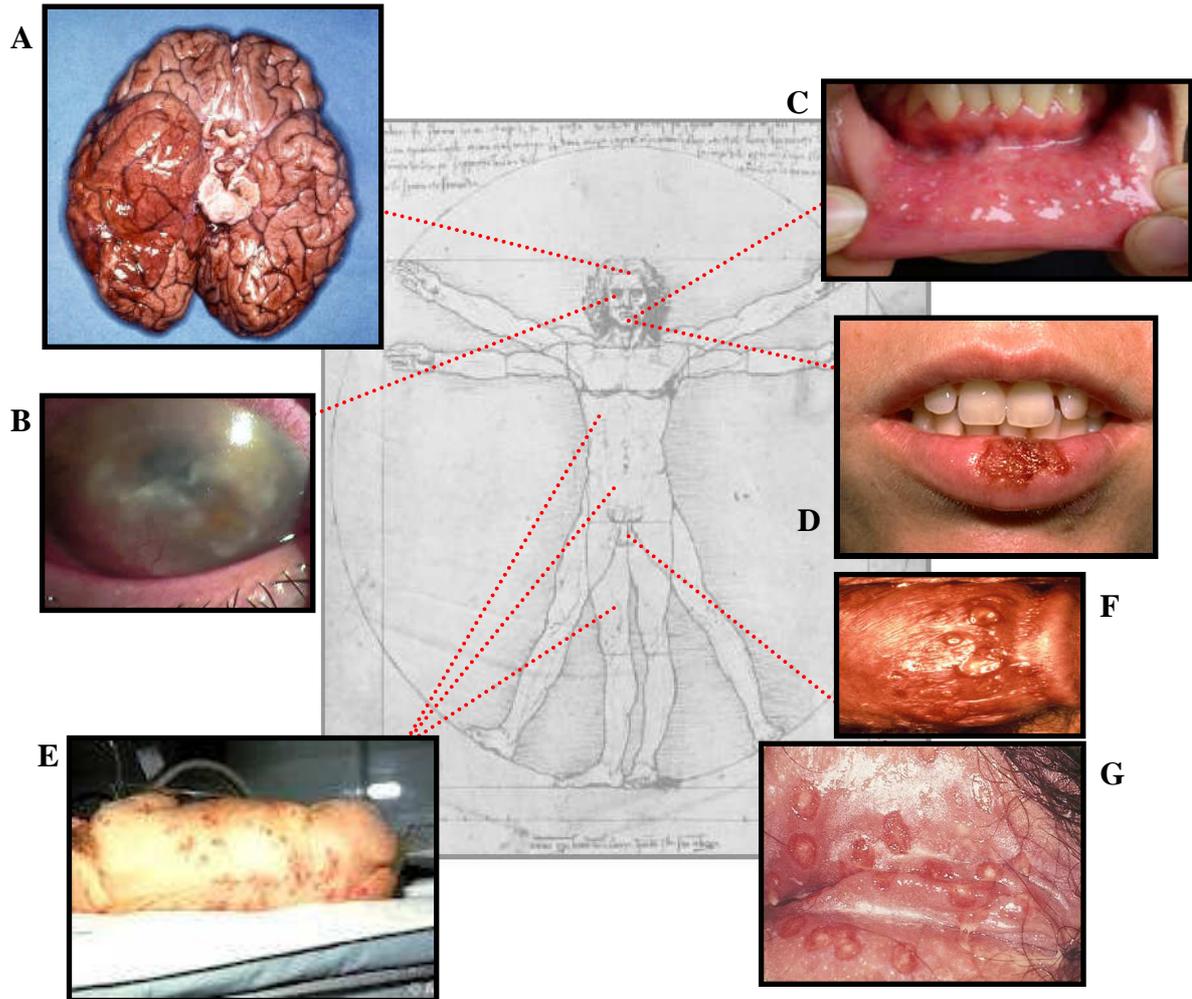


Figura 6 – Manifestações Clínicas de HSV-1. As manifestações clínicas da infecção por HSV-1 podem ser bastante diversas. Em **A**, cérebro acometido por encefalite. Em **B**, olho com ceratite herpética. Em **C**, criança com gengivostomatite. Em **D**, recorrência labial. **E** demonstra acometimento sistêmico em neonato. **F** e **G**, herpes genital acometendo o pênis e a vulva, respectivamente. Fonte: WHITLEY, 2001 (modificado).

Alguns grupos tem postulado a importância da infecção do HSV-1 no cérebro para a evolução da doença de Alzheimer. Seja atuando em combinação com um fator genético - o alelo 4 do gene da apolipoproteína, um fator de susceptibilidade já conhecido ⁽³⁹⁾ ou mesmo, devido a infecções periféricas causando aceleração da neurodegeneração do cérebro por meio de células da microglia já primadas ⁽⁴⁰⁾.

3.6 Epidemiologia

O HSV-1 está entre as infecções virais humanas mais comuns. Em todo o mundo ele é frequentemente transmitido horizontalmente durante a infância, apesar de dados demonstrarem aumento significativo da soroprevalência do HSV-1 em ambos os sexos na

adolescência, quando comparado aos índices da infância, inclusive no Brasil ⁽⁴¹⁾. Análise dos norte-americanos pelo *National Health and Nutrition Examination Survey* revelou a soroprevalência de HSV-1 de 65% na faixa etária de 49 anos ^(42; 43). O HSV-1 é a causa mais comum de infecções virais esporádicas do sistema nervoso central, sendo que ocorrem 2-4 casos/milhão de indivíduos por ano. Todas as idades são afetadas e mais de 80% dos casos de encefalite ocorre em indivíduos com menos de 20 anos ou com mais de 50 anos de idade ⁽²⁶⁾.

As infecções por HSV são mundialmente distribuídas, presentes tanto em países desenvolvidos como nos subdesenvolvidos. O vírus é transmitido de indivíduos infectados para pessoas susceptíveis durante contato pessoal próximo. Não há variação sazonal na incidência das infecções. A raridade das infecções fatais e a capacidade de latência do vírus contribuem para que mais da metade da população mundial tenha infecções recorrentes de herpes, e assim, seja capaz de transmitir o vírus ⁽¹¹⁾.

Localização geográfica, situação sócio-econômica e idade são os principais fatores que influenciam a infecção por HSV-1. Em países em desenvolvimento e classes sociais menos abastadas o desenvolvimento de anticorpos contra o vírus ocorre em idades precoces em relação aos países desenvolvidos e às classes de maior poder aquisitivo. A infecção primária por HSV-1 normalmente ocorre na infância, antes dos 5 anos de idade, de forma assintomática, sendo que menos que 10% dessas crianças infectadas apresentam sintomas. A boca e os lábios são os sítios mais comuns de infecção, porém, qualquer órgão pode ser acometido pelo vírus ^(11; 36).

Estudo soropidemiológico verificou que, no Rio de Janeiro, 50% da população apresenta soropositividade para HSV-1 aos 7 anos de idade, e aos 15 anos esse índice alcança os 75%. Na faixa etária dos 30 anos a prevalência é de 95% ⁽⁴¹⁾. Apesar de tais índices serem dados coletados somente na cidade do Rio de Janeiro, estudo mais recente e abrangente no país, contemplando além desta cidade, também Porto Alegre, Fortaleza e Manaus, demonstrou índice similar na sua totalidade, com 56,6% de soropositividade na faixa etária entre 6 a 10 anos, 70,1% entre 11 e 15 anos e 83,8% entre 31 e 40 anos ⁽⁴⁴⁾.

Estudos concluíram que realmente existe uma dependência entre a soroprevalência para HSV-1 e a idade, com o aumento de soropositividade em pessoas à medida que aumentam as faixas etárias, até alcançar o ápice por volta dos 30 anos de idade ⁽³⁷⁾.

3.7 Interações vírus-hospedeiro

Proteínas do HSV-1 interagem com proteínas celulares, seja para estabilizá-las, seja para bloquear a função delas. Por exemplo, ICP0 se liga à ciclina D3, prolongando sua meia-vida. É provável que isso aumente a síntese de DNA viral e das proteínas tardias ⁽⁴⁵⁾. ICP0 está, ainda, relacionada ao bloqueio da resposta imune mediada por IFNs do tipo 1, evitando o acúmulo do fator 3 de regulação de IFN (IRF3) no núcleo ⁽⁴⁶⁾. Mas provavelmente há outras proteínas virais envolvidas neste processo ⁽⁴⁷⁾. O HSV-1 também é capaz de bloquear a apresentação de antígenos, através de ICP47, que se liga a TAP1/TAP2, proteínas que translocam os peptídeos antigênicos até o retículo endoplasmático ⁽⁴⁸⁾.

Um interessante mecanismo de interação do vírus com a célula hospedeira é baseado na ativação da proteína quinase dependente de RNA dupla-fita (PKR). A PKR fosforila a subunidade α do fator de iniciação da tradução (eIF-2 α), paralisando a síntese proteica. Alguns autores citam o RNA dupla-fita (dsRNA) como uma molécula comum durante o ciclo de multiplicação viral, que ativa PKR. Muitos vírus, como o HSV-1, desenvolveram mecanismos para evitar essa paralisação na produção de proteínas. O HSV-1 codifica uma proteína (γ 1 34.5 ou ICP34.5) que se liga à fosfatase 1, redirecionando-a a desfosforilar eIF-2 α ^(46; 49). Desta forma, é mantida a síntese proteica, essencial para a multiplicação viral.

O HSV-1 possui diversos mecanismos envolvidos na paralisação da síntese de produtos celulares, os quais vão desde a interrupção da transcrição e da tradução, até o bloqueio do processamento e a degradação dos mRNAs da célula. Uma das principais proteínas virais com esta função é a *virus host shutoff protein* (VHS), presente no tegumento do vírus. A VHS acelera a degradação de mRNAs, tanto celulares quanto virais, e inibe a tradução do mRNA celular ^(25; 46). Esta proteína tem uma atividade de ribonuclease, e interage com um fator de tradução celular (eIF-4H), provavelmente com objetivo de degradar mRNAs ⁽¹¹⁾. ICP47, além de inibir a apresentação de antígenos, impede o processamento pós-transcricional, favorecendo a tradução do mRNA viral, uma vez que somente quatro dos mais de oitenta transcritos virais sofrem *splicing* ^(23; 25; 50). O ICP27, uma proteína imediatamente precoce do vírus herpes simplex tipo 1, está envolvido na replicação viral, ativação da transcrição, a estabilidade do RNA, apoptose e reativação de latência viral. A reativação da latência viral está intimamente relacionada à apoptose e ao estresse oxidativo, ocorrendo aumento da sensibilização das células à apoptose e elevando os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ROS) ⁽⁵¹⁾.

A multiplicação viral é altamente deletéria à integridade da célula. Cromossomos celulares são degradados, o nucléolo desaparece, o Golgi é fragmentado, microtúbulos são rearranjados. Além disso, HSV-1 torna as células arredondadas, e as faz formarem grumos, através da alteração da estrutura e antigenicidade das membranas celulares, principalmente pela presença das glicoproteínas. Estes eventos propiciam o ambiente necessário para a síntese do DNA viral, para aumentar a glicosilação e a exocitose dos vírus, e para prevenir uma resposta do hospedeiro contra a infecção ⁽¹¹⁾.

As diversas funções virais tendem a induzir a apoptose. Mas o HSV-1 produz várias proteínas associadas à função anti-apoptótica. O gene US3, por exemplo, codifica uma quinase, capaz de bloquear a morte celular programada ^(46; 48). A glicoproteína gD, e as ICP4, ICP27, ICP6 e ICP34.5 também já foram associadas ao bloqueio da apoptose ⁽¹¹⁾. Além das proteínas citadas, microRNAs codificados pelos transcritos associados à latência (LATs) demonstraram possuir função anti-apoptótica, diminuindo a expressão de moléculas envolvidas na sinalização do fator de crescimento e transformação β (TGF- β) ⁽⁵²⁾.

3.8 Aspectos gerais da imunidade do hospedeiro

HSV-1 tem evoluído ao decorrer de um longo período de tempo com o seu hospedeiro humano; provavelmente por isso tenha havido muito tempo para a resposta imune do hospedeiro ter evoluído e conjuntamente o HSV-1 ter desenvolvido mecanismos de evasão imune, e por sua vez também o hospedeiro humano elaborou mecanismos que tentam anular os mecanismos de evasão do HSV-1. Presumivelmente, este jogo de xadrez entre HSV e evolução do sistema imune humano continua, mas no indivíduo imunocompetente, alguma forma de equilíbrio foi alcançado, porque o HSV-1 pode persistir como uma infecção latente, com sua infecção lítica controlada pela resposta imunológica. Além da latência do HSV-1, vários produtos de genes virais desempenham um papel ativo na redução ou bloqueio da resposta imune do hospedeiro ou dos seus efeitos. A resposta imune contra o HSV-1 envolve tanto a imunidade inata quanto a adquirida. A constituição genética do hospedeiro, macrófagos, células NK, subpopulações de células-T, anticorpos e citocinas têm sido apontados como importantes mecanismos de defesa do hospedeiro contra as infecções por HSV-1 ⁽¹¹⁾. Nos últimos anos, aponta-se cada vez mais o importante papel da imunidade inata no combate à infecção pelo HSV-1, especialmente através dos receptores do tipo toll (TLRs) (5; 6; 53; 54; 55; 56).

Os mecanismos da resposta adquirida demoram alguns dias para se desenvolverem, o que indica que mecanismos da resposta imune inata (interferons, macrófagos e talvez células NK) formam a primeira linha de defesa, enquanto anticorpos neutralizantes e linfócitos-T CD4+ e CD8+ citotóxicos estão sendo produzidos. Isso é especialmente evidente durante a infecção primária, uma vez que nas recorrências a resposta adquirida é ativada com rapidez muito maior ⁽⁵⁷⁾. Estudos recentes demonstram que tanto a resposta imune inata quanto a adquirida são necessárias para o controle da infecção pelo HSV-1, mesmo em uma primoinfecção ^(58; 59). Antes mesmo da descoberta dos Toll-like receptors (TLRs), Janeway postulou a existência de uma interligação entre os sistemas imunes inato e adquirido. Esta ligação entre os sistemas é fundamental para o controle da infecção por HSV-1 ⁽⁶⁰⁾.

O sistema nervoso, pelo qual o HSV-1 tem tropismo, possui não apenas macrófagos residentes, mas células de função semelhante à dos macrófagos, que também são mononucleares fagocitárias, conhecidas como micróglia ⁽⁶¹⁾. Micróglia são pequenas células da glia encontradas no cérebro e na medula espinhal que, ao contrário da neuroglia clássica (astrócitos e oligodendrócitos) são de origem mesodérmica. Hoje é aceito que as células da micróglia possam ser originárias da medula óssea no adulto, em determinadas condições patológicas. Micróglia têm o potencial de se comportar como macrófagos mas o seu espectro morfológico e funcional é altamente regulado *in vivo*, resultando em vários estados de ativação intermediários. Adaptadas ao sistema nervoso central, elas exercem função semelhante aos macrófagos ⁽⁶²⁾. As micróglia são relacionadas à geração de respostas da imunidade inata no sistema nervoso central. Quando em repouso, as micróglia estendem processos ramificados que expressam imunorreceptores, realizando assim uma vigilância imune constante ⁽⁶³⁾.

A micróglia e os macrófagos residentes, além de células dendríticas imaturas, são as células responsáveis pelo reconhecimento inicial de patógenos invasores do sistema nervoso, como é o caso de HSV-1 ^(64; 65; 66). Estas células reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) de HSV-1, através de TLRs e possivelmente através de outros receptores para reconhecimento de padrões (PRRs) ainda não descritos para os vírus ^(6; 67; 68).

3.9 PRRs e TLRs

Os TLRs são proteínas transmembranas tipo 1 com um domínio extracelular rico em repetições de leucina e um domínio intracelular homólogo à porção citoplasmática de

receptores de IL-1 (interleucina 1), denominado domínio *Toll/IL-1 receptor* (TIR). Após reconhecimento dos PAMPs, os TLRs iniciam cascatas de sinalização através de quatro proteínas adaptadoras, MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*), MAL/ TIRAP (*MyD88-adaptor-like/ TIR-associated protein*), TRIF (*Toll-receptor-associated activator of interferon*) e TRAM (*Toll-receptor-associated molecule*) (2; 69; 70).

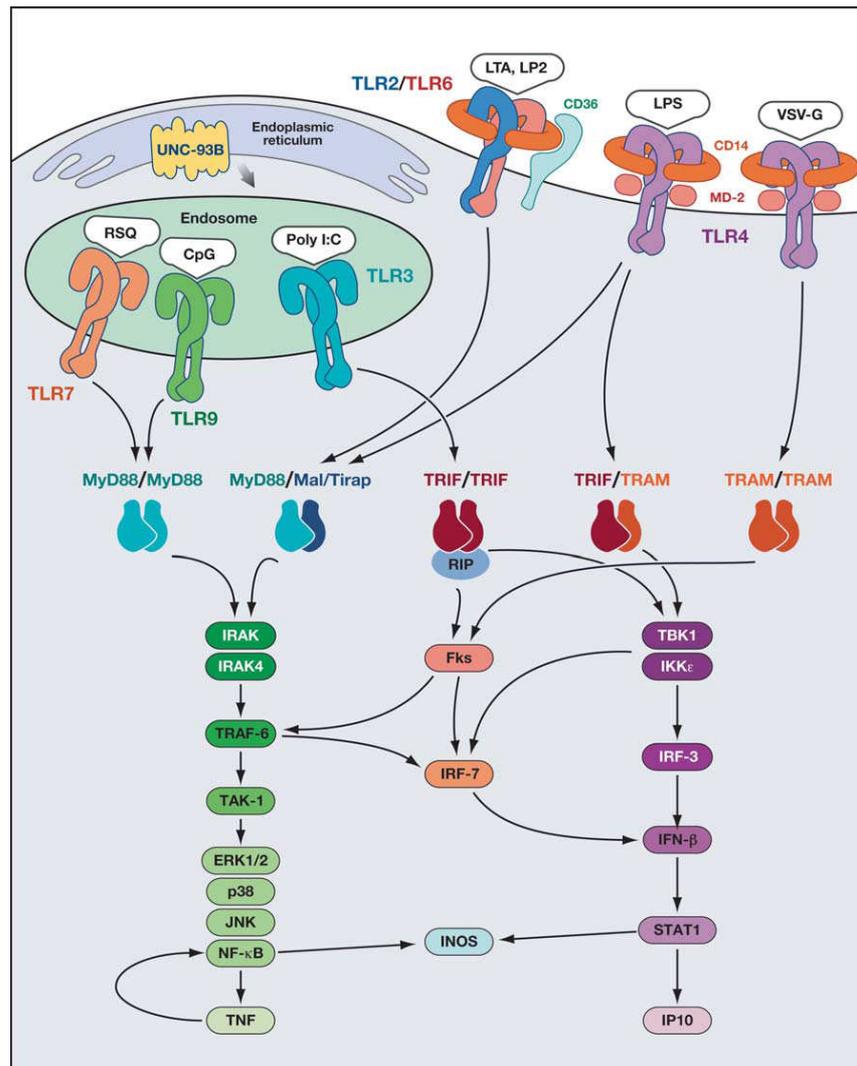


Figura 7 – TLRs - vias de sinalização. Os TLRs formam dímeros para o reconhecimento dos PAMPs. Após o reconhecimento dos ligantes, ativam as vias de sinalização que dependem de moléculas adaptadoras como MyD88 e/ou TRIF, e que podem variar de acordo com o tipo de TLR ativado. As cascatas de fosforilação culminam com a liberação de fatores transcripcionais (NF-κB, IRFs, entre outros), que levarão à expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IP10), interferons do tipo 1 (IFN beta) e moléculas co-estimulatórias ou efectoras (iNOS). Fonte: Beutler *et al*, 2006

Estas cascatas de fosforilação culminam na translocação de fatores de transcrição para o núcleo, e finalmente na produção de citocinas e quimiocinas ^(70; 71; 72).

Os TLRs são ativados por diferentes PAMPs. Os TLRs 1, 2, 6 e 10 em humano são pertencentes a uma mesma subfamília, sendo que TLR 2 forma heterodímeros com os TLRs 1 e 6 e são capazes de identificar componentes microbianos. Para o TLR 10 ainda não foi identificado nenhum PAMP. Segundo alguns pesquisadores, o TLR2 também pode ser internalizado, mas neste caso, a sinalização MyD88-dependente continua a partir de uma localização intracelular longe da membrana plasmática e é capaz de estimular a produção de IFN do tipo I através de um mecanismo ainda desconhecido ^(69; 73; 74). Os demais TLRs formam homodímeros, e o TLR 3 é endossomal e capaz de identificar dupla fita de RNA (dsRNA). O TLR 4 é ativado por LPS e é localizado na superfície da célula, mas, recentemente, segundo alguns pesquisadores, pode ser internalizado para endossomos finais, onde encontra TAG, uma variante de TRAM que interrompe a interação entre TRIF e TRAM, bloqueando sinalização TRIF-dependente e promovendo a degradação desta rota de sinalização ^(69; 74; 75). O TLR 5 é de superfície e seu PAMP é a flagelina, proteína componente de flagelos. Os TLRs 7, 8 e 9 pertencem a uma mesma subfamília e os TLR 7 e 8 tem como PAMPs, fita simples de RNA (ssRNA), em murinos e humanos, respectivamente e o TLR 9 tem CpG como PAMP ⁽⁶⁹⁾. Pesquisadores tem constantemente publicado revisões e artigos trazendo informação sobre principais TLRs e seus PAMPs ⁽⁷⁶⁾.

Quadro 1 – Principais Toll Like Receptors (TLRs) e seus PAMPs. Fonte: Vandevennea *et al*, 2010 (modificado)

TLR	Localização	PAMPs
TLR 1 e 2	Superfície celular	Polipeptídeos Triacyl (Bacteria e Mycobacteria)
TLR 2 e 6	Superfície celular	Lipopeptídeos Diacyl (Mycoplasma), LTA (<i>Streptococcus</i>), Zymosan (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
TLR 2	Superfície celular	Peptídeoglicanos (Bactérias gram positivas), lipoarabinomannan (Mycobacteria), Hemaglutinina (sarampo), phospholipomannan (Candida), GPI (Trypanosoma)

TLR 3	Endossomo	dsRNA
TLR 4	Superfície celular	LPS (Bactérias Gram negativas)
TLR 5	Superfície celular	Flagelina (Bactérias flageladas)
TLR 7	Endossomo	Vírus ssRNA
TLR 8	Endossomo	ssRNA de vírus RNA
TLR 9	Endossomo	Vírus DNA, CpG, ha (plasmódio)
TLR 11 (somente camundogos)	Superfície celular	Bactérias uropatogenicas, molécula profilin-like (Toxoplasma gondii)

O reconhecimento dos vírus pelo sistema imune inato tem se tornado uma área de muito interesse e crescente foco de pesquisas. É agora evidente que há várias famílias com múltiplos receptores de reconhecimento padrão (PRR), incluindo Toll-like receptors (TLRs), os receptores RIG-I-like (RLRs), NOD-like receptores (NLRs), MDA e DAI, que contribuem significativamente para a detecção viral por detecção de proteínas virais e ácidos nucleicos, levando à indução de citocinas como interferons do tipo I (IFNs) ^(77; 78). Além destes, outras moléculas capazes de identificar DNA no citoplasma e induzir a produção de IFN tipo I foram recentemente descritas como LRRFIP1, Ku70, DHX9, DHX36, IFI16/p204, sendo que DHX9, DHX36 e IFI16/p204 demonstraram capacidade de serem ativados pelo HSV-1, e o Ku70 pelo HSV-2 ⁽⁷⁹⁾.

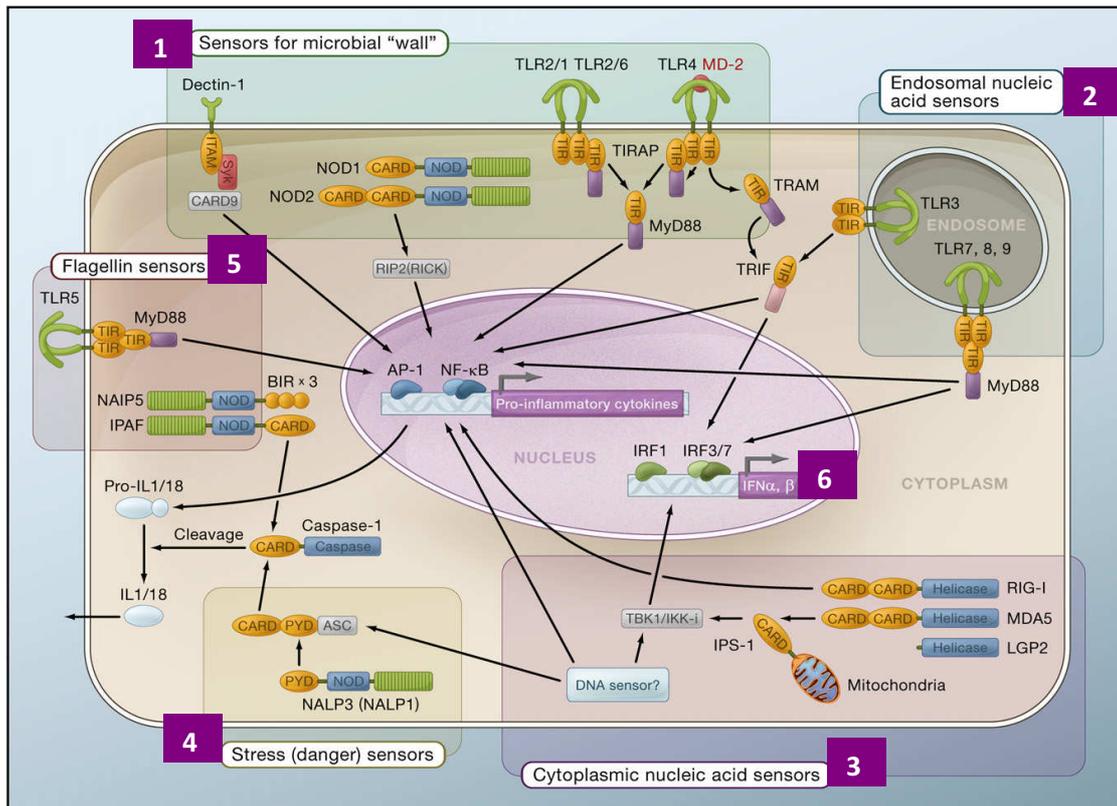


Figura 8 – Diversidade de PRRs. Além dos TLRs, existem muitos outros PRRs. Há sensores para componentes de paredes microbianas (LPS, lipopolissacarídeos e glicoproteínas), como TLR2, TLR4, NOD e dectina 1 (1); para reconhecimento de ácidos nucleicos em endossomos, como os TLR3 e TLR7-8-9 (2) e no citoplasma, como RIG, MDA e DAI (3); para moléculas endógenas associadas ao estresse ou perigo, como NALP3/inflamossomo (4), e para a flagelina bacteriana, como TLR5 (5). Todos os receptores, ao reconhecerem seus ligantes, desencadeiam vias de sinalização que culminam com a ativação de genes relacionados à resposta imune (6). Fonte: Ishii *et al*, 2008 (modificado).

3.10 Imunidade na infecção por HSV-1

As respostas imunes são mediadas por leucócitos, que derivam de precursores na medula óssea. As células-tronco hematopoiéticas dão origem aos linfócitos, responsáveis pela imunidade adaptativa, e também à linhagem mielóide, que participa tanto da resposta imune inata quanto da adaptativa ⁽³⁾.

O controle da infecção por HSV-1 parece depender bastante da resposta imune celular, seja através de células locais, as micróglia e macrófagos residentes, ou por meio de células infiltradas, monócitos, células T CD8+, e outras ^(56; 66; 80; 81; 82). Uma pesquisa demonstrou a importância dos macrófagos na encefalite causada por HSV-1, já que após a depleção dos macrófagos de animais C57BL/6 (naturalmente resistentes à infecção pelo HSV-1), a taxa de mortalidade destes camundongos aumentou sensivelmente ⁽⁸³⁾. Além destes, células dendríticas (DCs) exercem papel importante posicionando-se na interface da imunidade inata

e adaptativa, efetuando o reconhecimento dos patógenos mediados pelos TLRs que nelas se encontram ⁽⁸⁴⁾. Além disso, DCs parecem ser capazes de aumentar a produção de IFN γ pelas células NK *in vitro* e promover sua ativação *in vivo* ⁽⁸⁵⁾. Entretanto, estudo comparativo da ação de NK em diferentes órgãos, durante infecção por HSV-1, demonstrou que o órgão alvo da infecção é importante questão para ação efetiva desta célula. As NK contribuem para controle da infecção no pulmão mas não no cérebro ⁽⁸⁶⁾, informações que corroboram com os dados obtidos pelo nosso grupo, apontam como local principal para orquestração da defesa imune frente o HSV-1 o gânglio trigêmio, e não o cérebro ^(56; 58; 59; 87). Em estudo com modelo de úlcera de córnea herpética, que assim como o cérebro, também é um órgão imuno privilegiado, foi demonstrado que os linfócitos CD8+ são importantes na manutenção da latência do HSV-1 no gânglio trigêmio. O aumento de mRNA da proteína PD-1, um indicador de exaustão das células CD8+, correspondeu ao aumento dos casos de úlcera de córnea em ambos os olhos, após diminuição da latência do vírus no gânglio trigêmeo ⁽⁸⁸⁾. Além disso, pesquisa em modelo de infecção subcutânea por HSV-1 demonstrou que células T CD8 são rapidamente drenadas dos linfonodos regionais em direção à infecção ⁽⁸⁹⁾.

Diante deste perfil, as quimiocinas (citocinas quimioatraentes) produzidas nos tecidos infectados são essenciais, pois são responsáveis pela migração de leucócitos para o local da infecção ^(3; 90; 91). A presença de TNF alfa e IFN gama no gânglio trigêmeo também foi relatada por outros autores ^(56; 92; 93), e juntamente com essas citocinas foi verificada a produção de diversas quimiocinas no gânglio trigêmeo após a infecção pelo HSV-1, como CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 alfa, CCL5/RANTES, e CXCL10/IP-10 ^(56; 91; 92; 93).

Os interferons (IFN) tipo I e tipo II também são importantes no controle da infecção por HSV-1. O IFN gama (também chamado IFN tipo II) é uma citocina muito importante por ativar macrófagos infectados por patógenos intracelulares e auxiliar na manutenção de uma resposta imune celular do tipo Th1 ⁽³⁾. Os interferons do tipo I parecem ser elementos importantes no combate à infecção pelo HSV-1, pois camundongos com IFN não funcional, bloqueados por anticorpo neutralizante, morrem com baixas doses do HSV-1; porém nos estágios iniciais da infecção os IFN do tipo I podem ser compensados por IL12 ⁽⁹⁴⁾. Estudos demonstraram que IFN beta e IFN gama atuam sinergicamente no controle da infecção por HSV-1, e sugerem que o IFN gama funcionaria como um segundo sinal na ativação do estado anti-viral celular e um inibidor mais potente da multiplicação de HSV-1 *in vivo* do que o IFN beta ^(95; 96). Outra classe, os IFN tipo III (IFN lambda), demonstraram sua importância no controle da replicação viral de HSV-2 em modelo murino, e também capacidade de induzir o

aumento sérico de IFN gama após infecção de camundongos pré-tratados com IFN lambda ⁽⁹⁷⁾. Em outro estudo, mesmo grupo de pesquisadores verificaram que o IFN lambda é essencial para uma resposta antiviral eficiente, mediada por TLRs, em modelo de infecção de mucosa por HSV-2 ⁽⁹⁸⁾. O IFN lambda contribui principalmente na proteção da pele e mucosas contra os vírus, e compõe a primeira linha de defesa contra vírus respiratórios em células da mucosa epitelial nasal ^(99; 100). Adicionalmente, pesquisa recente com astrócitos, demonstrou que o IFN lambda foi capaz de aumentar a indução de uma resposta imune inata mediada por TLR3, elevando a proteção contra o HSV-1 no sistema nervoso central ⁽¹⁰¹⁾.

O TNF alfa é constitutivamente produzido em gânglio trigêmeo e cérebro, mas na infecção pelo HSV-1, a produção desta citocina está aumentada no gânglio trigêmeo já no terceiro dia de infecção por escarificação de córnea. A partir do quinto dia após a infecção, quando a presença do HSV-1 no gânglio trigêmeo atinge o seu ápice, podem ser encontradas também células produzindo IL-6 e IFN gama, sendo o infiltrado celular no trigêmeo basicamente formado por macrófagos e células dendríticas. No décimo quarto dia após a infecção os antígenos do HSV-1 já não são mais detectados e a produção de IL-6, TNF alfa e IFN gama diminui, dando lugar a citocinas como IL-4, indicando um controle da infecção ⁽¹⁰²⁾. O papel de TNF alfa, um dos principais mediadores da resposta inflamatória, na infecção pelo HSV-1 foi ressaltado em um modelo de encefalite a partir de infecção por escarificação córnea, em que animais deficientes para TNF alfa ou um de seus dois receptores (p55 e p75) têm um aumento da susceptibilidade à infecção ⁽⁹⁸⁾. A interleucina 1-beta (IL-1 beta) provavelmente desempenha um papel importante no controle de HSV-1. Camundongos nocautes para esta citocina apresentaram alta mortalidade (75%) após infecção intranasal, e IL 1beta parece atuar conjuntamente com TNF alfa ⁽¹⁰³⁾.

O IFN gama tem como uma das suas principais funções aumentar a produção de iNOS e também das espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo que o iNOS é mais comumente produzido nos macrófagos e as ROS nos neutrófilos ^(104; 105). Apesar da atuação sinérgica de IFN beta e gama para conter a infecção por HSV-1 ser relatada por alguns pesquisadores ^(96; 102), outro grupo mais recentemente relatou que a infecção por HSV-1 pode ser capaz de inibir a produção de IFN alfa mas não do IFN gama, principalmente pela ação de ICP27 ⁽¹⁰⁶⁾. Outros relatos também indicam a importância de TNF alfa, IFN gama e iNOS para controlar a infecção por HSV-1 no gânglio trigêmio pela ação dos macrófagos ⁽⁸⁰⁾, entretanto, quando a infecção atinge o cérebro, a célula mais importante na produção de iNOS, segundo alguns pesquisadores, é a micróglia ⁽¹⁰⁷⁾.

Os mRNAs de TLRs, exceto os do TLR3, são expressos em monócitos/ macrófagos ⁽⁶⁹⁾, mas no sistema nervoso central (SNC) micróglias expressam mRNAs de TLRs de 1 a 9, enquanto neurônios e oligodendrócitos expressam somente mRNAs de TLR3 ⁽⁶⁷⁾. As células dendríticas mielóides (mDC), expressam TLRs 1, 2, 3, 4, 5, 7/8 e 9 e as células dendríticas plasmocitóides (pDC) expressam TLRs 7 e 9 ^(69; 74). Além de evidenciar a importância dos TLRs na infecção por HSV, como o TLR 9 que demonstrou ser importante no reconhecimento da infecção por HSV-2 ⁽⁴⁾ e o TLR 2 demonstrou também desempenhar papel significativo em modelo de encefalite herpética ⁽⁵⁾, esta relevância também é verificada por experimentos em que o uso de agonistas de TLRs, como o Poli I:C, agonista de TLR 3, são capazes de produzir efeito protetor contra a infecção pelo vírus ^(108; 109). A importância dos TLRs no controle da infecção por HSV-1 é evidente, principalmente se observarmos modelos experimentais de encefalite herpética utilizando animais com genes de TLRs nocauteados ^(6; 56; 58; 59; 87).

3.11 Modelos animais no estudo do HSV-1

Camundongos, cobaias e coelhos têm sido os animais mais utilizados no estudo do HSV-1. Em todos eles a inoculação do vírus selvagem resulta em multiplicação viral na região periférica, transporte retrogrado do vírus até o núcleo de neurônios dos gânglios, seguidos pelo estabelecimento da latência. Nos três sistemas, a multiplicação do vírus ocorre numa fração de neurônios sensoriais antes que ocorra a infecção dos gânglios ⁽¹¹⁾.

Há algumas diferenças nos modelos animais citados. Em coelhos, tanto HSV-1 quanto HSV-2 reativam espontaneamente. A infecção ocular no coelho é bastante útil no estudo da reativação, pois o vírus é facilmente detectado na secreção lacrimal. Cobaias se apresentam como um bom modelo para infecções genitais de HSV-2. O vírus é capaz de reativar espontaneamente, contendo pequenas quantidades de partículas nas lesões. As diversas linhagens de camundongos diferem quanto à susceptibilidade, e o uso de animais nocautes tem sido particularmente útil no estudo da resposta imune a infecção ⁽¹¹⁾. Em camundongos, a reativação espontânea do vírus é bastante rara, podendo ocorrer a produção de antígenos virais sem a produção de partículas infecciosas durante a latência em neurônios ⁽¹¹⁰⁾.

Apesar de vários modelos animais utilizarem vias de infecção comuns à doença em humanos (inoculação em pele e mucosas), poucos deles se aproximam da patogênese humana. Uma série de problemas surge ao se lidar com modelos animais: a susceptibilidade da

espécie/linhagem de animal utilizada, a via de infecção, a competência do sistema imune e a linhagem viral influenciam a patogênese da doença ⁽¹¹⁾. Pesquisadores fizeram um levantamento dos diversos modelos já utilizados no estudo da encefalite desencadeada por HSV-1, demonstrando que apesar das divergências dos resultados, a maioria deles indica que a susceptibilidade à doença pode ter origem genética⁽¹¹¹⁾.

Um bom exemplo de variável que pode influenciar o estudo em modelo animal é o fato de camundongos C57BL/6 serem mais resistentes a várias doenças, em relação a outras linhagens. Em muitos dos estudos realizados, os microorganismos foram injetados diretamente na cavidade intraperitoneal (via pouco comum para a maioria das infecções), e pouca ou nenhuma informação a respeito da cinética da multiplicação do agente e de sua disseminação pelo hospedeiro era disponível ⁽¹¹²⁾. Em 1975, uma publicação intitulada “*Genetics of natural resistance to herpesvirus in mice*” ⁽¹¹³⁾ chamou a atenção para o fato de que animais C57BL/6 sobreviviam a inoculação intraperitoneal de 10^6 u.f.p. de HSV-1, enquanto animais BALB/c morriam após inoculação de apenas 10^4 u.f.p.. As linhagens de camundongos susceptíveis normalmente morrem após apresentarem sinais semelhantes a encefalite, sugerindo que a disseminação do vírus pelo sistema nervoso central seria a causa da morte. Em mesmo estudo, verificaram que a infecção, a multiplicação, a disseminação e o estabelecimento da latência de HSV-1 não diferia significativamente entre camundongos BALB/c e C57BL/6, apesar dos últimos mostrarem-se mais resistentes à patogênese causada pelo vírus. Comparando animais selvagens com animais atímicos, de ambas as linhagens, os autores não conseguiram estabelecer diferenças na resposta imune inata entre elas ⁽¹¹²⁾.

A diferença de susceptibilidade entre os sexos também já foi relatada. Foi demonstrado que camundongos BALB/c machos são mais susceptíveis à encefalite causada por HSV-1 do que fêmeas de mesma linhagem e idade, e que esta diferença diminuía drasticamente quando determinadas seqüências dos genes codificadores de LATs eram deletadas do vírus ⁽¹¹⁴⁾. Além disso, animais jovens são mais susceptíveis que os adultos ⁽¹¹⁴⁾; e inoculações nasal, na pata ou intracerebral do vírus resultam em maiores lesões e mortalidade do que as infecções oral ou do lábio ^(114; 115). A cinética da infecção por HSV-1 pode variar de acordo com os parâmetros descritos anteriormente. Foi comparado a infecção em camundongos BALB/c e em ratos da espécie *Sigmodon hispidus*, após infecção labial com 10^7 u.f.p./mL do vírus ⁽¹¹⁶⁾. Em ambos houve formação de lesão no local do inóculo a partir do 2º dia após a infecção, mas nos camundongos a lesão era maior, e persistiu por mais tempo (aproximadamente 10 dias nos ratos, e 17 dias nos camundongos). O vírus foi recuperado para

titulação nos lábios, gânglios trigêmeos e cérebros dos animais, durante 14 dias após a infecção. Com exceção dos cérebros, que apresentaram títulos semelhantes (aproximadamente 600 u.f.p. entre o 4º e o 6º dias), a quantidade de vírus presente nos lábios e nos trigêmeos foi muito maior para os camundongos do que para os ratos. A variação da quantidade de vírus ao longo dos dias também foi diferente entre as espécies. Nos trigêmeos, por exemplo, a replicação teve início no 2º dia após a infecção para ambos, mas em ratos ela alcançou o pico no 4º dia (70 u.f.p.) e declinou drasticamente no 6º dia, enquanto em camundongos ela alcançou o pico no 5º e 6º dias (6000 u.f.p. e 4000 u.f.p., respectivamente). Tanto em ratos quanto em camundongos não foi detectado vírus no 14º dia após a infecção.

Estudos de nosso grupo demonstraram que camundongos C57BL/6, infectados por via intranasal com dose de 10^4 u.f.p. de HSV-1, não apresentaram sinais evidentes da infecção, sendo possível encontrar vírus nos gânglios trigêmeos dos animais, mas não nos cérebros. Entretanto, em outro estudo com camundongos C57BL/6 e dose infectante de 10^6 u.f.p. de HSV-1, foi observado uma mortalidade de 10% na curva de sobrevivência deste grupo, com evidentes sinais de encefalite nos animais que morreram ^(6; 58; 59; 87). A cinética da infecção viral nos camundongos infectados, nas condições citadas acima, aponta que o vírus alcança os gânglios trigêmeos dos animais por volta do 3º dia após a infecção (quando foi possível detectar o vírus somente por técnicas de PCR), e que a multiplicação viral teria seu pico neste órgão no 6º dia após a infecção. No 6º dia após infecção foi possível detectar o vírus tanto por técnicas de PCR quanto por titulação, e maior número de camundongos apresentou positividade para o vírus ⁽⁸⁷⁾. Estes estudos apontam ainda que a expressão de quimiocinas e IFN gama nos gânglios trigêmeos dos camundongos parece acompanhar a cinética de multiplicação viral, apresentando pico de expressão ao redor do 5º dia após a infecção, o que parece auxiliar no controle do vírus. Os resultados anteriores do nosso grupo ⁽⁶⁾, entretanto, indicam que possivelmente este controle não ocorre tão bem em animais deficientes para moléculas relacionadas à resposta imune, uma vez que camundongos MyD88 -/- e IFN gama -/- tem alta mortalidade (100% e 50%, respectivamente), e sucumbem à infecção com sinais de encefalite, sendo que nestes, é possível encontrar partículas virais nos cérebros.

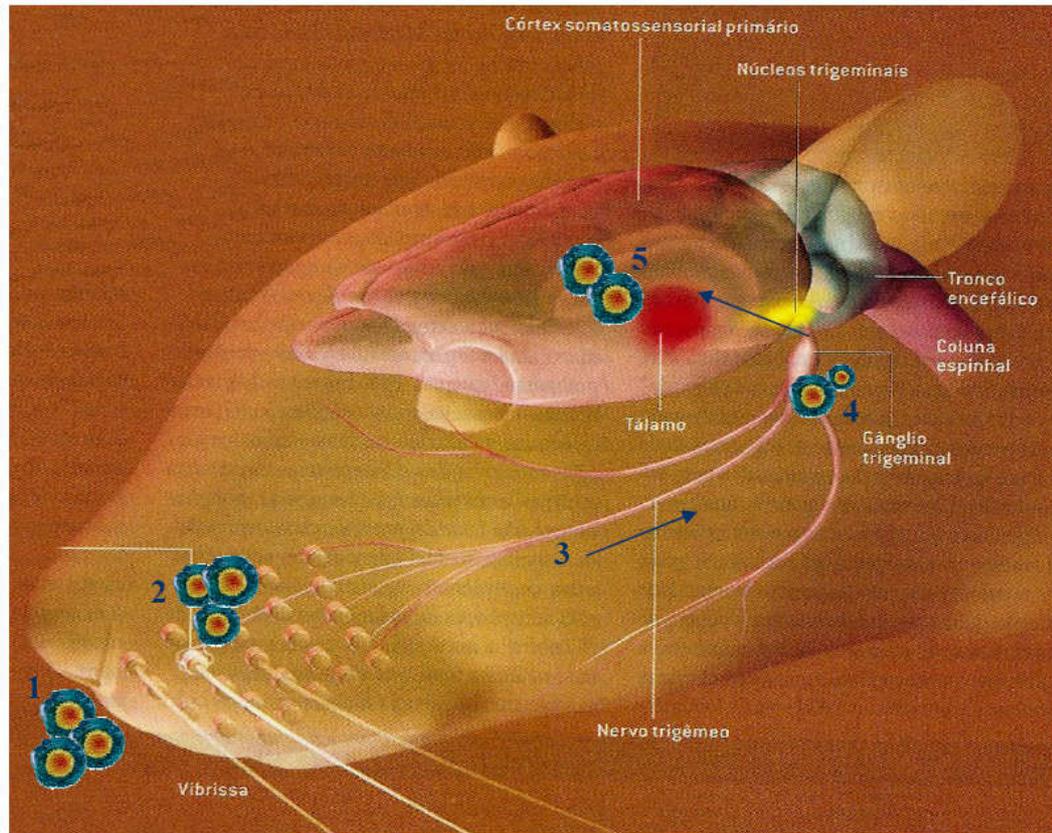
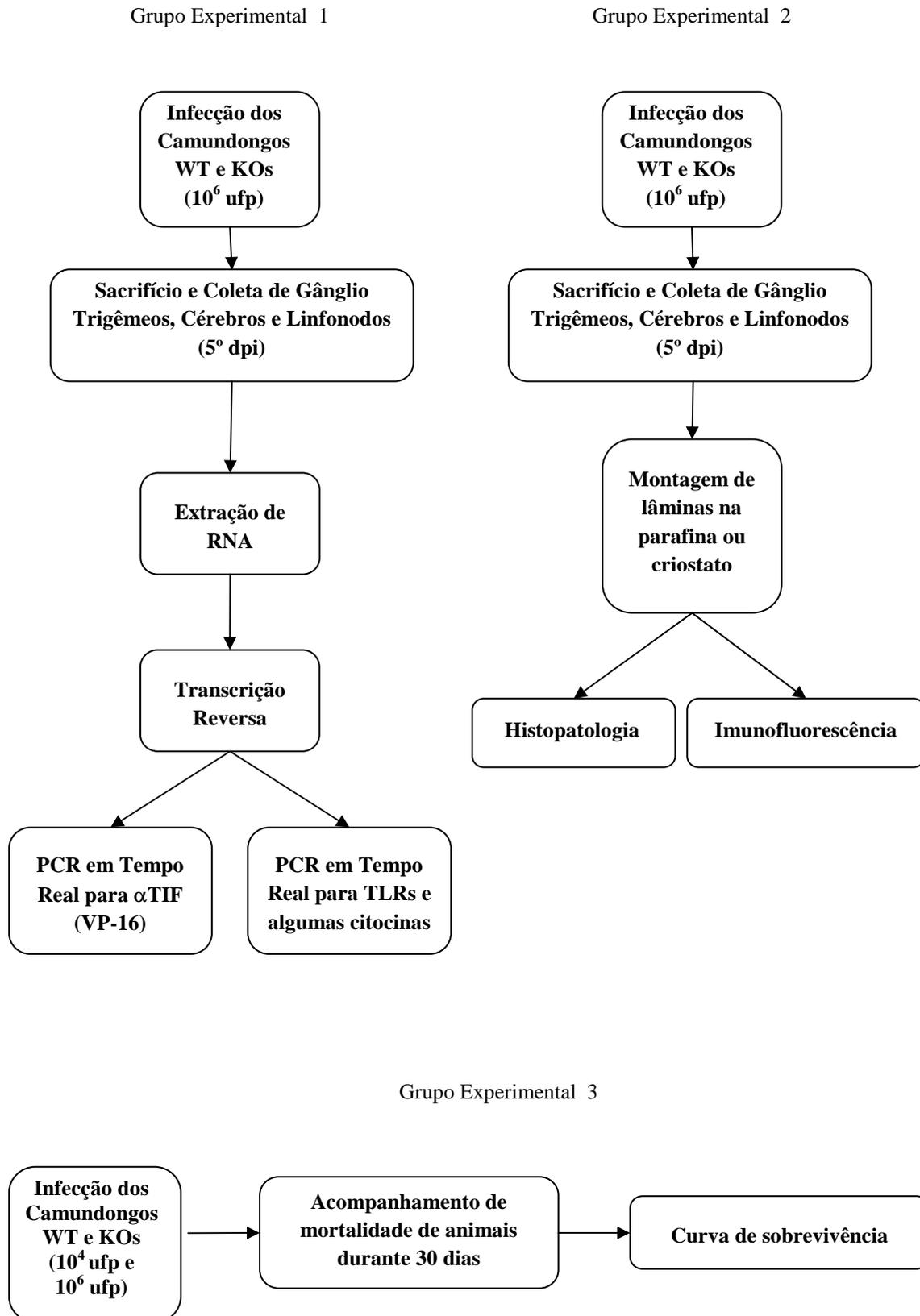


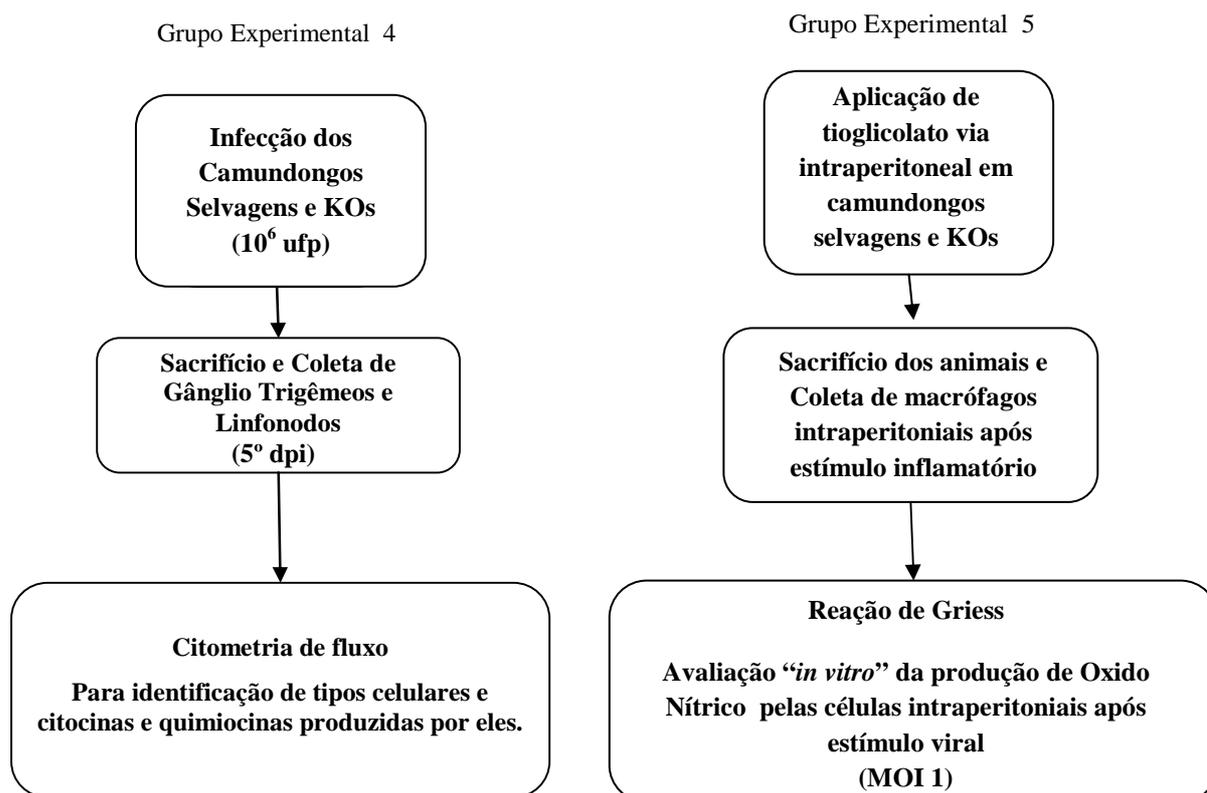
Figura 9 – Modelo intranasal de infecção por HSV-1. Estudos realizados por LIMA(2007), MANSUR(2007) e MANSUR *et al*(2005) indicam o que pode ocorrer no modelo murino de infecção intranasal com HSV-1. Após a instilação de HSV-1 pela via intranasal (1), o vírus possivelmente se multiplica no epitélio e nas mucosas dos camundongos (2). A partir daí o vírus alcança as terminações nervosas, e é transportado por via intra-axonal retrógrada (3) até os gânglios sensoriais do hospedeiro (4), sendo comum a infecção dos gânglios trigêmeos (4). Nos gânglios, o vírus realiza novos ciclos de multiplicação, e então provavelmente é contido pelo sistema imune, entrando em latência. Em linhagens de camundongos imunodeficientes, partículas virais podem alcançar o cérebro (5), onde continuam a se multiplicar, desencadeando encefalite letal. Fonte: Imagem de Scientific American (adaptado); dados de MANSUR *et al*(2005), LIMA(2007) e MANSUR(2007).

A alta prevalência de pessoas infectadas por HSV-1, bem como o aumento significativo de pessoas portadoras de doenças imunossupressoras ou mesmo que estejam em tratamento imunossupressor, torna de grande importância a compreensão dos mecanismos de defesa imune contra o vírus em modelo de encefalite.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho Experimental





4.2 Células Vero

Foram utilizadas células Vero (rim de macaco verde africano) provenientes da ATCC para a multiplicação e titulação do HSV-1. Estas células foram cultivadas em meio mínimo de Eagle (MEM) (Cultilab, São Paulo) suplementadas em 5% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, São Paulo), com adição de antibiótico gentamicina e antifúngico fungizona, numa atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C.

4.3 Vírus

Foi utilizada a amostra HSV-1 EK, isolada no Laboratório de Vírus da UFMG ⁽¹¹⁷⁾, denominada neste trabalho como HSV-1. Esta amostra é um isolado clínico do vírus, proveniente de herpes labial em adulto saudável, que foi isolada em células de rim de macaco verde africano (células Vero - ATCC).

4.4 Multiplicação Viral

Células Vero foram infectadas com a M.O.I. de 1 da amostra semente, e vinte e quatro horas depois, quando o efeito citopático atingiu de 75 a 100% das células, o sobrenadante foi coletado sob refrigeração.

4.5 Purificação

O protocolo utilizado para purificação foi feito seguindo protocolo estabelecido no Laboratório de Vírus, UFMG ⁽¹¹⁸⁾.

O sobrenadante foi precipitado com uma solução saturada de sulfato de amônio em banho de gelo, com o auxílio de um gotejador, até atingir 60% do volume final. A solução foi centrifugada a 10415 g (8000 rpm - rotor GS-3, centrífuga RC-5B-Sorvall) por 30 minutos a 4°C. O precipitado foi homogeneizado em 10 mL de Tris 10mM, pH 8,0.

Foi então preparado um colchão de sacarose a 36% em tubo de ultra-centrífuga, com 10 mL da solução de sacarose 36% e acrescido de 26 mL da suspensão final. A amostra foi centrifugada a 35248 g (14000 rpm) por 2 horas a 4°C na ultra-centrífuga Sorvall, rotor AH-629. O sedimento foi homogeneizado em 1,0 mL de TRIS 10 mM e submetido à uma nova centrifugação em colchão de sacarose semelhante à anterior. O sedimento foi coletado e transferido para outro tubo de ultra-centrífuga completando o volume para 36 mL com TRIS 10 mM, pH 8,0 e então centrifugado por uma hora a 71934 g (20000 rpm) a 4°C, na ultra centrífuga Sorvall, rotor AH629. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento homogeneizado em 300 µl de TRIS 10 mM, pH 8,0. A amostra foi aliqotada e posteriormente titulada.

4.6 Titulação por contagem de placas

Para a titulação do vírus purificado, 2×10^6 células Vero foram implantadas por poço em placas de seis poços, em meio MEM com 1% SFB, 24 horas antes da infecção. Diluições seriadas do vírus em base exponencial de 10 foram adsorvidas por uma hora em diferentes poços contendo as células, sob homogeneização de quinze em quinze minutos, e então foram adicionados 3 mL de MEM contendo 1,5% de Carboxi-metil-celulose (CMC) (GIBCO BRL, EUA). Após 72 horas a monocamada foi fixada com formalina a 10% em PBS e corada com cristal violeta. O número de placas foi contado na diluição que apresentou entre 30 e 300 placas de lise. O título foi expresso em unidades formadoras de placa por mililitro (u.f.p./mL).

4.7 Animais

Foram utilizados camundongos, machos, entre 6 e 9 semanas, já vermifugados anteriormente em seus biotérios de produção, das linhagens C57BL/6, aqui chamados WT (Biotério CPqRR/ Fiocruz); RAG KO, C57BL/6 CCL3 KO (ou MIP-1 α KO), C57BL/6 iNOS KO e C57BL/6 CD8 KO (Biotério Fiocruz/ Rio); C57BL/6 TLR2^{-/-} [TLR2^{-/-}], C57BL/6 TLR9^{-/-} [TLR9^{-/-}] (Biotério CPqRR/ Fiocruz) cedidos pelo Dr. Shizuo Akira,

(Department of Host Defense, Research Institute for Microbial Disease, Osaka University, Osaka, Japan); e C57BL/6 TLR2/TLR9^{-/-} [TLR2/9^{-/-}] (Biotério CPqRR/ Fiocruz) cedidos por Alan Sher e André Báfica (NIH, USA). Foram utilizados uma média de 6 animais por grupo.

4.8 Anestesia

Previamente à infecção intranasal, os animais foram anestesiados com ketamina/xilazina (respectivamente 3,2 mg e 0,16 mg/animal, em solução salina 0.9%, numa proporção de 4:1:5), por via intraperitoneal.

4.9 Infecção Intranasal

Animais foram infectados por via intranasal ^(6; 56; 119) com 10⁶ u.f.p. do vírus HSV-1, em um volume final de 10 µL. Camundongos controle passaram pelo mesmo processo, porém com PBS ao invés do HSV-1.

Os animais foram mantidos no biotério do Centro de Pesquisa René Rachou; com livre acesso à ração e água, e sob ciclo claro/escuro; ou no biotério do Departamento de Microbiologia da UFMG sob as mesmas condições.

O sacrifício dos animais foi feito por exposição a CO₂ (40% em ar atmosférico com administração lenta), seguido de deslocamento cervical, nos dias em que foram feitas coletas de órgãos (5° dpi) e/ou para a eutanásia dos animais com sinais graves de encefalite. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ (LW-6/11) (Anexo 1). Além disso o projeto também teve aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG (protocolo 13/2008) (Anexo 2), já que parte dos experimentos foram realizados no Labvírus na UFMG.

Os órgãos alvo (gânglio trigêmio, cérebro e linfonodo cervical superficial) foram retirados de maneira asséptica, acondicionados em tubos tipo eppendorf, e imediatamente congelados em nitrogênio líquido, quando utilizados em análises de PCR, e em solução de formol 10% em PBS, pH 7,4, quando utilizados para análises histopatológicas, mas no protocolo de citometria de fluxo os órgãos coletados foram imediatamente processados para montagem das amostras a serem analisadas.

4.10 Extração de RNA de tecidos animais

Os gânglios trigêmeos e cérebros dos animais do Grupo Experimental 1 (avaliação da expressão de VP-16, TLRs e citocinas no 5°dpi) foram retirados assepticamente.

A extração do RNA foi feita segundo o protocolo indicado pelo fabricante do reagente de TRIzol (Invitrogen). Brevemente, o tecido (aproximadamente 80mg para os cérebros ou linfonodos; 1 par/aproximadamente 15mg de gânglios trigêmeos) foi então homogeneizado com o auxílio de um pistilo em reagente de TRIzol (750 uL). Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, foi adicionado clorofórmio (200 uL), a mistura foi homogeneizada e incubada novamente à temperatura ambiente, por 15 minutos. A separação das fases foi feita por centrifugação a 12000g por 15 minutos, a 4°C, em centrífuga Eppendorf 5417R. A fase aquosa (superior, transparente), onde o RNA está presente, foi coletada e transferida para um novo tubo. A precipitação do RNA foi feita com adição de isopropanol (500 uL), seguida de centrifugação a 12000g por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi então descartado, e o precipitado contendo o RNA lavado em álcool 75% (1 mL). Após centrifugação (7500 g por 5 minutos, a 4°C), o sobrenadante foi descartado e o RNA dissolvido em água DEPC (50 uL). O RNA foi armazenado a -70°C.

Um microlitro do RNA extraído das amostras foi utilizado para a dosagem no espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 a 280 nm.

4.11 Tratamento de RNAs com DNase

Os RNAs extraídos com o reagente TRIzol foram tratados com DNase previamente à transcrição reversa. O protocolo foi feito conforme a orientação do fabricante da DNase RNase free (Biolabs). Tampão de DNase 10x (5µL) e 2 unidades de DNase I (1µL) foram adicionados à 45 µL da solução contendo RNA, e a mistura foi incubada a 37°C durante 10 minutos, para melhor ação da enzima. Em seguida, os tubos foram colocados em gelo, e foi acrescido 0,5µL de EDTA (a 0,5M) à mistura, para uma concentração final de 5 mM de EDTA. O EDTA protege os RNAs durante o passo seguinte de inativação da enzima DNase a 75°C por 10 minutos. Logo em seguida ao tratamento, foi feita a transcrição reversa.

4.12 Reação de transcrição reversa (RT-PCR)

O procedimento foi realizado de acordo com o sugerido pelo fabricante da enzima M-MLV RT (Promega Corporation, E.U.A). Dois microgramas do RNA extraído dos trigêmeos ou dos cérebros dos camundongos foram incubados com 1µg do óligo dT em quantidade suficiente de água para 15µl por 5 minutos a 70°C, e depois resfriados imediatamente em banho de gelo. Simultaneamente foi preparado um homogeneizado com 5µl do tampão da enzima M-MLV 5X *Reaction buffer* (Tris-HCL 250mM, pH 8.3; KCL 375mM; MgCl₂ 15mM; DTT 50mM) fornecido pelo fabricante, 1,25µl de cada dNTP a 10mM, 200 unidades

da enzima M-MLV RT e água livre de RNase para um volume final de 25µl. Este homogeneizado foi adicionado ao restante da reação e incubado a 37°C por 60 minutos.

4.13 PCR em tempo real para transcritos de citocinas/ quimiocinas e TLRs

Para verificar o aumento da expressão dos mRNAs de VP-16, IP-10, MCP-1, iNOS, TNF α e Rantes (CCL5) nos gânglios trigêmeos dos camundongos e mRNAs de TLRs 1, 2, 3, 6, 7 e 9 nos gânglios trigêmeos, cérebros e linfonodos dos camundongos, foi feita uma reação de PCR em tempo real. Foram utilizados 2 µL do cDNA obtido da reação de transcrição reversa (diluído 1:3); 0,8 µL de cada iniciador a 5mM; e 10 µL do SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), contendo marcador SYBR Green I, AmpliTaq Gold DNA Polimerase, dNTPs, tampão, e referência passiva I, no aparelho *Applied Biosystems' 7000 Sequence Detection System*. A reação foi feita com as seguintes temperaturas e tempos: 95°C, 10' e 50 ciclos de 95°C, 15''; 60°C, 1'. Após a reação, a especificidade dos amplificadores foi observada, conferindo-se a temperatura de dissociação (Tm) dada pela curva de dissociação, específica para cada transcrito-alvo. Os oligonucleotídeos usados no PCR em tempo real, e descritos no quadro 2, foram adquiridos de artigos e verificados pelo *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) do site PUBMED ^(120, 121, 122, 123).

Quadro 2 - Iniciadores utilizados na PCR em Tempo Real para citocinas/ quimiocinas e TLRs.

Gene	Iniciadores	Amplicon
HPRT	F- 5' GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GTT G R- 5' GAT TCA ACT TGC GCT CAT CTT AGG C	162 pb
IL1- beta	F- 5' CGC AGC AGC ACA TCA ACA AGA GC R- 5' TGT CCT CAT CCT GGA AGG TCC ACG	110 pb
IL-12 p40	F- 5' GGA AGC ACG GCA GCA GAA TA R- 5' AAC TTG AGG GAG AAG TAG GAA TGG	142 pb
IP-10	F- 5' GCC GTC ATT TTC TGC CTC AT R- 5' GCT TCC CTA TGG CCC TCA TT	126 pb
MCP-1	F- 5' CTT CTG GGC CTG CTG TTC A R- 5' CCA GCC TAC TCA TTG GGA TCA	81 pb

TNF α	F- 5' CAT CTT CTC AAA ATT CGA GTG ACA A R- 5' TGG GAG TAG ACA AGG TAC AAC CC	175 pb
IFN γ	F- 5' TCA AGT GGC ATA GAT GTG GAA GAA R- 5' TGG CTC TGC AGG ATT TTC ATG	171 pb
gp91 <i>phox</i>	F- 5' CCA ACT GGG ATA ACG AGT TCA AGA C R- 5' AAG GCT TCA GGG CCA CAC A	84 pb
p22 <i>phox</i>	F- 5' TGG CTA CTG CTG GAC GTT TCA C R- 5' CTC CAG CAG ACA GAT GAG CAC AC	79 pb
iNOS	F- 5' CAG CTG GGC TGT ACA AAC CTT R- 5' CAT TGG AAG TGA AGC GTT TCG	95 pb
Rantes (CCL5)	F- 5' GTC GTG TTT GTC ACT CGA AGG A R- 5' GAT GTA TTC TTG AAC CCA CTT CTT CTC	71 pb
VP-16	F- 5' TTT GAC CCG CGA GAT CCT AT R- 5' GCT CCG TTG ACG AAC ATG AA	138 pb
TLR 1	F- 5' TGA TCT TGT GCC ACC CAA CA R- 5' GCA GGG CAT CAA AGG CAT TA	66 pb
TLR 2	F- 5' TTG CTC CTG CGA ACT CCT AT R- 5' AGC CTG GTG ACA TTC CAA GA	157 pb
TLR 3	F- 5' TAG ACT GCA TCG CCT GCT AA R- 5' AAG CAG CCA GAA GCA GAA CT	122 pb
TLR 6	F- 5' TCT GGG ATA GCC TCT GCA ACA R- 5' GGC GCA AAC AAA GTG GAA AC	163 pb
TLR 7	F- 5' TAC CAG GAC AGC CAG TTC TA R- 5' AGG AGC CTC TGA TGA GAC AA	136 pb
TLR 9	F- 5' ACT GAG CAC CCC TGC TTC TA R- 5' AGA TTA GTC AGC GGC AGG AA	197 pb

Para análise dos dados do Grupo Experimental 1 (5ºdpi), no gânglio trigêmeo foi utilizado o método do Ct comparativo, para os genes dos TLRs, HPRT, VP-16, MCP-1, iNOS, IP-10, Rantes, TNF α , GP91 *phox* e P22 *phox* utilizando a fórmula matemática $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Também foi utilizado o método comparativo de valores obtidos por curva padrão, no linfonodos para os genes HPRT, IFN γ , IL-1 beta, IL-12 p40, IP-10, MCP-1. Os valores destas curvas padrões foram baseados em diluições seriadas em base logarítmica de dez. Para cada uma diluição foi atribuído um valor arbitrário (correspondente à respectiva diluição) e uma regressão linear foi feita (software SDS 2.0). Tais curvas foram somente consideradas quando R² foi superior a 0,95.

A expressão do gene alvo foi normalizada em relação ao gene constitutivamente expresso HPRT, e a expressão normalizada dos animais infectados foi comparada à dos animais não infectados (controles). Os resultados foram sendo plotados como aumento relativo, em unidades arbitrárias. Todas as reações foram feitas em duplicata.

4.14 Coloração por hematoxilina e eosina (HE) e análise histopatológica

Os cortes de gânglio trigêmeo fixados em solução de formol 10% foram incluídos em parafina, e foram processados para montagem de lâminas no micrótomo e corados com Hematoxilina de Harris e Eosina, pelo corpo técnico do Departamento de Patologia Geral do ICB-UFMG.

Os aspectos histopatológicos dos gânglios trigêmeos foram avaliados quanto à celularidade e aos aspectos inflamatórios (presença de infiltrados, aumento estrutural). As imagens foram obtidas ao microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão)

4.15 Imunofluorescência

Os cortes de gânglio trigêmeo fixados e incluídos em *Tissue-Tek O.C.T. compound* (Sakura, Netherlands) foram processados para montagem de lâminas no criostato. Utilizando uma câmara úmida, com água morna no fundo da câmara, foi gotejado PBS 1x sobre os cortes que foram incubados por 5min; após aspirar o PBS, gotejou-se solução de PBS+ TritonX (Tx)+BSA (soroalbumina bovina; em 5mL do PBS+Tx, foi acrescentado 0,1g de BSA) nos cortes (aproximadamente 50 μ L para cada 5 cortes, 100 μ L/lâmina), e incubou-se por 5min; aspirou-se, e gotejou-se PBS+Tx+BSA+SNC (soro normal de cabra; diluir o soro normal de cabra 1:40 na solução PBS+Tx+BSA) nos cortes, e incubou-se por 45min.; aspirou-se novamente e então gotejou-se anticorpo primário e incubou-se por 2h; após aspirar, lavou-se as lâminas em três banhos sucessivos de PBS; e repetiu-se passo de aspirar e gotejar

PBS+Tx+BSA nos cortes, e incubar por 5min. A partir deste passo, os procedimentos foram realizados no escuro. Gotejou-se o anticorpo secundário e incubou-se por 1h; aspirou-se, e as lâminas foram lavadas em 3 banhos sucessivos de PBS; aspirou-se e gotejou-se PBS+Tx (acrescentar 1µl de TritonX em 10mL do PBS) e incubou-se por 5min; novamente foi aspirado e então gotejou-se o Hoechst (*Molecular Probes*), e incubou-se por 5min; finalizou-se o procedimento aspirando e gotejando com PBS 1x nos cortes e incubando por 5min, duas vezes; para só então montar as lâminas, colocando uma gota de óleo no centro dos cortes, e colocando a lamínula por cima, evitando a formação de bolhas. Após o óleo secar, os cortes foram selados, vedando ao redor da lamínula. Se a leitura não fosse feita na hora, as lâminas eram guardadas ao abrigo da luz, em geladeira.

Quadro 3 – Anticorpos primários utilizados nas imunofluorescências.

Anticorpos primários	Origem e Diluição	Fabricante e Código
F4/80	Rato (rat) 1:50	Serotec MCA497
CD11b	Rato (rat) 1:100	Serotec MCA74GA
Dendríticas	Rato (rat) 1:25	Serotec MCA948
CD3	Rato (rat) 1:100	Serotec MCA500GT
CD8	Rato (rat) 1:100	Serotec MCA1768T
iNOS	Coelho (rabbit) 1:5000	Spring Bioscience E3740
Hoechst	1:2000 (0,2ug/mL)	Molecular Probes, Invitrogen, H-33342

As imagens foram obtidas ao microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão) foram transferidas por meio de vídeo-câmera colorida Cool SNAP-Procf Color (*Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA*) para um sistema de vídeo acoplado ao computador através

do programa Image-Pro Express versão 4.0 para Windows (*Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA*). As imagens gravadas foram selecionadas e transferidas para o programa *Power Point* para a montagem das pranchas.

4.16 Preparação de células e citometria de fluxo

Suspensões de células individuais foram preparadas a partir de gânglio trigêmeo (GT) e linfonodos de camundongos WT, divididos em grupos não infectados (controle negativo) e infectados. Os órgãos foram digeridos com colagenase (*Merck-Chemicals*) diluída em meio RPMI incompleto. Injetou-se 200 μL nos GT e 300 μL nos linfonodos de colagenase a 2mg/mL em várias partes do órgão (colagenase previamente diluída em tampão HEPES - diluídos 20 μL para 1mL). Incubou-se por 30min a 37°C e logo após macerou-se o órgão em meio RPMI incompleto com ajuda de uma peneira e um êmbulo de seringa. As células então foram lavadas, e após centrifugou-se a 4°C por 10min a 354 x g; verteu-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as células em 1 mL de RPMI com SFB 10%, as quais foram contadas, com azul de tripan para avaliar a viabilidade. As células foram diluídas em meio RPMI completo até a quantidade necessária para o plaqueamento.

Foi plaqueado 5×10^5 células/100 μL (estimulado e não estimulado) para células T em placa de cultura de 96 poços fundo U (*Nunc Thermo Scientific*) para cada marcação e foi plaqueado 1×10^6 células/100 μL (não estimulado) para células dendríticas e monócitos também em placa de cultura de 96 poços fundo U (*Nunc Thermo Scientific*) para cada marcação.

Para leitura das células dos linfonodos utilizou-se, após plaqueamento, como estímulo específico, vírus HSV-1 inativado pelo calor, que posteriormente teve proteína viral da amostra quantificada por Nanodrop (*Thermo Scientific*), diluídos em meio RPMI completo, transferindo um volume de 100 μL para cada poço contendo as células (25 μg /mL de proteína por poço).

Para monócitos, células dendríticas e linfócitos com estímulo não específico (PMA - 25 ng/mL, feito nas células dos linfonodos), incubou-se por 1 hora em estufa de CO₂ a 37°C, acrescentando brefeldina A (1:1000 conc. final no poço, ou seja, 0,2 μL + 10 μL RPMI completo. Utilizou-se 10 μL dessa solução por poço) em um volume de 10 μL /poço de meio RPMI completo por poço e incubou-se em estufa CO₂ a 37°C por 5 horas;

Os linfócitos com estímulo específico de proteína do vírus, foram incubados por 8 a 12 horas em estufa de CO₂ a 37°C, seguido pelo acréscimo de brefeldina A (1:1000 concentração final no poço, ou seja, 0,2 μL + 10 μL RPMI completo. Utilizou-se 10 μL dessa solução por

poço) em um volume de 100µL/poço de meio RPMI completo por poço e incubou-se em estufa CO₂ a 37°C por 8 horas;

Preparou-se o mix de anticorpo, durante os tempos de incubação (a partir deste momento, o experimento foi feito no escuro) Centrifugou-se a placa a 532 x g por 5 min, 4°C, e eliminou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 50µl de tampão contendo anticorpos contra os antígenos extracelulares: CD11c (FITC; BDPharmingen), CD11b (PECy7; eBioscience), F4/80 (APC; eBioscience), I-A^b (PE; BDPharmingen), para identificar os macrófagos e células dendríticas, e também CD4 (APC; eBioscience), CD8 (PECy5; BDPharmingen), NK1.1 (FITC; BDPharmingen), para CD4, CD8 e células NK além de FC Block (BDPharmingen) para todos os marcadores.

Incubou-se durante 20 min., em temperatura ambiente no escuro, e em seguida adicionou-se 150µl de FACS-*buffer* (PBS 1% FCS). Centrifugou-se a 532 x g por 5 min, 4°C. Eliminou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 200µl de FACS buffer, então, centrifugou-se a placa a 532 x g por 5 min, 4°C. Para marcações intracitoplasmáticas, a partir deste ponto, utilizamos algumas etapas a mais, descritas a seguir:

Eliminou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 100µl de BD *Cytofix/Cytoperm Solution* (pronto para uso) Incubou-se por 15 min a 4°C no escuro. Após, adicionou-se 150µl de BD *Perm/Wash Solution* (estoque em 10X, dilui-se em água destilada para 1X)

Centrifugou-se a 532 x g por 5 min, 4°C. Após eliminar o sobrenadante, ressuspendeu-se o pellet em 50 µl da solução contendo anticorpos contra o antígeno intracelular, IFN gama (PE; BDPharmingen), diluídos em BD *Perm/Wash*. Incubou-se por 30 min a 4°C no escuro. Adicionou-se 150-200 µl da solução de BD *Perm/Wash*. Novamente centrifugou-se a 532 x g por 5 min, 4°C.

Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 200 µl da solução de BD *Perm/Wash*. Então centrifugou-se a placa 2 vezes, por 5 min a 532 x g.

Ressuspendeu-se em FACS *buffer*, tanto as amostras somente com marcadores extracelulares quanto as com ambos os marcadores (200µL em cada poço). Para cada amostra, entre 100.000 e 200.000 eventos foram capturados para análise. Os dados foram analisados usando o programa FlowJo 7.2.5 e foram apresentados como a porcentagem de células positivas no “*gate*” da população selecionada.

4.17 Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) por reação de Griess

Utilizamos protocolo já descrito⁽¹²⁴⁾ e o adaptamos para verificar produção de NO em macrófagos intraperitoneais de animais C57BL/6 WT, TLR2 KO, TLR9 KO e TLR2/9 KO. Primeiramente foi necessário realizar extração de macrófagos intraperitoneais dos camundongos de cada grupo (N=5). Em cada animal, injetou-se intraperitonealmente 2 mL de tioglicolato 3%. Após 4 dias, sacrificou-se os camundongos e foi feita lavagem peritoneal para coleta das células com 5 mL de DMEM gelado (com antibiótico garamicina, sem soro). Para obter êxito no experimento foi necessário recuperar ao menos 60% do meio injetado.

Foram feitos “pools” das células por grupo, e centrifugados por 10 minutos à 1200 rpm à uma temperatura de 4°C. Após descartar o sobrenadante, ressuspendeu-se as amostras em 5mL (1 mL por animal) com meio DMEM 5% SFB.

Foi feito a contagem do número de células viáveis com azul de tripan em câmara de Neubauer, e ajustou-se o volume das amostras para 2×10^5 para 100µL.

Semeou-se os macrófagos na placa de 96 poços (*Nunc Thermo Scientific*), colocando 100µL por poço. Incubou-se por 3 horas em estufa de CO₂, e após descartou-se o sobrenadante e lavou-se os poços com 100µL de DMEM sem SFB e sem antibiótico, para posteriormente colocar 150µL de DMEM 5% em cada poço e deixou-se incubado por 24 horas em estufa CO₂.

Após acrescentou-se o estímulo de HSV-1 (MOI = 1) no volume de 100µL por poço (cinco poços por grupo), e incubou-se por 24 horas. Mantiveram-se 4 poços por grupo acrescentando somente meio, para serem utilizados como controle. Depois do período de incubação em estufa de CO₂, coletou-se o sobrenadante.

Para fazer dosagem de óxido nítrico, fez-se montagem de outra placa de acordo com mapa, com 50µL dos sobrenadantes por poço da amostra dos grupos, cinco poços para amostras estimuladas e quatro para os controles. E montou-se uma curva padrão que utilizou o nitrito de sódio (NaNO₂) em diluição seriada em meio DMEM 5%, como referência para avaliar a concentração de óxido nítrico (NO) nas amostras, após reação com solução C. Esta solução consiste da mistura das soluções de A e B (1:2), sendo solução A composta por sulfenilamida 1% em 2,5% de ácido fosfórico (H₃PO₄), e solução B por N-(1 naphthyl) ethyl edediamine 0,1% em 2,5% de ácido fosfórico (H₃PO₄). Para a reação foi também acrescentado a cada poço com amostra, 50µL de solução C.

Leitura foi feita em espectrofotômetro (*Molecular Devices. Versamax tunable microplate reader*) a 490nm, e valores expressos em mM.

4.18 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram feitas usando o programa estatístico GraphPad Prism 5 (*GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA*). Os grupos amostrais foram avaliados e considerados não paramétricos ou paramétricos, de acordo com teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, e os testes estatísticos empregados foram Mann-Whitney ou teste *t* respectivamente. Para análise de cinética da expressão de proteína viral foi utilizado teste estatístico ANOVA não paramétrico Kruskal-Wallis e comparação múltipla de Dunn. Para análise das curvas de sobrevivência foi utilizado o teste Log-rank. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Cinética de VP-16 e expressão dos mRNAs de TLRs em C56BL/6 (WT) e KOs infectados por HSV-1

Primeiramente buscamos resposta para a pergunta “Existe interrelação entre os TLRs, durante resposta imune contra HSV-1?”. Foram avaliados a expressão dos mRNAs dos TLRs 1, 2, 3, 6, 7 e 9. O TLR4 não foi avaliado pois em pesquisa anterior do grupo ele demonstrou não ser capaz de ser ativado pelo HSV-1⁽⁶⁾, o TLR5 não foi avaliado pois seu PAMP é a proteína flagelina que é ausente no HSV-1 e TLR8 só existe em humanos⁽⁷⁶⁾.

Foi verificado nos gânglios trigêmeo o pico da expressão da proteína viral VP16 (ou α TIF) por meio de PCR em tempo real (Figura 10), para saber qual o dia ideal para se fazer coleta de material para análises. Esta proteína é viral e está envolvida na multiplicação do vírus e, junto à enzima RNA polimerase II da célula hospedeira, inicia a transcrição dos genes imediatamente precoces⁽¹¹⁾. A curva mostra que a proteína tem um pico da expressão no 5º dia e então decresce até o 8º dia.

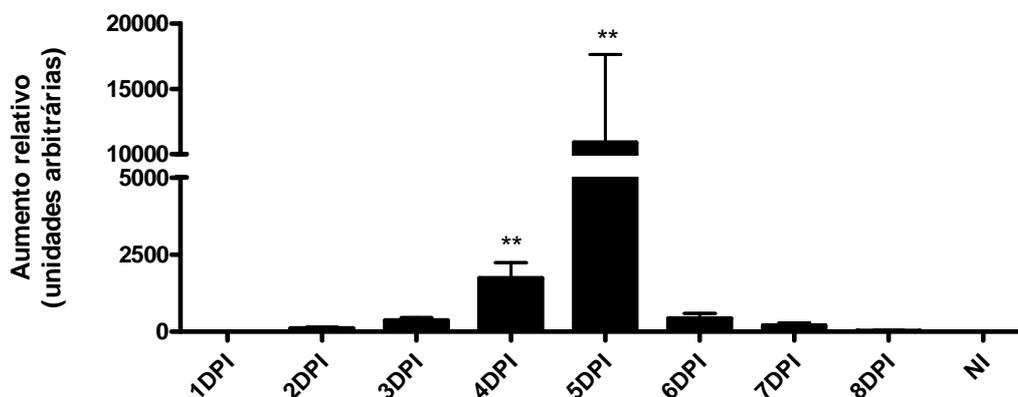


Figura 10 – Cinética de VP-16 nos gânglios trigêmeos de camundongos C57BL/6 (WT). Camundongos C57BL/6 foram infectados por via intranasal com 10^6 ufp de HSV-1 e gânglios trigêmeos de 3 animais a cada dia pós infecção (dpi) foram coletados entre o 1º e o 8º dias. Animais não infectados (NI) aspiraram somente PBS. Após a extração de RNA e a transcrição reversa, foi realizada a PCR em tempo real, em duplicatas, e a expressão de cada gene foi normalizada em relação ao gene constitutivo HPRT. Análise estatística foi feita com o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e o teste de comparações múltiplas de Dunn. As barras representam o erro padrão (S.E.M) (** $p < 0,01$). Os valores referentes a cada dpi foram comparados ao grupo não infectado (NI).

Em ensaio de PCR em tempo real para determinar a expressão de TLRs no gânglio trigeminal de camundongos C57BL/6 WT infectados (Figura 11A), as unidades arbitrárias foram: TLR1 ($19,89 \pm 11,54$); TLR2 ($21,08 \pm 3,796$); TLR3 ($10,35 \pm 3,011$); TLR6 ($22,17 \pm 14,07$); TLR7 ($22,10 \pm 8,389$); TLR9 ($43,68 \pm 12,65$); significativamente

diferentes de seus respectivos grupos controle não infectados (NI). Para a expressão dos mesmos TLRs no cérebro dos mesmos animais (Figura 11B), os valores não demonstraram diferença significativa em relação a seus respectivos NI.

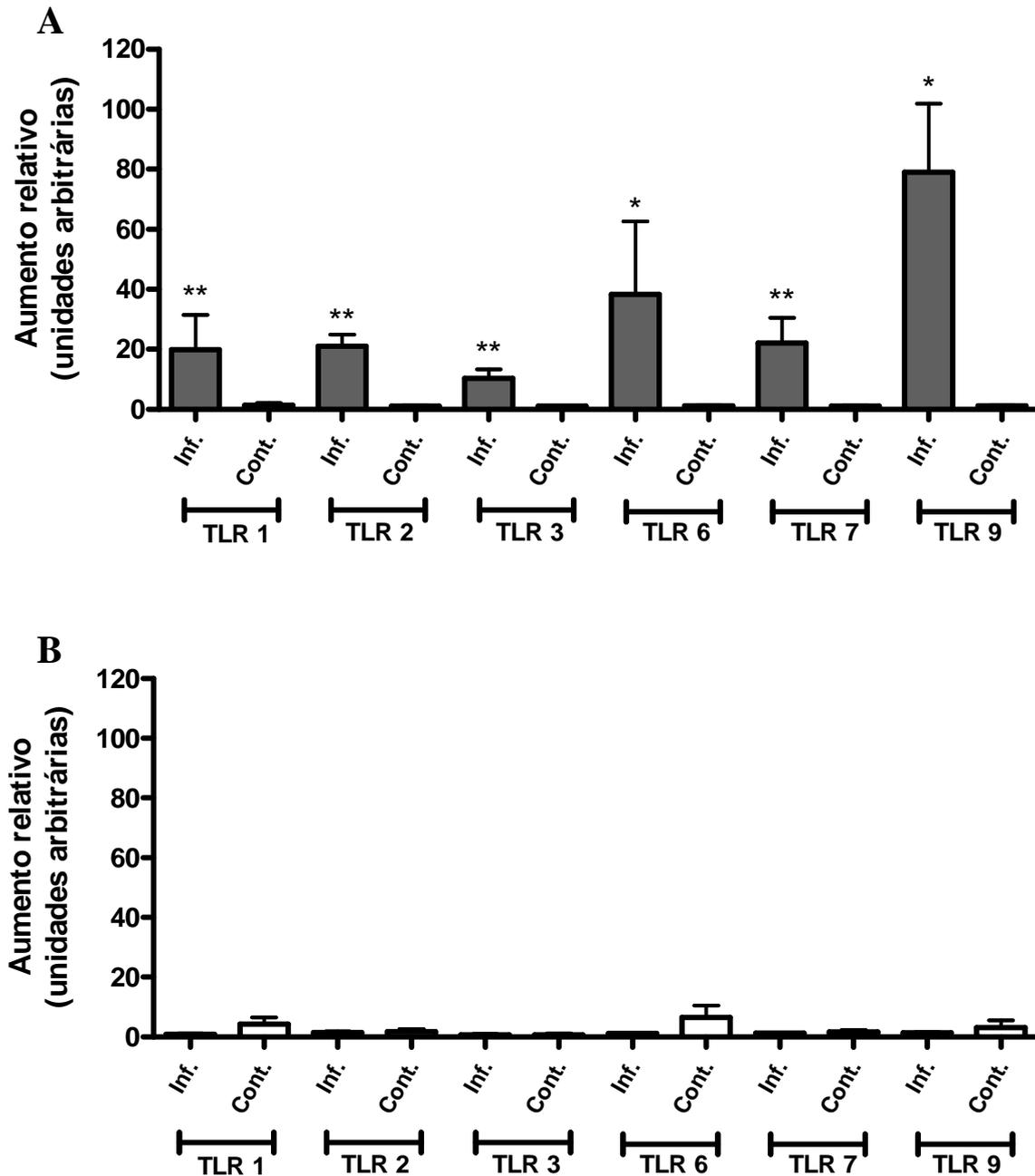


Figura 11 – Expressão de TLRs em camundongos WT. Os camundongos C57BL/6 foram infectados por via intranasal com 10^6 ufp de HSV-1 e no 5^o dpi gânglios trigêmeos (A) e cérebros (B) dos animais foram coletados (N=6). Animais controle aspiraram somente PBS (N=4). Após a extração de RNA e a transcrição reversa, foi realizada a PCR em tempo real, em duplicatas, e a expressão de cada gene foi normalizada em relação ao gene constitutivo HPRT. Análises estatísticas foram feitas com o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. As barras representam o S.E.M (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

No ensaio de PCR em tempo real para determinar a expressão de TLR1, em gânglio trigêmeo (Figura 12A) de camundongos C57BL/6 WT, TLR2KO, TLR9KO, TLR2/9KO infectados, as unidades arbitrárias foram $33,32\pm 8,318$; $9,163\pm 1,790$; $5,062\pm 1,379$; $9,169\pm 3,088$, respectivamente. Os valores da expressão em animais KOs infectados foram significativamente diferentes quando comparados aos C57BL/6 WT infectados. Houve diferença também entre todos os animais infectados e não infectados. No cérebro (Figura 12B) nos grupos C57BL/6 WT, TLR2KO, TLR9KO, TLR2/9KO, os valores foram $0,8714\pm 0,2988$; $14,98\pm 4,693$; $11,92\pm 5,818$; $1,583\pm 0,9139$, respectivamente. Diferença significativa foi verificada entre grupos infectados TLR2KO e TLR9KO e seus respectivos grupos não infectados, e também houve diferença significativa entre camundongos infectados C57BL/6 WT e grupos infectados TLR2KO e TLR9KO, demonstrando aumento da expressão nesses grupos nocautes em relação ao WT.

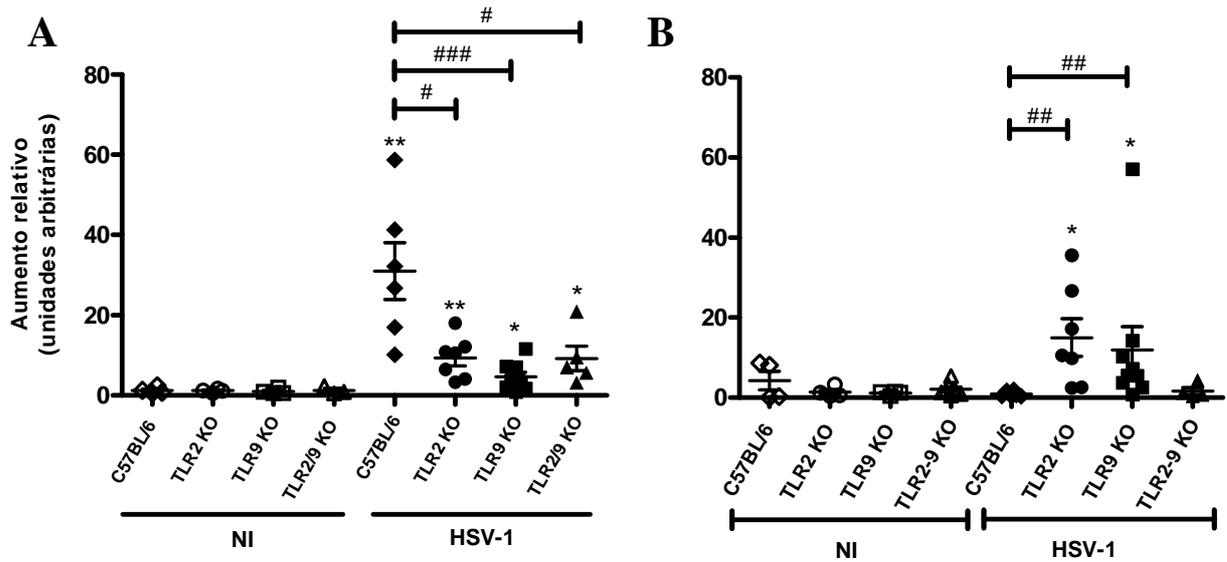


Figura 12 – Expressão de TLR 1. Os camundongos C57BL/6 e TLR2 KO, TLR9 KO e TLR2/9 KO foram infectados por via intranasal com 10^6 ufp de HSV-1 e no 5º dpi gânglios trigêmeos (A) e cérebros (B) dos animais foram coletados (N = 6 a 7). Animais controle aspiraram somente PBS (N=4). Após a extração de RNA e a transcrição reversa, foi realizada a PCR em tempo real, em duplicatas, e a expressão de cada gene foi normalizada em relação ao gene constitutivo HPRT. Análises estatísticas foram feitas com o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. As barras representam o S.E.M (*p<0,05; **p<0,01; #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001). NI, não infectado.

No ensaio de PCR em tempo real para determinar a expressão de TLR2 no gânglio trigêmeo (Figura 13A), os camundongos C57BL/6 WT e TLR9KO infectados apresentaram valores arbitrários $22,38 \pm 4,487$; $13,88 \pm 2,778$ respectivamente, e diferença significativa foi verificada entre os camundongos C57BL/6 WT e grupo TLR9KO e seus respectivos grupos não infectados. Não houve diferença entre os dois grupos infectados. Nos cérebros (Figura 13B), os grupos C57BL/6 WT e TLR9KO infectados apresentaram valores $1,471 \pm 0,4279$; $10,03 \pm 3,007$, respectivamente e diferença significativa foi verificada entre o grupo TLR9KO e seu respectivo grupo não infectado e também houve diferença significativa entre os grupos infectados C57BL/6 WT e TLR9KO demonstrando aumento da expressão do TLR2 no grupo KO.

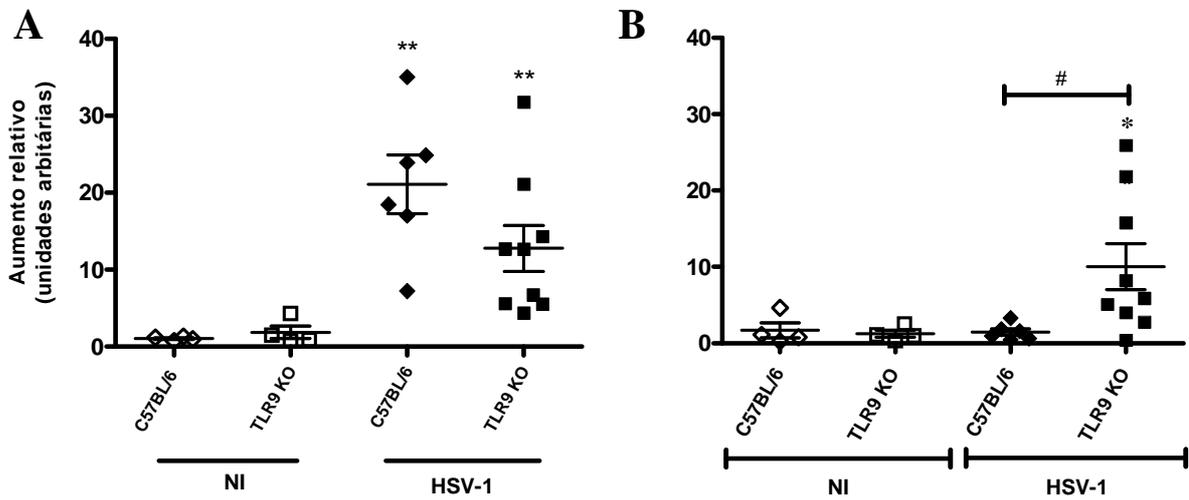


Figura 13 – Expressão de TLR 2. Os camundongos C57BL/6 e TLR9 KO foram infectados por via intranasal com 10^6 ufp de HSV-1 e no 5º dpi gânglios trigêmeos (A) e cérebros (B) dos animais foram coletados (N = 6 a 9). Animais controle aspiraram somente PBS (N=4). Após a extração de RNA e a transcrição reversa, foi realizada a PCR em tempo real, em duplicatas, e a expressão de cada gene foi normalizada em relação ao gene constitutivo HPRT. Análises estatísticas foram feitas com o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. As barras representam o S.E.M (*p<0,05; **p<0,01; #p<0,05). NI, não infectado. Valores para grupo TLR2 KO e TLR2/9 KO não apresentaram expressão dos genes pesquisados (dados não mostrados).

No ensaio de PCR em tempo real para determinar a expressão de TLR3, em gânglio trigêmeo (Figura 14A) de camundongos C57BL/6 WT, TLR2KO, TLR9KO e TLR2/9KO infectados, as unidades arbitrárias foram $10,41 \pm 1,624$; $9,828 \pm 1,001$; $8,317 \pm 0,8749$; $5,346 \pm 1,203$, respectivamente. Foi observada diferença significativa entre camundongos C57BL/6 WT e grupos nocautes e seus respectivos grupos não infectados. No cérebro (Figura 14B), os grupos C57BL/6 WT, TLR2KO, TLR9KO e TLR2/9KO infectados apresentaram valores $0,7633 \pm 0,1487$; $1,803 \pm 0,3872$; $2,094 \pm 0,4078$; $2,426 \pm 0,4553$, respectivamente. Foi observada diferença significativa entre grupos infectados de camundongos C57BL/6 WT e grupos nocautes infectados, demonstrando aumento da expressão do TLR3 nos grupos KOs.

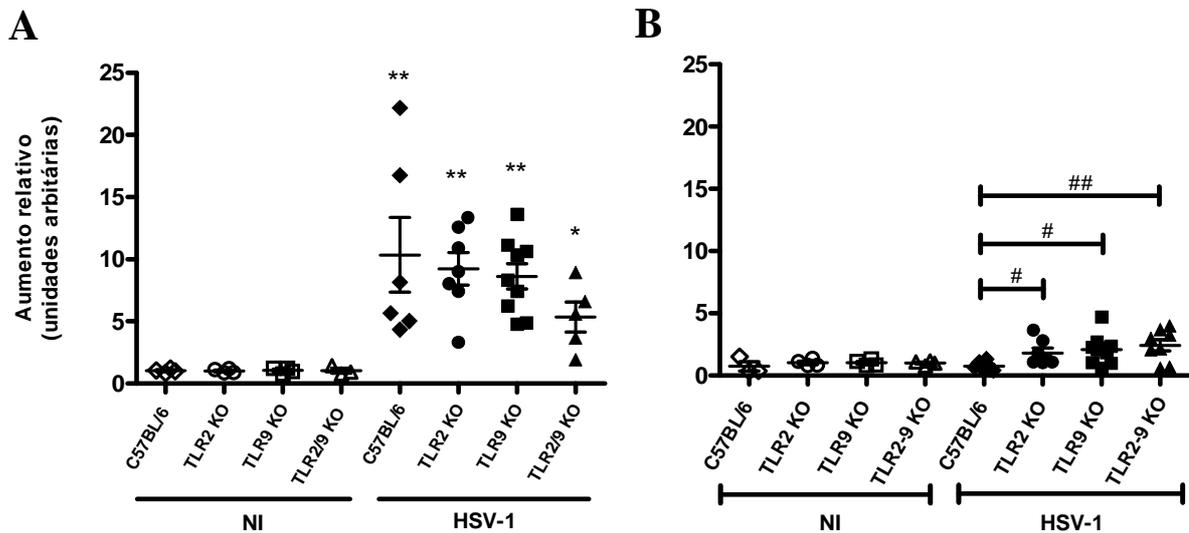


Figura 14 – Expressão de TLR 3. Os camundongos C57BL/6 e TLR2 KO, TLR9 KO e TLR2/9 KO foram infectados por via intranasal com 10^6 ufp de HSV-1 e no 5º dpi gânglios trigêmeos (A) e cérebros (B) dos animais foram coletados (N = 6 a 9). Animais controle aspiraram somente PBS (N=4). Após a extração de RNA e a transcrição reversa, foi realizada a PCR em tempo real, em duplicatas, e a expressão de cada gene foi normalizada em relação ao gene constitutivo HPRT. Análises estatísticas foram feitas com o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. As barras representam o S.E.M (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$). NI, não infectado.

No ensaio de PCR em tempo real para determinar a expressão de TLR6, em gânglio trigêmeo (Figura 15A) de camundongos C57BL/6 WT, TLR2KO, TLR9KO e TLR2/9KO infectados, as unidades arbitrárias foram $32,55\pm 12,13$; $11,38\pm 3,398$; $9,549\pm 3,456$; $6,230\pm 1,714$, respectivamente. Foi observada diferença significativa entre camundongos C57BL/6 WT, TLR2KO e TLR9KO e seus respectivos grupos não infectados e diferença significativa foi observada entre os camundongos infectados C57BL/6 WT, TLR9KO e TLR2/9 KO, com maior índice de expressão para os animais WT. No cérebro (Figura 15B), para os grupos C57BL/6 WT, TLR2KO, TLR9KO e TLR2/9KO infectados, os valores foram $1,132\pm 0,2452$; $23,79\pm 6,492$; $13,40\pm 8,225$, $1,712\pm 0,3552$, respectivamente. Foi observada diferença significativa entre grupos TLR2KO, TLR9KO e seus respectivos grupos não infectados e diferença significativa também foi observada entre os grupos infectados de C57BL/6 WT, TLR2KO e TLR9KO, com aumento da expressão nos animais nocautes.

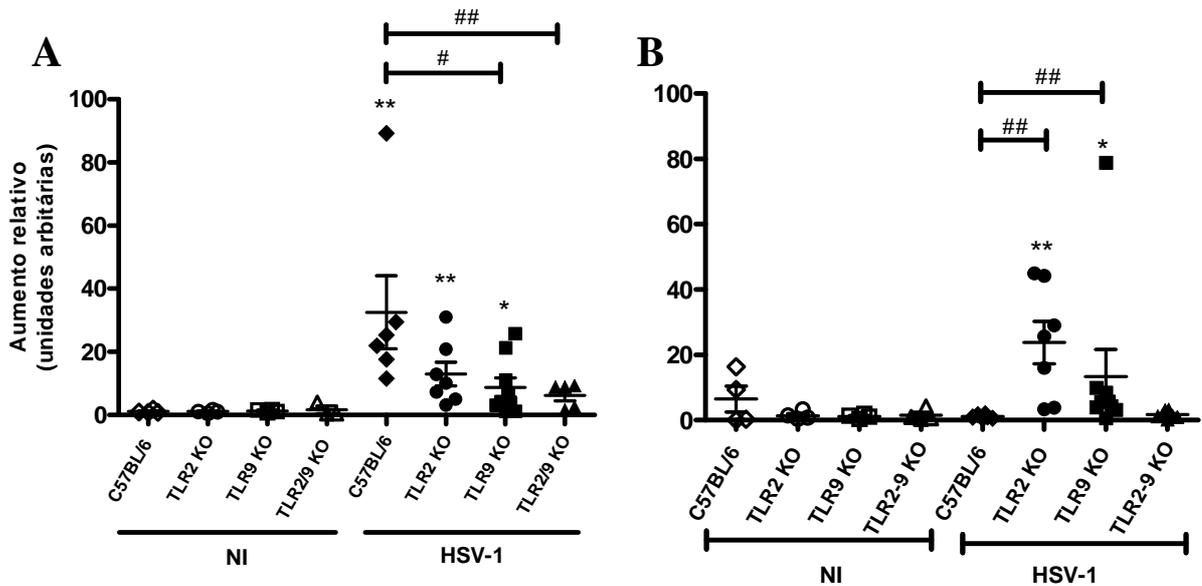
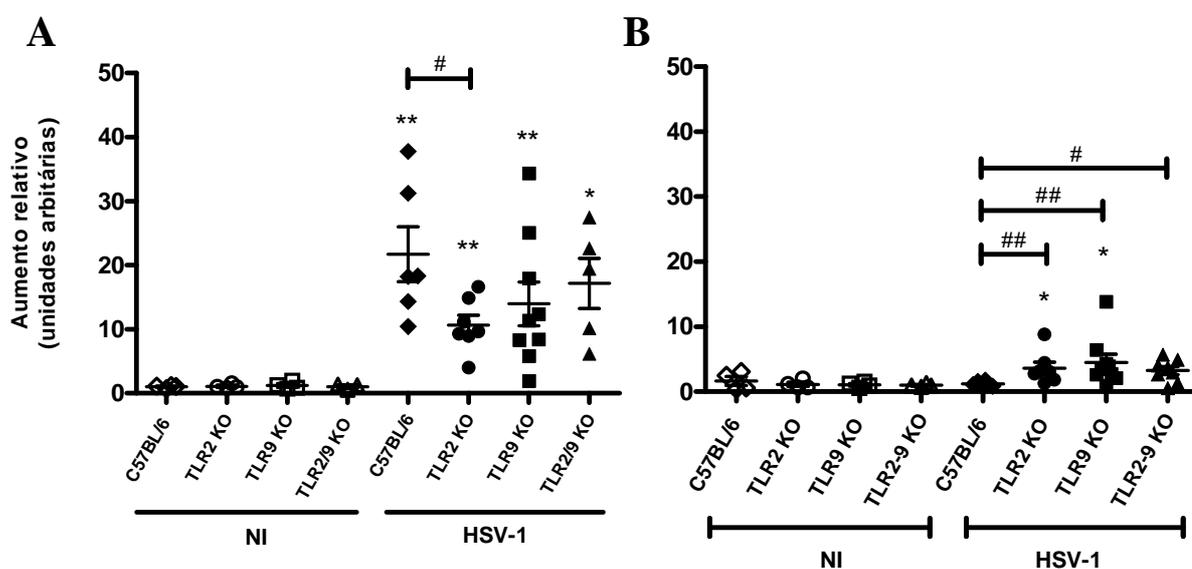


Figura 15 – Expressão de TLR 6. Os camundongos C57BL/6 e TLR2 KO, TLR9 KO e TLR2/9 KO foram infectados por via intranasal com 10^6 ufp de HSV-1 e no 5° dpi gânglios trigêmeos(A) e cérebros(B) dos animais foram coletados (N = 6 a 9). Animais controle aspiraram somente PBS (N=4). Após a extração de RNA e a transcrição reversa, foi realizada a PCR em tempo real, em duplicatas, e a expressão de cada gene foi normalizada em relação ao gene constitutivo HPRT. Análises estatísticas foram feitas com o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. As barras representam o S.E.M (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$). NI, não infectado.

As unidades arbitrárias de expressão de TLR7, em gânglio trigêmeo (Figura 16A) de camundongos C57BL/6 WT, TLR2KO, TLR9KO e TLR2/9KO infectados foram $21,73 \pm 5,048$; $10,72 \pm 1,510$; $13,05 \pm 2,712$; $17,17 \pm 3,945$ respectivamente. Foi observada diferença significativa entre os grupos C57BL/6 WT, TLR2KO e TLR9KO infectados e seus respectivos grupos controle não infectados e foi observada diferença significativa entre grupo infectado de camundongos C56BL/6 WT e TLR2KO, demonstrando diminuição de expressão do TLR7 nesse grupo nocaute. No cérebro (Figura 16B), dos grupos C57BL/6 WT, TLR2KO, TLR9KO e TLR2/9KO infectados os valores foram de $1,221 \pm 0,1760$; $3,628 \pm 0,9448$; $4,512 \pm 1,276$; $3,259 \pm 0,6145$, respectivamente. Foi observada diferença significativa entre grupos TLR2KO, TLR9KO e seus respectivos grupos controle não infectados e foi observada diferença significativa entre camundongos C57BL/6 WT, TLR2KO, TLR9KO e TLR2/9KO infectados, evidenciando aumento da expressão do TLR7 nos grupos nocautes.



No ensaio de PCR em tempo real para determinar a expressão de TLR9 no gânglio trigêmeo (Figura 17A) do C57BL/6 WT e camundongos TLR2KO infectados, as unidades arbitrárias foram 98.92 ± 19.09 ; 9.997 ± 2.145 , respectivamente. Foi observada diferença significativa entre os grupos C57BL/6 WT e TLR2KO infectados e seus respectivos grupos não infectados e foi observada diferença significativa entre camundongos C57BL/6 WT e TLR2KO infectados, demonstrando diminuição na expressão de TLR9 no grupo nocaute. No cérebro (Figura 17B), dos camundongos C57BL/6 WT e TLR2KO infectados, os valores foram de $1,312 \pm 0,2182$; $11,74 \pm 2,992$, respectivamente. Foi observada diferença significativa entre grupos infectados dos camundongos C57BL/6 WT e TLR2KO, com aumento na expressão de TLR9 no grupo nocaute, mas não entre os infectados e os controles não infectados.

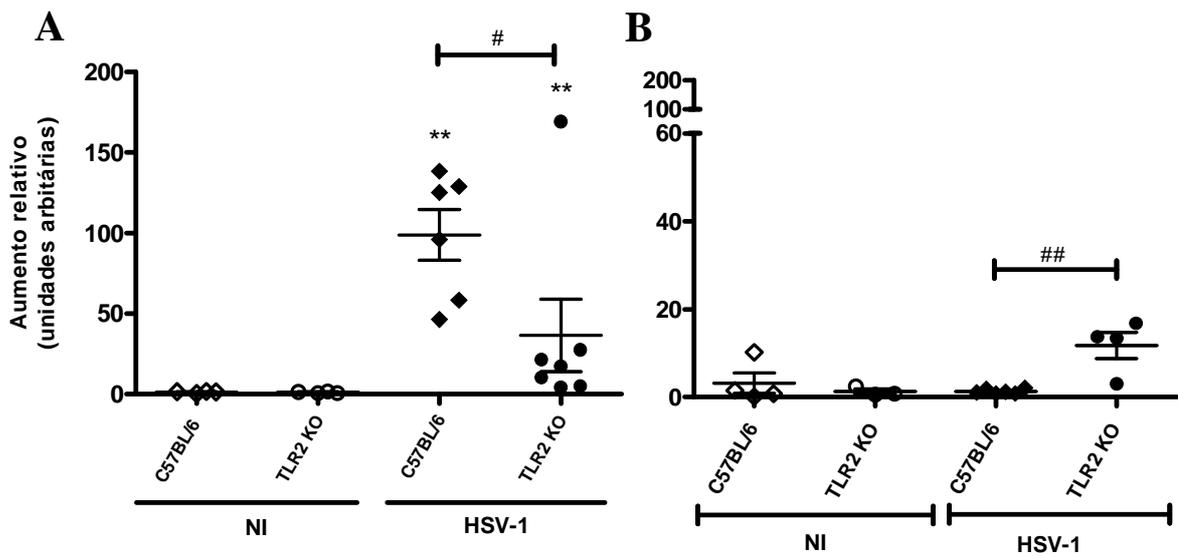


Figura 17 – Expressão de TLR 9. Os camundongos C57BL/6 e TLR2 KO, TLR9 KO e TLR2/9 KO foram infectados por via intranasal com 10^6 ufp de HSV-1 e no 5º dpi gânglios trigêmeos (A) e cérebros (B) dos animais foram coletados (N = 6 a 7). Animais controle aspiraram somente PBS (N=4). Após a extração de RNA e a transcrição reversa, foi realizada a PCR em tempo real, em duplicatas, e a expressão de cada gene foi normalizada em relação ao gene constitutivo HPRT. Análises estatísticas foram feitas com o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. As barras representam o S.E.M (**p<0,01; #p<0,05; ##p<0,01). NI, *não infectado*. Valores para grupo TLR9 KO e TLR2/9 KO não apresentaram expressão dos genes pesquisados (dados não mostrados).

Para melhor visualizarmos os resultados da expressão dos mRNAs dos diversos TLRs, foi montado um painel demonstrativo para facilitar este entendimento (Figura 18), e com utilização deste quadro conseguimos ter uma idéia mais clara das interrelações existentes entre a expressão dos TLRs, nos diferentes grupos analisados.

PRRs	Animais infectados			
	WT *	TLR2 KO	TLR9 KO	TLR2/9 KO
TLR1	↑ ND	↓ ↑	↓ ↑	↓ ND
TLR2	↑ ND	- -	↓ ↑	- -
TLR3	↑ ND	↓ ↑	↓ ↑	↓ ↑
TLR6	↑ ND	↓ ↑	↓ ↑	↓ ND
TLR7	↑ ND	↓ ↑	↓ ↑	↓ ↑
TLR9	↑ ND	↓ ↑	- -	- -

Figura 18 - Painel demonstrativo da interação entre TLRs. Expressão de TLRs no gânglio trigêmeo e cérebro nos grupos controle e diferentes grupos teste infectados com HSV-1 por via intranasal na titulação de 10^6 ufp. *Gânglio trigêmeo*, cor azul; *Cérebro*, cor vermelha; *Não detectado*, ND; *Diferença significativa*, setas cheias; *Tendência*, setas pontilhadas; * animais WT foram comparados ao controle de animais não infectados; os outros grupos foram comparados aos animais WT infectados.

5.2 Curva de sobrevivência dos camundongos

Para pesquisar os principais tipos de células de defesa e citocinas contra a infecção pelo HSV-1, em modelo experimental de encefalite herpética, foi realizado inicialmente experimento de curva de sobrevivência com os animais nocautes, RAG KO, CCL3 KO, iNOS KO e CD8 KO (todos background C57BL/6) além do C57BL/6 WT.

Uma curva de sobrevivência foi feita infectando os camundongos (N=10) com 10^4 ufp e outro experimento com 10^6 ufp de HSV-1, por via intranasal, como já foi feito em trabalho anterior do nosso grupo ⁽⁶⁾. Os animais foram diariamente examinados à procura de sinais de encefalite tais como prostração, eriçamento de pêlos, encurvamento de dorso e paralisia de membros (Figura 19). Animais que apresentassem estes sinais foram sacrificados, e tiveram seus cérebros coletados e rapidamente congelados para posterior análise para a presença do vírus.

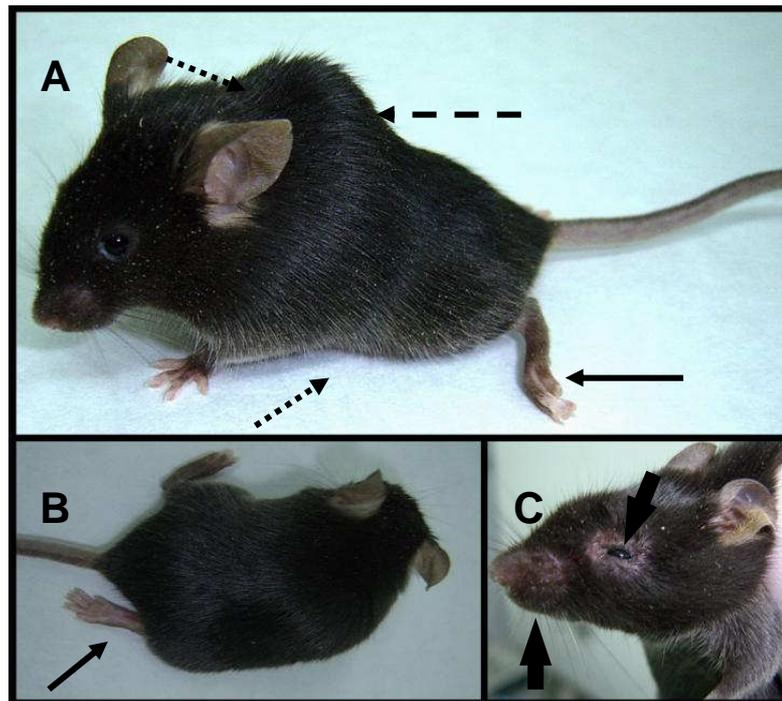


Figura 19 – Sinais clínicos de infecção por HSV-1. Camundongos C57BL/6 WT, CCL3 KO, CD8 KO, RAG KO e iNOS KO foram infectados em dois experimentos distintos com 10^4 ufp e 10^6 ufp de HSV-1 intranasal, e diariamente monitorados nos dias subsequentes para avaliação dos sinais clínicos e da mortalidade. As fotos demonstram exemplos de sinais graves da infecção por HSV-1 quando animais são acometidos por encefalite, e também quando não desenvolvem a patologia no sistema nervoso central. Em (A), sinais de encefalite como piloereção (setas pontilhadas), arqueamento de dorso (seta tracejada), e paralisia de membro traseiro (seta inteira). Em (B), uma visão mais ampla de um animal com paralisia de membro traseiro (seta inteira). Em (C), animal com sinais mais brandos da infecção, como queda de pêlos no focinho e ao redor do olho (setas largas). Fonte: LIMA, 2010 (modificado).

Os animais não infectados (N=5) apresentaram taxa de sobrevivência de 100% e o grupo C57BL/6 WT infectado com 10^4 ufp também apresentou sobrevida de 100%. Os animais CCL3 KO, CD8 KO, RAG KO e iNOS KO, infectados com 10^4 ufp, apresentaram taxa de sobrevivência de 80%, 30%, 0% e 0% respectivamente (Figura 20A). O grupo C57BL/6 WT infectado com 10^6 ufp apresentou sobrevida de 90%. Os animais CCL3 KO, CD8 KO, RAG KO e iNOS KO, infectados com 10^6 ufp, apresentaram taxa de sobrevivência de 50%, 0%, 0% e 0% respectivamente (Figura 20B). Animais nocautes para células T CD8 obtiveram sobrevivência de 30% mas os animais RAG KO, nocautes para linfócitos B e linfócitos T⁽³⁾, obtiveram 0% de sobrevivência.

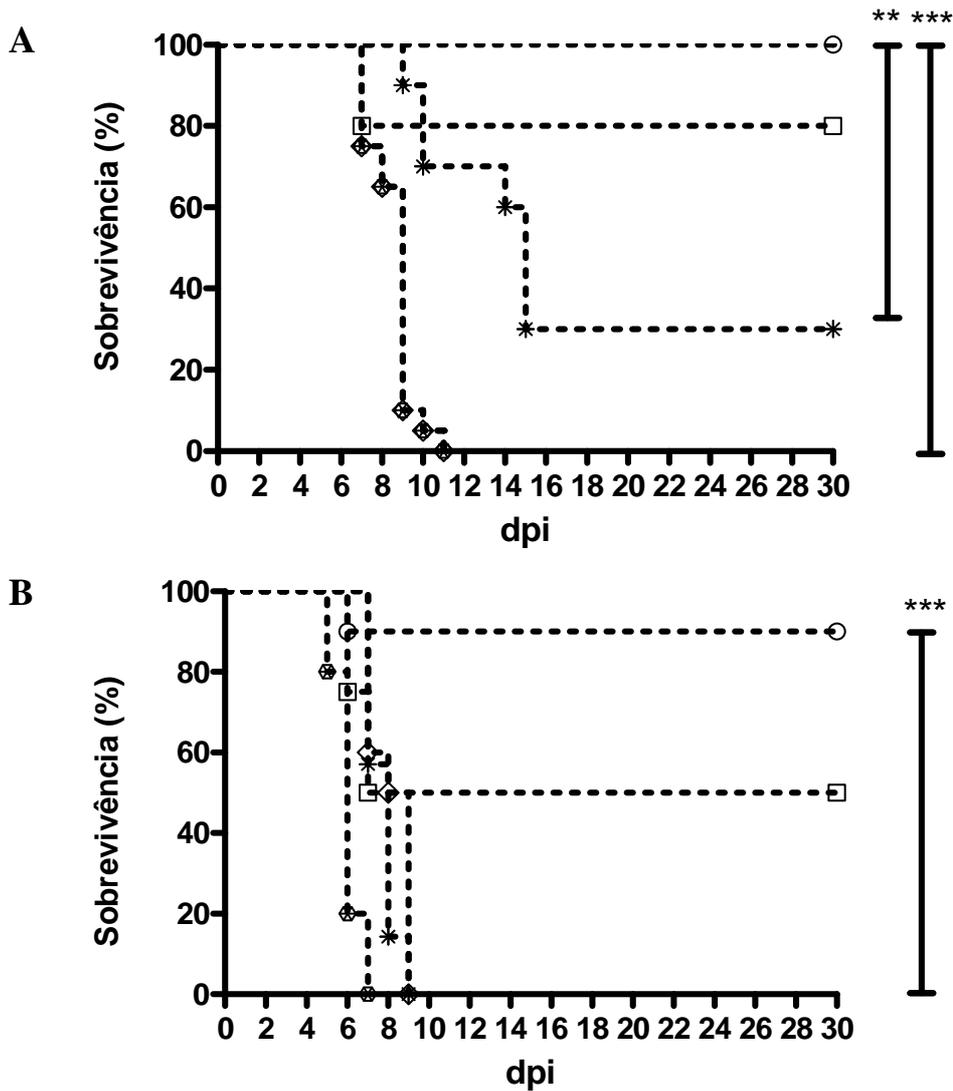


Figura 20 - As taxas de sobrevivência de camundongos. Animais que inalaram 10^4 ufp (A) e 10^6 ufp (B) de HSV-1 (N=10 para cada grupo). C57BL/6 WT (círculo), CCL3 KO (quadrado), CD8 KO (asterisco), iNOS KO (losangos) e RAG KO (círculo + asteriscos). A mortalidade dos camundongos foi quantificada por dia. Análises estatísticas foram feitas com o teste Log-rank. (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5.3 Expressão de citocinas em animais WT e KOs infectados por HSV-1

Seguindo a linha de pesquisa dos principais tipos de células de defesa e citocinas contra a infecção pelo HSV-1, com o uso de PCR em tempo real utilizamos animais C57BL/6, RAG KO, CCL3 KO (MIP-1 α KO) e iNOS KO e neles verificamos a expressão de VP-16, MCP-1 (CCL2), iNOS, IP-10 (CXCL10), Rantes (CCL5) e TNF- α , no 5º dpi, nos gânglios trigêmeos (Figura 21).

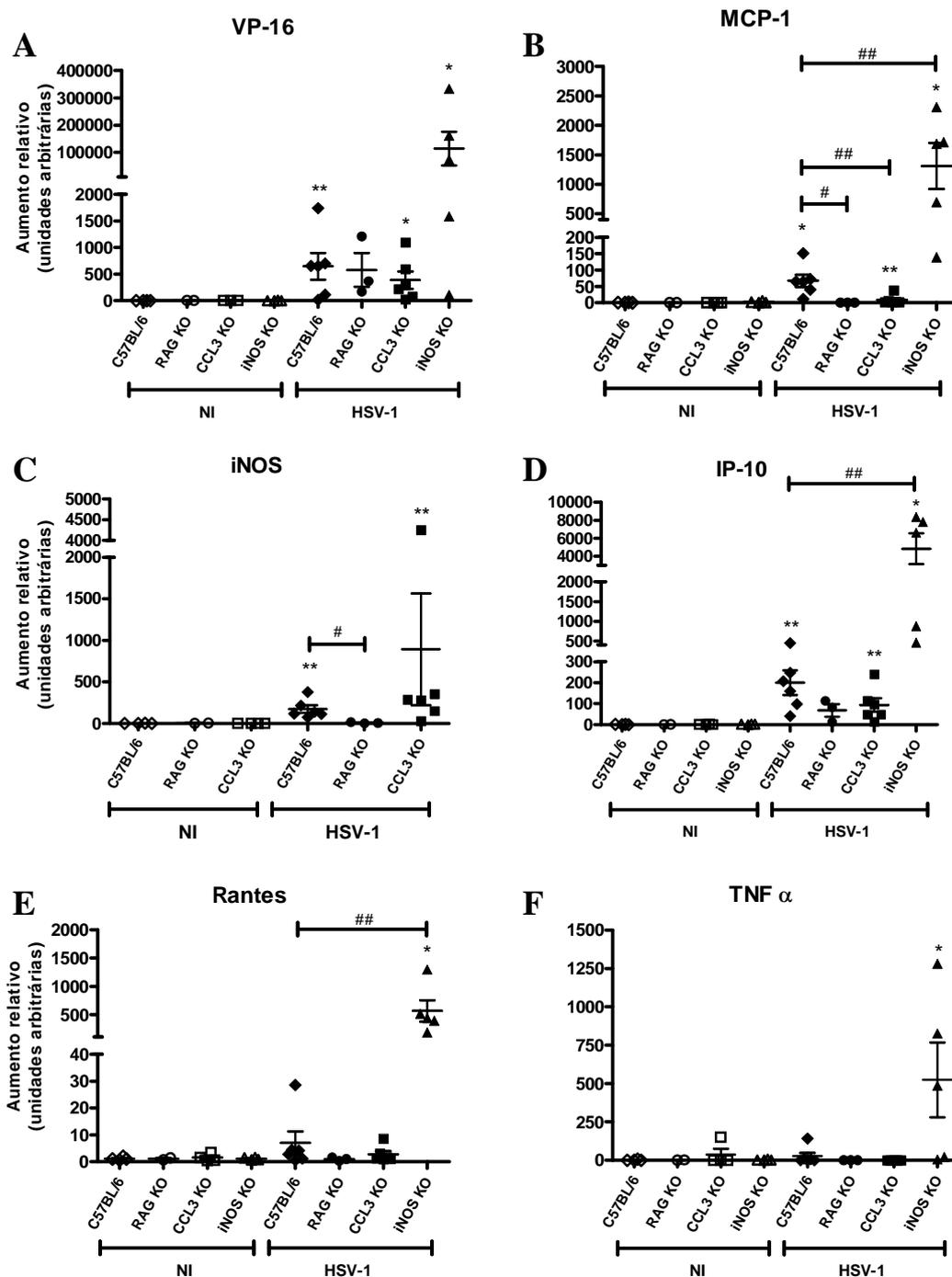


Figura 21 – Expressão de VP-16 viral e quimiocinas e citocinas do hospedeiro. Os camundongos C57BL/6 e RAG KO, CCL3 KO e iNOS KO foram infectados por via intranasal com 10^6 ufp de HSV-1 e no 5° dpi gânglios trigêmeos dos animais foram coletados (N=3 a 6). Animais controle aspiraram somente PBS(N=3 a 4). Após a extração de RNA e a transcrição reversa, foi realizada a PCR em tempo real, em duplicatas, e a expressão de cada gene foi normalizada em relação ao gene constitutivo HPRT. Análises estatísticas foram feitas com o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. As barras representam o S.E.M (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$). NI, não infectado.

A expressão de transcritos de VP-16 (Figura 21A) apresentou aumento significativo entre os grupos infectados C57BL/6 WT, CCL3 KO e iNOS KO em relação aos seus controles não infectados. Não houve diferença estatística entre os grupos infectados nocautes

e o WT infectado, apesar de evidenciar tendência a aumento desta proteína no grupo de animais iNOS KO em relação aos animais WT.

Os dados da expressão de MCP-1 (Figura 21B) apresentaram aumento significativo para os grupos infectados C57BL/6 WT, CCL3 KO e iNOS KO em relação aos seus controles não infectados; entretanto apresentaram diminuição significativa em RAG KO e CCL3 KO infectados em relação ao WT infectado e aumento significativo em iNOS KO em relação ao WT infectado.

Os dados da expressão de iNOS (Figura 21C) apresentaram aumento significativo para os grupos infectados C57BL/6 WT e CCL3 KO em relação aos seus controles não infectados; entretanto apresentaram somente diferença significativa na diminuição de expressão de iNOS no grupo RAG KO infectado em relação ao WT infectado.

Os dados da expressão de IP-10 (Figura 21D) apresentaram aumento significativo para os grupos infectados C57BL/6 WT, CCL3 KO e iNOS KO em relação aos seus controles não infectados; entretanto apenas apresentaram diferença significativa com aumento de IP-10 no grupo iNOS KO em relação ao WT infectado.

Os dados da expressão de Rantes (Figura 21E) apresentaram aumento significativo somente para o grupo infectado iNOS KO em relação ao seu controle não infectado. Da mesma forma apresentaram aumento significativo de Rantes no grupo iNOS KO infectado em relação ao não infectado e em relação ao C57BL/6 WT infectado. Os dados da expressão de TNF- α (Figura 21F) apresentaram somente aumento significativo para o grupo infectado iNOS KO em relação ao seu controle não infectado.

5.4 Histologia e imunofluorescência dos gânglios trigêmeos de animais WT e KOs infectados

Ainda no intuito de descobrir quais células são as responsáveis pela imunidade no gânglio trigêmeo contra infecção por HSV-1, lançamos mão da técnica de histologia e imunofluorescência. A histologia (Figura 23) os tecidos foram fixados em formol e cortados em micrótomo e a imunofluorescência (Figura 22 e 24) foram realizadas em cortes histológicos de peças congeladas em Tissue-Tek O.C.T. compound (Sakura, Netherlands) e fixadas em lâminas recobertas com gelatina. A histologia foi usada para verificar celularidade no gânglio trigêmeo e a imunofluorescência para verificar quais células de defesa poderiam estar envolvidas na manutenção da imunidade contra o vírus. Foram alvos de pesquisa macrófagos (F4/80 e CD11b), células T (CD3+, CD4+ e CD8+) e dendríticas.

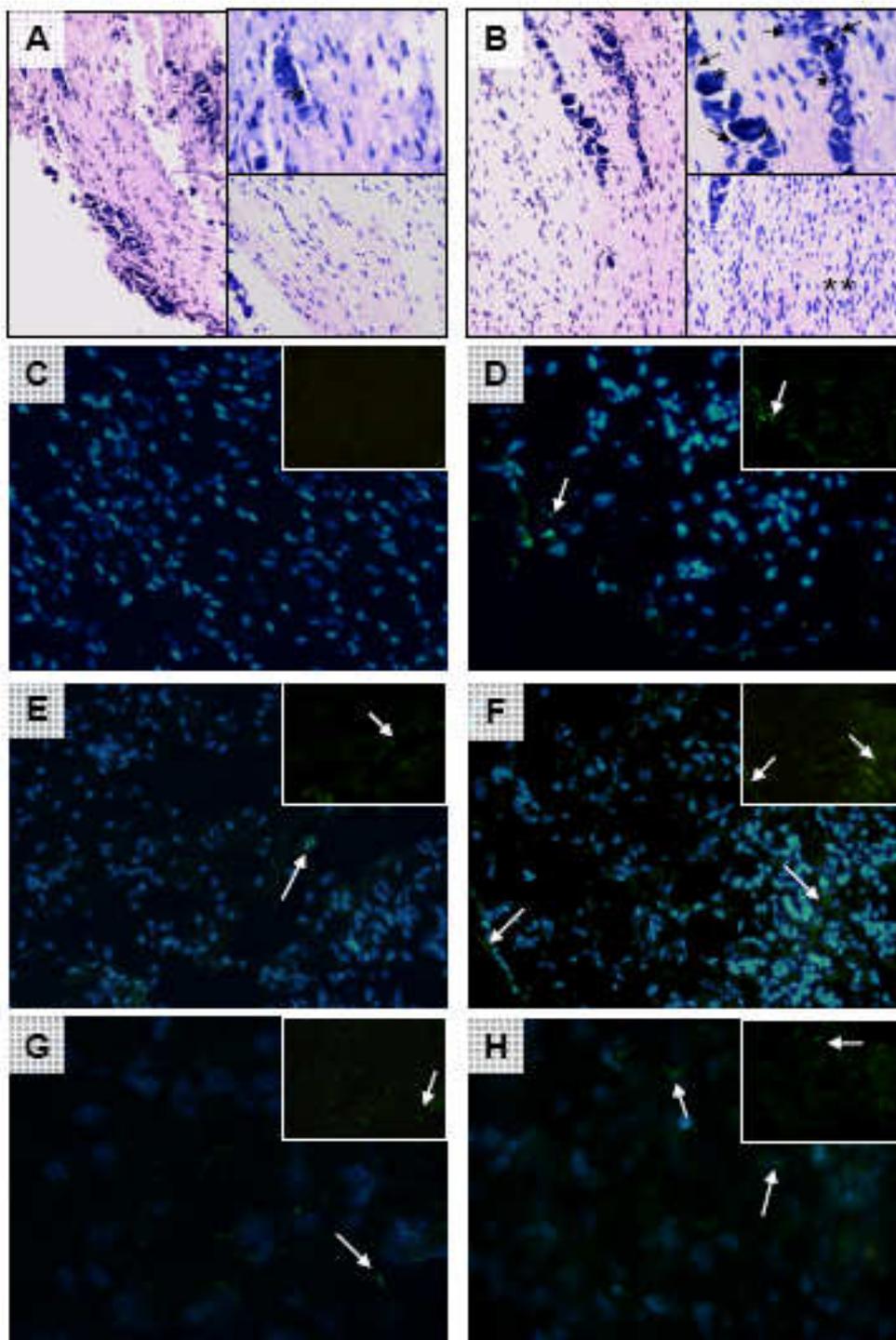


Figura 22 – Histologia e imunofluorescência de gânglios trigêmeos de camundongos C57BL/6 WT. Camundongos C57BL/6 WT foram infectados com 10^6 ufp de HSV-1 ou PBS (controles) por via intranasal e no 5° d.p.i. (dia pós infecção) o gânglio trigêmeo foi coletado e processado para análise. Coloração de Giemsa em diferentes áreas dos gânglios WT controle (A) e dos WT infectados (B) demonstraram aumento da celularidade no gânglio (**) e perto dos neurônios (*), onde grande quantidade de células mononucleares foram detectadas nos animais infectados (setas). (C- H): As lâminas dos gânglios foram incubadas com anticorpos primários e Alexa Fluor 488 cabra IgG anti-rato e contrastados com Hoechst para marcação de núcleo celular. Painéis mostram detalhes de imunofluorescência de células ganglionares superpostos com o corante Hoechst. (C) Controle negativo WT (Imunofluorescência foi negativa para todos os indicadores testados, esta imagem representativa para todos apresenta coloração negativa para CD3) 200×; (D) F4/80 200×; (E) CD11b 200×; (F) Células dendríticas 200×; (G) CD3 400×; (H) CD8 400×. (A e B): esquerda e abaixo a direita, 100× ampliação do córtex e medula do gânglio; (A e B) acima a direita, 400× ampliação do gânglio.

Um aumento de celularidade nos gânglios trigêmeos foi encontrado nos cortes histológicos dos animais infectados, o que não ocorreu nos gânglios dos animais não infectados (PBS). Quanto à técnica de imunofluorescência, esta foi capaz de evidenciar através de marcação positiva em gânglios de animais infectados, presença de macrófagos (F4/80 e CD11b) (Figura 22D e 22E) e células T(CD3) (Figura 22G). As células apresentaram marcação positiva para marcadores CD8 (células T CD8+) (Figura 22H), mas foram negativas para CD4 (dados não mostrados). As células dendríticas (Figura 22F) evidenciaram também positividade, mas apresentaram um background que impossibilitou diagnóstico conclusivo.

Também foi feita histologia com coloração de HE dos gânglios trigêmeos dos animais WT, TLR2 KO, TLR9 KO e TLR2/9 KO para analisar e diferenciar o nível de infiltração e lesões causadas aos gânglios trigêmeos, 5 dias após infecção, com o HSV-1 (Figura 23). Os animais C57 WT infectados (Figura 23B) apresentam sua arquitetura relativamente alterada pela presença de um infiltrado inflamatório difuso, com alterações dos corpos neuronais tais como reforço da borda citoplasmática, e vacuolização perinuclear. A celularidade estava aumentada, sugerindo proliferação celular glial ou infiltração de células mononucleares.

Nos animais TLR2 KO infectados (Figura 23D), o infiltrado foi mais expressivo e difuso em relação ao grupo infectado C57BL/6 WT e houve edema intersticial (setas). Nota-se presença de polimorfonucleares (inserto, seta) próximo a áreas de degeneração e necrose neuronal (asterisco).

Nos animais TLR9 KO (Figura 23F) o infiltrado foi visivelmente mais intenso que nos grupos anteriores, com maiores fenômenos alterativos da inflamação, como sinais de degeneração neuronal, acidofila citoplasmática, dissolução dos limites citoplasmáticos. O infiltrado era muito rico em células polimorfonucleares (seta).

Nos animais TLR2/9 KO (Figura 23H), os aspectos foram muito semelhantes aos dos animais TLR9, com intensas alterações internas dos corpos neuronais (asterisco), que foram substituídos ou rodeados por células polimorfonucleares (seta). O infiltrado inflamatório foi discretamente menos difuso que no grupo anterior.

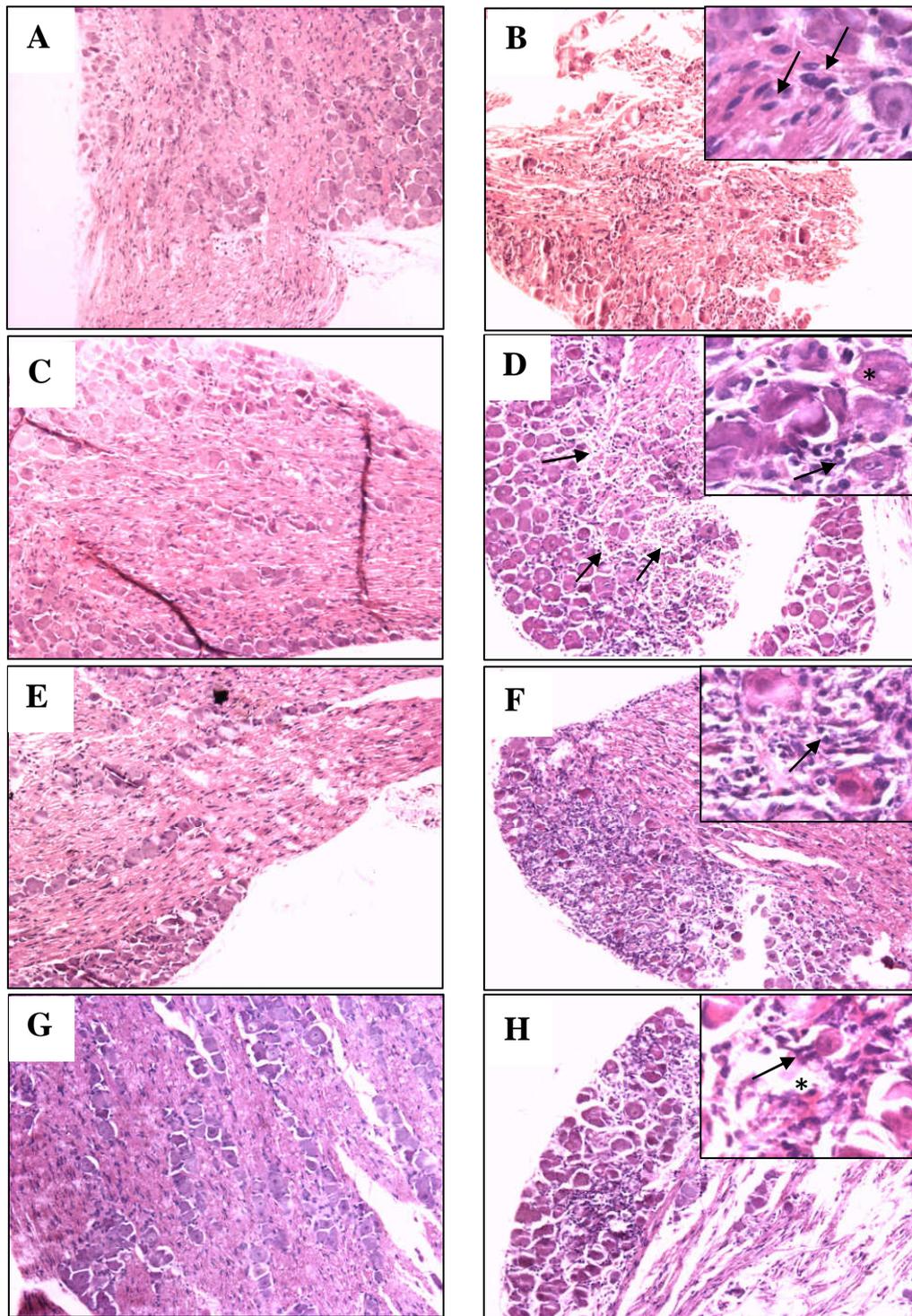


Figura 23 – Histologia dos gânglios trigêmeos de camundongos C57BL/6 WT e KOs. Os animais foram infectados com 10^6 ufp de HSV-1 ou PBS (controles) por via intranasal. No 5° d.p.i. (dia pós infecção), os gânglios trigêmeos foram coletados e processados para análise histológica em diferentes áreas dos gânglios trigêmeos dos animais não infectados: WT(A), TLR2 KO(C), TLR9 KO(E) e TLR2/9 KO(G), e dos infectados: WT(B), TLR2 KO(D), TLR9 KO(F) e TLR2/9 KO(H). Observou-se o aspecto normal da arquitetura e celularidades nos grupos não infectados. Todos os animais infectados apresentaram alterações inflamatórias com aumento visível da celularidade e marcadores histológicos de fenômenos vasculares (edema) e alterações inflamatórias. Observou-se maior intensidade do infiltrado difuso e acompanhado de fenômenos degenerativos no grupo TLR9 KO(F), quando comparado aos demais. O menor grau de inflamação foi no animal WT infectado (B). Tanto no TLR9 KO(F) quanto no TLR2/9 KO(H) houve alterações degenerativas neuronais e infiltrado inflamatório com polimorfonucleares. Imagens aumento 100× e insertos 400×.

Também foi realizado ensaio de imunofluorescência para verificar a expressão de iNOS e também a sua produção por macrófagos (F4/80). A expressão de iNOS (verde) não foi significativa nos gânglios trigêmeos dos animais não infectados (Figura 24A e E) e também a dupla marcação para F4/80 (verde) e iNOS(vermelho) nos animais não infectados (Figura 24C e G) não apresentaram marcação significativa.

Os animais C57BL/6 WT infectados (Figura 24B), apresentaram no citoplasma prolongamentos finos que foram corados em verde (inserto). Notou-se que a maior parte do infiltrado inflamatório (núcleos corados em azul pelo corante Hoesch) estavam expressando a enzima induzida. Nestes mesmos animais, quando fizemos uma marcação dupla F4/80 e iNOS (Figura 24D), observamos que os animais infectados expressaram iNOS, e apresentaram considerável superposição da marcação para mononucleares, indicando serem estas células infiltrantes a principal fonte de produção de iNOS, apesar de muita coloração dos núcleos não colocalizarem com marcação para F4/80 (verde) nem para iNOS (vermelho) (Figura 24D). Algumas células F4/80 positivas não expressaram iNOS (seta grossa). No entanto um considerável número de células apresenta dupla marcação (setas, inserto).

Nos animais TLR2/9 KO infectados, a marcação para iNOS (Figura 24F) foi muito discreta (setas longas). Embora um infiltrado inflamatório fosse intenso, predominaram polimorfonucleares, que não marcam para F4/80 (Figura 24H) conforme foi demonstrado, onde se observou um grande número de núcleos contracorados, alguns com morfologia segmentada (setas longas). Raras células mononucleares com coloração para F4/80 estavam visíveis no inserto (setas). A coloração para iNOS foi praticamente inexistente, mesmo no citoplasma das célula F4/80 positivas (quadro pontilhado).

As lâminas dos gânglios, utilizadas para marcação simples, foram incubadas com anticorpos primários para iNOS e Alexa Fluor 488 cabra IgG anti-coelho e contrastados com Hoechst para marcação de núcleo celular (Figuras 24A, B; E, F). As lâminas dos gânglios, utilizadas para marcação dupla, foram incubadas com anticorpos primários para F4/80 Alexa Fluor 488 cabra IgG anti-rato e para iNOS Alexa Fluor 546 cabra IgG anti-coelho contrastados com Hoechst para marcação de núcleo celular (Figuras 24C, D; G, H). Painéis (Figura 24) mostram detalhes de imunofluorescência de células ganglionares superpostos com o corante para núcleos (Hoechst).

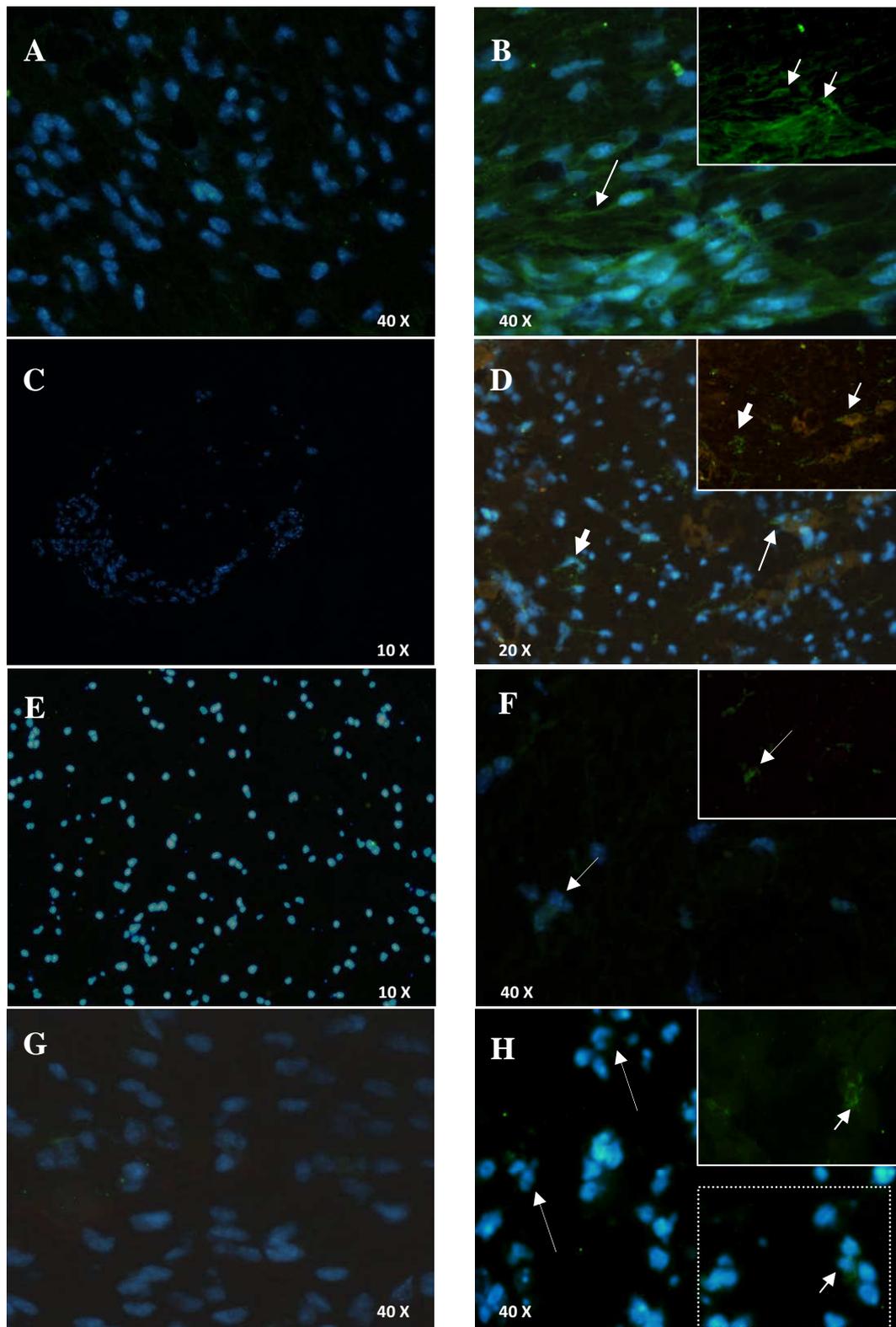


Figura 24 – Imunofluorescência de gânglios trigêmeos de camundongos C57BL/6 WT e TLR2/9 KO. Camundongos C57BL/6 WT (A, B, C, D) e TLR2/9 KO (E, F, G, H) foram infectados com 10^6 ufp de HSV-1 ou PBS (não infectados) por via intranasal e no 5° d.p.i. (dia pós infecção) o gânglio trigêmeo foi coletado e processado para análise. (A) iNOS WT não infectado, 400×; (B) iNOS WT infectado, 400×; (C) F4/80 + iNOS WT não infectado, 100×; (D) F4/80 + iNOS WT infectado, 200×; (E) iNOS TLR2/9 KO não infectado, 100×; (F) iNOS TLR2/9 KO infectado, 400×; (G) iNOS + F4/80 TLR2/9 KO não infectado, 400×; (H) iNOS + F4/80 TLR2/9 KO infectado, 400×. Setas finas (B e F) indicam marcação de iNOS; Setas largas (D) indica marcação somente para F4/80 e setas finas (D) indicam dupla marcação para F4/80 e iNOS; Setas curtas (H) indicam marcação para F4/80 e setas longas e finas (H) indicam núcleos corados característicos de polimorfonucleares.

5.5 Citometria de fluxo dos gânglios trigêmeos e linfonodos de animais WT infectados

Os linfonodos cervicais superficiais (Figura 25) também foram analisados devido à hipertrofia que eles apresentaram quando animais C57BL/6 WT foram infectados.

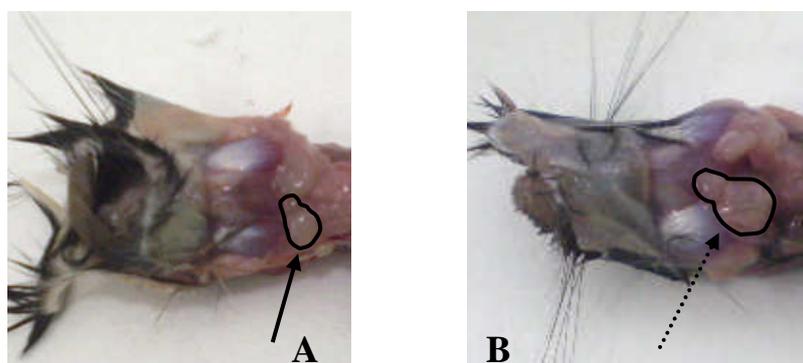


Figura 25 – Aspectos macroscópicos dos linfonodos cervicais superficiais de C57BL/6 WT. Linfonodo de animais que inalaram PBS (A) e os animais que inalaram 10^6 ufp de HSV-1 (B). Linfonodos apresentam aspectos distintos, animal não infectado (seta contínua) de tamanho normal e animal infectado com linfonodo hipertrofiado (seta pontilhada).

Adicionalmente à técnica de imunofluorescência, utilizamos também a quantificação dos tipos celulares por citometria de fluxo. Após processar os órgãos e preparar as amostras, foram adquiridos entre 100.000 a 200.000 eventos e analisados pelo programa FlowJo 7.2.5. Os “gates” (Figura 26) utilizados para marcar a população de interesse nos gânglios trigêmeos foram baseados em dados da literatura ⁽¹²⁵⁾.

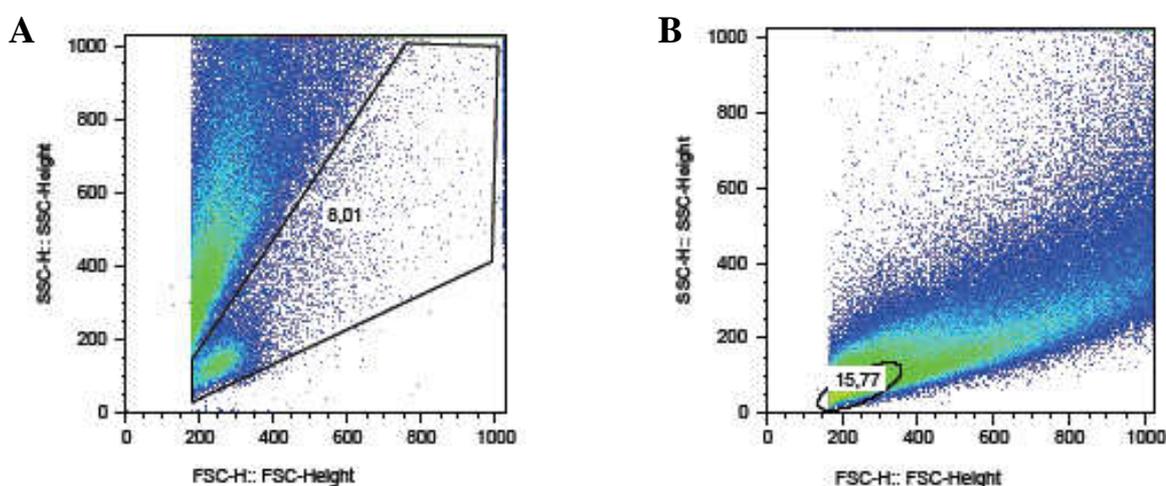


Figura 26 – “Gates” utilizados para selecionar a população de interesse nas amostras. Animais C57BL/6 WT controle inalaram PBS e os infectados inalaram 10^6 ufp de HSV-1. Após 5 dias da infecção, gânglios trigêmeos e linfonodos foram coletados e processados. Foram pesquisados macrófagos e células dendríticas (A) e células T CD4, CD8, NK e também produção de $IFN\gamma$ (B). Para pesquisa de linfócitos, a utilização de permeabilizante de membrana celular diminuiu a granulosidade das células, por isso o perfil apresentado pelas células na imagem de aquisição é diferente.

Após análise dos dados adquiridos (Figura 27A) verificamos que no GT ocorre aumento na porcentagem da população celular para todos os leucócitos pesquisados, comparando o grupo infectado ao controle, mas somente os macrófagos apresentaram aumento significativo em relação ao grupo não infectado. Apesar de não apresentar aumento significativo na população celular de células T CD8, entre células de animais infectados e não infectados, as células provenientes de animais infectados apresentaram aumento significativo na produção de IFN γ em relação ao grupo controle (Figura 27B). Esta citocina demonstrou em pesquisa realizada por nosso grupo ser importante para manutenção de uma adequada resposta imune no gânglio trigêmeo ⁽⁵⁵⁾.

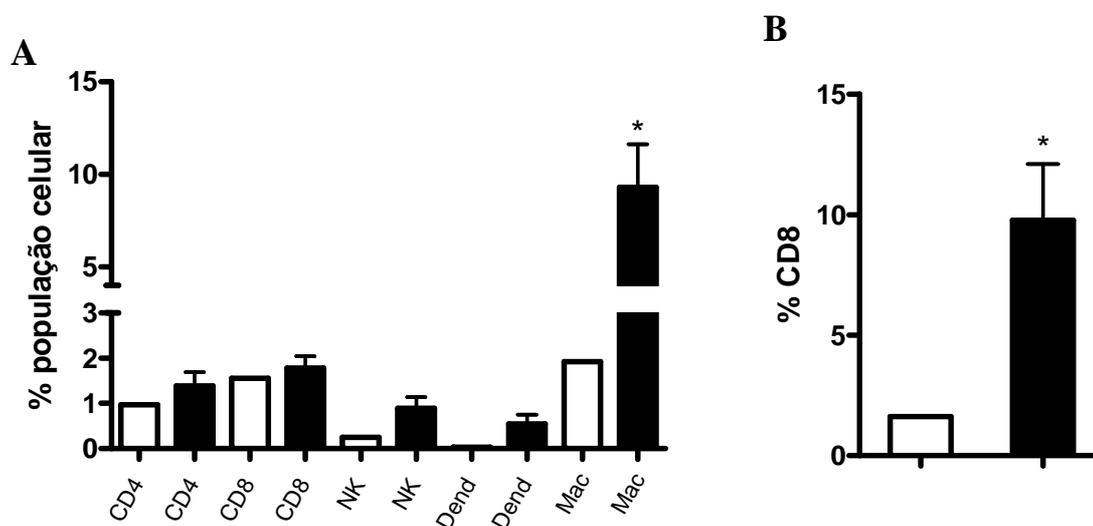


Figure 27 – Gânglio trigêmeo (GT) de camundongos C57BL/6 WT infectados com HSV-1 apresentam aumento populacional de macrófagos e aumento de produção de IFN γ pelas células CD8. Camundongos foram infectados via intranasal com 10^6 ufp de HSV-1, e GT de 5 animais/grupo foi coletado no 5^o d.p.i. Camundongos controle aspiraram somente PBS (n=4 para cada grupo). GTs foram tratados com collagenase e análise de população celular foi realizada por citometria de fluxo, usando anticorpos contra as células indicadas (A). Anticorpo contra IFN γ foi utilizado nas células marcadas para T CD8 (B). Todos os dados apresentados por média \pm SEM, $P < 0,05$ por teste *t* comparativo. barras brancas, amostras não infectadas; barras pretas, amostras infectadas. NK, células natural killer; Dend, células dendríticas; Mac, macrófagos.

Nos linfonodos cervicais superficiais, verificamos que não ocorreu aumento na porcentagem da população celular para os leucócitos pesquisados (Figura 28A), comparando-se o grupo infectado ao controle.

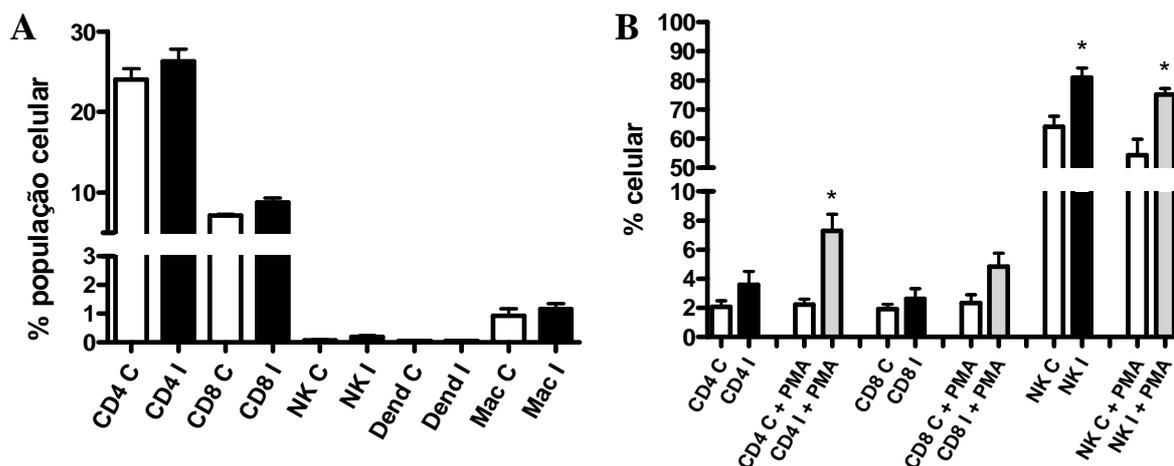


Figure 28 – Linfonodos cervicais superficiais de camundongos C57BL/6 WT infectados com HSV-1 apresentam aumento de produção de IFN γ pelas células NK e pelas CD4 e NK quando estimuladas com PMA. Camundongos foram infectados via intranasal com 10^6 ufp de HSV-1, e linfonodos de 5 animais/grupo foram coletados no 5^o d.p.i. Camundongos controle aspiraram somente PBS (n=4 para cada grupo). Linfonodos foram tratados com colagenase e análise de população celular foi realizada por citometria de fluxo, usando anticorpos contra as células indicadas (A). Anticorpo contra IFN γ foi utilizado nas células T (CD4 e CD8) e NK (B). Todos os dados apresentados por média \pm SEM, $P < 0,05$ por teste *t* comparativo. C, controle; I, infectado; barras brancas, amostras não infectadas com ou sem PMA; barras pretas, amostras infectadas; barras cinzas, amostras infectadas + PMA. NK, células natural killer; Dend, células dendríticas; Mac, macrófagos.

Apesar de não apresentar aumento significativo na população celular, entre células de animais infectados e não infectados, as células NK provenientes de animais infectados apresentaram aumento significativo na produção de IFN γ em relação ao grupo controle, e o mesmo ocorre com as células NK e CD4 de animais infectados e após estimuladas com PMA (Figura 28B). Também utilizamos amostras pós-estimuladas com proteínas de HSV-1, após serem inativados pelo calor, mas não obtivemos resposta. Esta citocina demonstrou em pesquisa realizada por nosso grupo ser importante para manutenção de uma adequada resposta imune no gânglio trigêmeo ⁽⁵⁶⁾.

5.6 Expressão de citocinas nos linfonodos de animais WT e KOs infectados por HSV-1

Linfonodos cervicais dos animais C57BL/6 WT, TLR2 KO, TLR9 KO e TLR2/9 KO foram utilizados e neles verificamos a expressão de IFN γ , IL-1 beta, IL-12 p40, IP-10 (CXCL10) e MCP-1 (CCL2) (Figura 29). Foi demonstrado aumento da expressão de IFN γ e IL-1 beta nos C57BL/6 WT (Figura 29A e 29B) e aumento de IL-12 p40 e MCP-1 nos animais TLR9 KO (Figura 29C e 29E) em relação aos demais grupos infectados. Entretanto, para expressão de IP-10 (Figura 29D), demonstramos diferença significativa do grupo WT e TLR9 KO infectado em relação aos seus grupos não infectados, mas não verificamos diferença entre os grupos infectados.

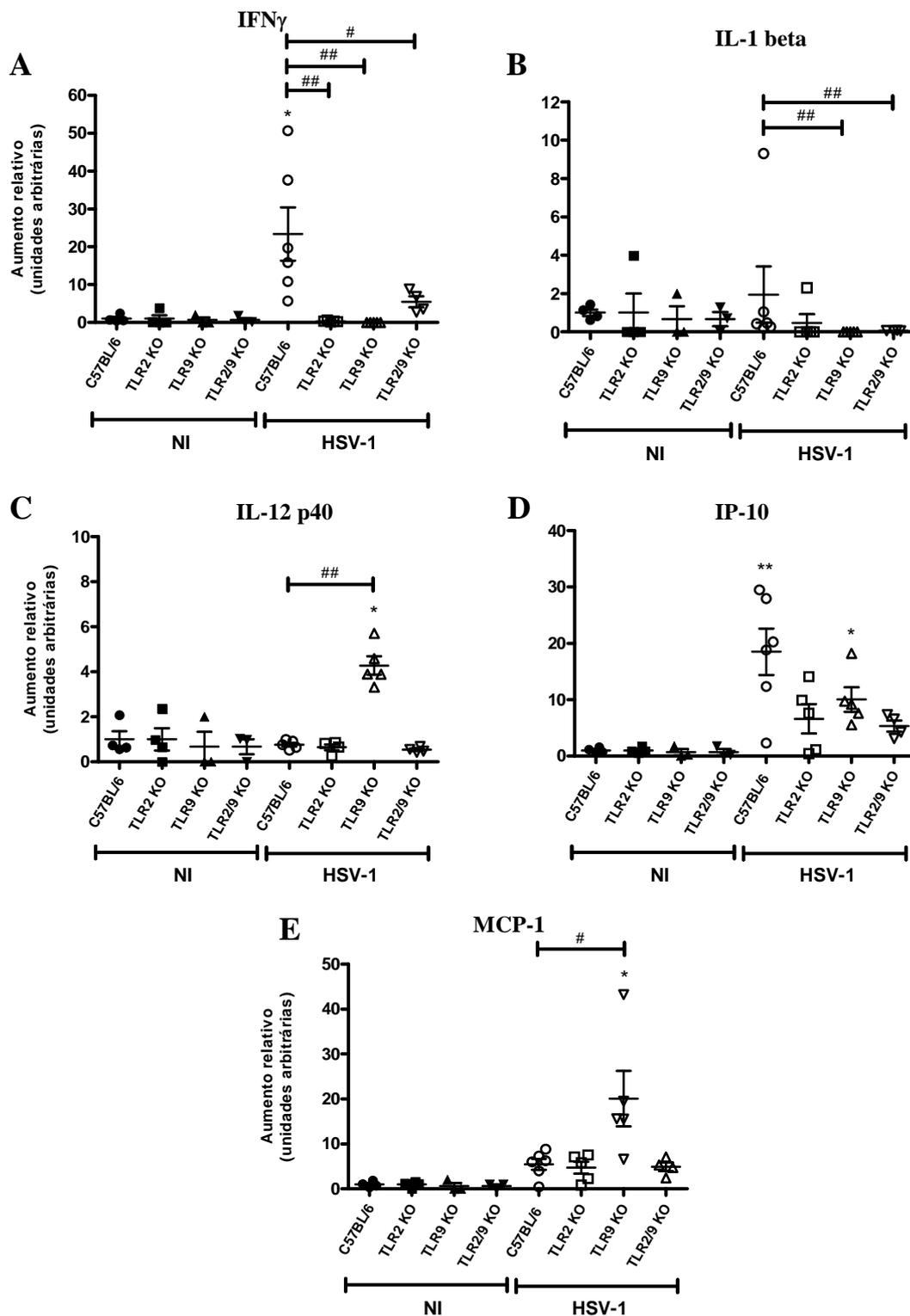


Figura 29 – Expressão de quimiocinas e citocinas no linfonodo cervical superficial dos animais. Os camundongos C57BL/6 WT, TLR2 KO, TLR9 KO e TLR2/9 KO foram infectados por via intranasal com 10^6 ufp de HSV-1 e no 5^o dpi linfonodos dos animais foram coletados (N=5 a 6). Animais controle aspiraram somente PBS (N=4). Após a extração de RNA e a transcrição reversa, foi realizada a PCR em tempo real, em duplicatas, e a expressão de cada gene, IFN γ (A), IL-1 beta(B), IL-12 p40(C), IP-10(D) e MCP-1(E), foi normalizada em relação ao gene constitutivo HPRT. Análises estatísticas foram feitas com o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. As barras representam o S.E.M (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$). NI, não infectado.

5.7 Expressão de gp91^{phox}, p22^{phox} e iNOS nos gânglios trigêmeos

Após pesquisar principais citocinas e células do sistema imune, procuramos qual seria a principal atividade imune celular envolvida na defesa contra o HSV-1. Gânglios trigêmeos de animais C57BL/6 WT, TLR2 KO, TLR9 KO e TLR2/9 KO foram utilizados e neles verificamos a expressão de gp91^{phox}, p22^{phox} e iNOS (Figura 30).

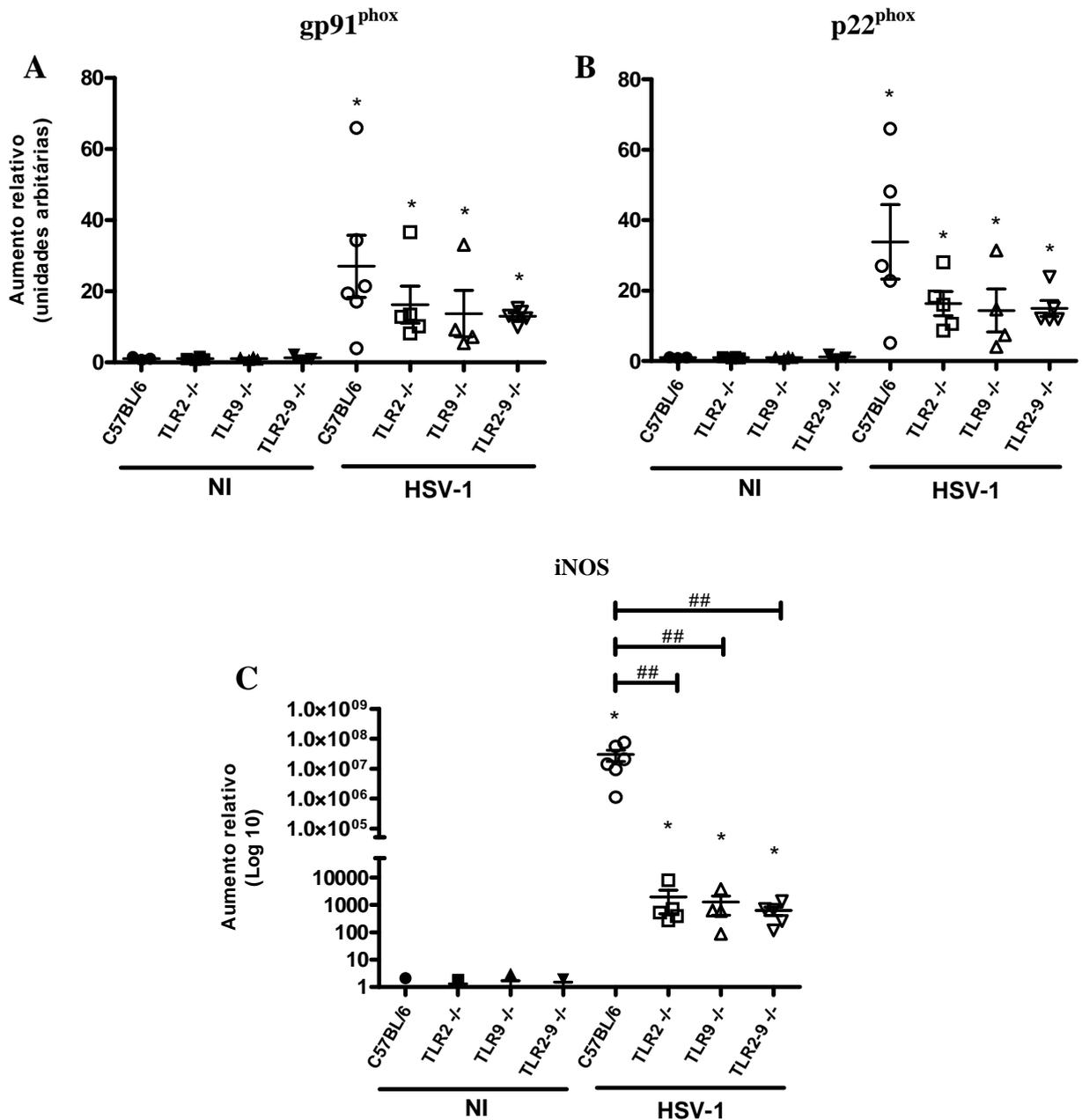


Figura 30 – Expressão de gp91^{phox}, p22^{phox} e iNOS nos gânglios trigêmeos dos animais. Os camundongos C57BL/6 WT, TLR2 KO, TLR9 KO e TLR2/9 KO foram infectados por via intranasal com 10⁶ ufp de HSV-1 e no 5^o dpi gânglio trigêmeo dos animais foram coletados. Animais controle aspiraram somente PBS. Após a extração de RNA e a transcrição reversa, foi realizada a PCR em tempo real, em duplicatas, e a expressão de cada gene, gp91^{phox} (A), p22^{phox} (B) e iNOS(C), foi normalizada em relação ao gene constitutivo HPRT. Análises estatísticas foram feitas com o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. As barras representam o S.E.M (*p<0,05; ##p<0,01). NI, não infectado.

Foi demonstrado aumento da expressão de iNOS nos C57BL/6 WT e demais grupos KOs em relação aos seus grupos não infectados e aumento da expressão de iNOS nos C57BL/6 WT infectados em relação aos demais grupos infectados (Figura 30C). Para expressão de gp91^{phox}, p22^{phox} (Figura 30A e 30B), os grupos infectados apresentaram diferença significativa em relação a seus respectivos grupos não infectados, entretanto não apresentaram diferenças entre o grupo infectado C57BL/6 WT e demais grupos KOs infectados.

5.8 Avaliação da produção de óxido nítrico em ensaio “in vitro” pela reação de Griess

Células peritoneais de animais C57BL/6 WT, TLR2 KO, TLR9 KO e TLR2/9 KO foram utilizadas e nelas verificamos a produção de óxido nítrico após estímulo das células com HSV-1 (MOI=1) através do ensaio de reação de Griess (Figura 31). O grupo C57BL/6 WT infectado apresentou diferença significativa em relação ao seu grupo não infectado e em relação aos demais grupos KOs infectados.

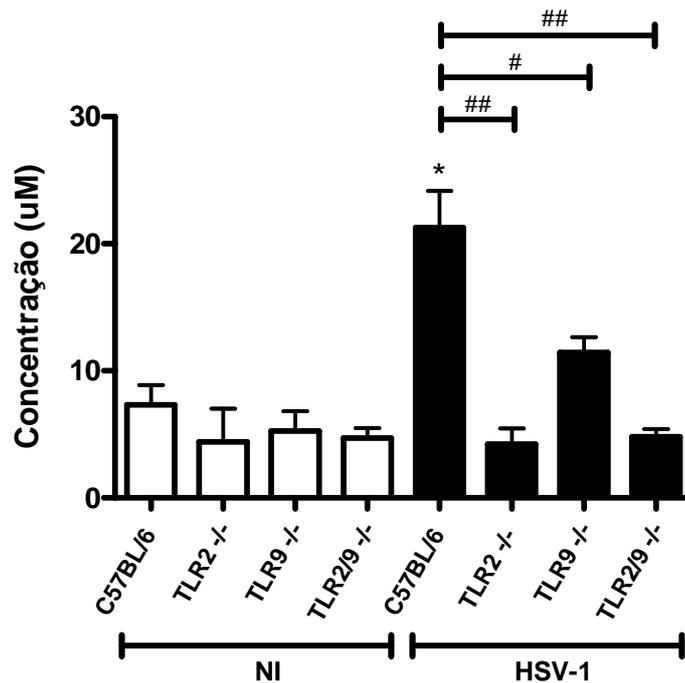


Figura 31 – Produção de óxido nítrico (NO) em células peritoneais em ensaio de reação de Griess. As células intraperitoneais dos camundongos C57BL/6 WT, TLR2 KO, TLR9 KO e TLR2/9 KO foram coletadas e acondicionadas em placa de 96 poços. Foram utilizados grupos controle que não receberam estímulo (4 poços/ grupo) e grupos testes com HSV-1 (MOI=1) para estimular as células dos grupos (5 poços/ grupo). Análises estatísticas foram feitas com o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. As barras representam o S.E.M (*p<0,05; #p<0,05; ##p<0,01). NI, não infectado.

6 DISCUSSÃO

Dados obtidos em outra pesquisa do grupo⁽⁵⁶⁾ (Tabela 1) associados aos adquiridos pela cinética de VP-16 (Figura 10), evidenciam a presença de HSV-1 nos gânglios trigêmeos de camundongos C57BL/6 WT infectados e a multiplicação viral com pico no 5ºdpi, e por isso este foi o dia escolhido para análise da expressão dos TLRs no gânglio trigêmeo (GT) e cérebro em animais WT e KOs.

É importante ressaltar que neste estudo conduzido anteriormente⁽⁵⁶⁾, camundongos C57BL/6 foram infectados por via intranasal com 10^6 ufp de HSV-1, para realizar cinética de multiplicação viral em órgãos. Nos 8 dias subsequentes, foram sacrificados 4 animais/dia, que tiveram os gânglios trigêmeos e cérebros coletados, e rapidamente congelados.

A titulação dos gânglios trigêmeos apontou que neles haviam partículas infecciosas entre o 2º e o 6º dpi, pois o sobrenadante de macerado do material coletado nestes dias produziu efeito citopático em células Vero (Tabela 1). Somente para alguns animais foi possível calcular o título viral dos gânglios trigêmeos (entre o 3º e o 5º dpi), sendo que foi obtida uma média de $10^{2,99}$ TCID50/mL (Tabela 1). Nenhuma partícula infecciosa foi detectada nos cérebros dos animais (Tabela 1).

Tabela 1. Cinética de multiplicação de HSV-1 em órgãos de animais C57BL/6. dias pós infecção, DPI; efeito citopático, ECP.

DPI*	ECP de Gânglios trigêmeo em células Vero	TCID50/mL de Gânglios trigêmeos em células Vero	ECP de Cérebros em células Vero
1	-	-	-
2	+ (3/4)	-	-
3	+ (3/4)	$10^{3,3}$ (1/4)	-
4	+ (3/4)	$10^{2,8}$ (1/4)	-
5	+ (3/4)	$10^{2,7}$ e $10^{2,9}$ (2/4)	-
6	+ (2/4)	-	-
7	-	-	-
8	-	-	-

Fonte: LIMA *et al*, 2010

Outro dado pertinente para sedimentar e confrontar análises posteriores de dados adquiridos nesse trabalho, obtido em trabalho anterior do nosso grupo, é a da curva de sobrevivência de camundongos WT e KOs para TLRs⁽⁵⁶⁾. Foram observados índices iguais de sobrevivência para animais WT e TLR2KO, com uma taxa elevada de 90%, uma taxa de 40% de

sobrevida para os animais TLR9KO e uma taxa de 0% de sobrevivência para os animais TLR2/9KO (Figura 32).

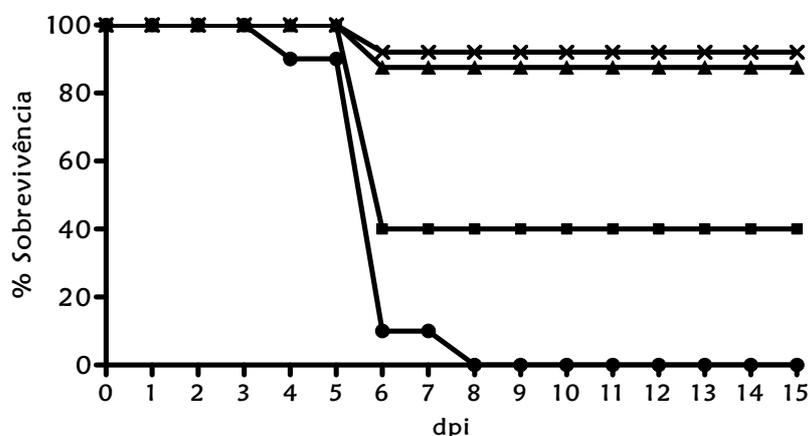


Figura 32 - Taxas de sobrevida de camundongos WT e KOs para TLRs. Animais C57BL/6 WT (cruzes), TLR2 KO (triângulos), TLR9 KO (quadrados), e TLR2/9 KO (círculos) foram inoculados por via intranasal com 10^6 ufp de HSV-1, e a mortalidade dos camundongos foi quantificada por dia (N=10 para cada grupo). Este experimento é representativo de três análises. Fonte: LIMA *et al*, 2010

Em ensaio para determinar a expressão de TLRs no GT e cérebros de camundongos C57BL/6 WT infectados (Figura 11A, 11B), primeiramente, os dados demonstraram que os TLRs são expressos no GT quando o animal é infectado por HSV-1, mas não há aumento na expressão de TLRs no cérebro dos mesmos animais, evidenciando que a imunidade inata frente ao vírus ocorre primeiro e preferencialmente no GT.

Observando demais dados deste ensaio (Figura 18) verificamos que TLRs 1, 2, 3, 6, 7 e 9 são ativados no GT em camundongos WT infectados com HSV-1. A expressão dos TLRs 1, 2 (exceto para TLR2KO e TLR2/9KO), 3, 6, 7 e 9 (exceto para TLR9KO e TLR2/9KO) no GT, de maneira geral, está diminuída ou apresentara tendência a reduzir nos camundongos com genes nocautes (TLR2KO, TLR9KO e TLR2/9KO) em relação aos animais C57BL6 WT, mas no cérebro houve aumento da expressão dos TLRs 1, 2 (exceto para TLR2KO e TLR2/9KO), 3, 6, 7 e 9 (exceto para TLR9KO e TLR2/9KO) ou houve uma tendência a aumentar, exceto para TLRs 1 e 6 no cérebro dos animais duplo nocaute (TLR2/9KO). Este resultado sugere uma interação entre os diferentes TLRs na tentativa de orquestrar uma resposta imune satisfatória no cérebro, mas em contrapartida, no GT, evidenciou uma diminuição na expressão dos vários outros TLRs quando genes do TLR2, TLR9 ou ambos

estão nocauteados. Interrelações na expressão dos genes TLRs, também foram evidenciados em pesquisa onde camundongos pré-estimulados por um agonista de TLR3, o Poli I:C, tiveram aumento da expressão de TLR2 no cérebro e diminuição da mortalidade destes animais infectados por HSV-1⁽¹⁰⁹⁾.

Hipotetizamos que o controle primordial da infecção em nosso modelo ocorreria nos GT (e talvez na mucosa nasal – experimentos em andamento), dados os resultados observados nos WT. Quando o reconhecimento do HSV-1 por TLRs no GT falhou (no caso dos TLRs KOs), houve uma “tentativa” de resposta imunológica no cérebro. Nos animais TLR2KO infectados (que tem a mortalidade de 10%, semelhante à dos C57BL/6 WT) essa resposta no cérebro parece ser eficiente em controlar o vírus, o que demonstra mais uma vez o papel fundamental de TLR9 (que é expresso no cérebro destes animais). Por outro lado, os animais que não expressam TLR9 (TLR9KO e TLR2-9KO) não conseguem controlar o vírus e sucumbem à infecção, ainda que expressem outros TLRs nos cérebros. Os animais duplo nocaute (TLR2-9KO) além de ter apresentado diminuição na expressão dos TLRs nos GT, eles não apresentaram expressão de TLRs 1 e 6 no cérebro, provavelmente devido à grande dificuldade que o sistema imune encontrou para orquestrar uma defesa imune compensatória sem a presença funcional dos TLRs 2 e 9, o que corrobora com dados de mortalidade de 100% do grupo TLR2-9KO (Figura 32). Outro dado relevante é o aumento significativo na expressão de IFN γ e IL-1 β no cérebro dos animais TLR2KO em relação aos seus controles não infectados⁽⁵⁶⁾. Esta informação é importante pois verificamos que estas citocinas, anteriormente citadas, são muito importantes para manutenção de uma resposta imune eficiente nos GT dos animais C57BL/6 WT infectados⁽⁵⁶⁾. Apesar dos animais TLR2KO possuírem mortalidade semelhante aos C57BL/6 WT quando infectados, estes apresentaram diminuição da expressão de TLRs 1, 3, 6, 7 e 9 no GT, mas demonstraram aumento da expressão das citocinas IFN γ e IL-1 β ⁽⁵⁶⁾ e dos TLRs 1, 3, 6, 7 e 9 no cérebro. Estes dados corroboram a hipótese que estes animais (TLR2 KO) são capazes de orquestrar uma resposta imune compensatória no cérebro. Além de que, em ensaios *in vitro* de outro grupo⁽¹²⁶⁾, foi confirmada a ação sinérgica de IFN γ e IFN α / β , que são genes ativados por cascatas de fosforilação inicializados em diferentes TLRs, sendo capazes de impedir a replicação do vírus.

Os TLRs expressos nos GT podem ser originários tanto do tecido (células residentes) quanto de células infiltradas, fato que motivou buscarmos qual ou quais células de defesa estariam envolvidas na resposta do sistema imune frente a infecção por HSV-1

(especialmente no GT, visto que esse é o órgão preferencial para orquestração da imunidade contra HSV-1 em camundongos C57BL/6 WT). Para isso, foi feito ensaio de sobrevivência (Figura 20) com os camundongos RAGKO, CD8KO, iNOS KO e CCL3KO, que demonstrou que as células T, principalmente TCD8, parecem ser importantes para a resposta imune, apesar de não serem as únicas, pois quando a carga viral infectante foi de 10^4 ufp os animais CD8 KO apresentaram sobrevida de 30% enquanto os animais RAG KO tiveram 0% de sobrevida com mesma carga infectante (Figura 20A); mas quando a carga viral passa a ser de 10^6 ufp, a sobrevida de ambos os grupos (RAG KO e CD8 KO) passa a ser de 0% (Figura 20B). Demonstrou-se que a produção de iNOS também é essencial para o controle da infecção, o que corrobora com dados de pesquisadores que verificaram a importância do óxido nítrico (NO) para evitar replicação do HSV-1 no gânglio ⁽⁸⁰⁾.

Adicionalmente, foi verificada a expressão de VP-16 e algumas citocinas e quimiocinas no GT após infecção intranasal de 10^6 ufp de HSV-1 em animais WT e nos KOs para CCL3, RAG e iNOS infectados por HSV-1. A análise destes dados ajudou a direcionarmos melhor a pesquisa e encontrar tipos celulares candidatos a principais responsáveis pela manutenção da imunidade no local de infecção.

Analisando a expressão de VP-16 (Figura 21A) verificamos que apesar de não haver diferença estatística entre animais infectados, há tendência a aumento de sua expressão nos iNOS KO, demonstrando que esta enzima parece ser importante para controle da multiplicação do vírus no GT.

O MCP-1 é uma quimiocina que é quimiotática para monócitos/macrófagos, células T, basófilos e mastócitos ^(127; 128). O iNOS é uma importante enzima para defesa do organismo, responsável pela produção das espécies reativas de nitrogênio (RNS) que ocorre nos macrófagos para efetiva ação protetora por um mecanismo de imunidade celular ⁽¹⁰⁵⁾. O IP-10 é uma quimiocina que tem sua produção induzida pelo IFN γ e possui atividade quimiotática para monócitos, células T, células NK e células dendríticas ⁽¹²⁹⁾. O Rantes é uma quimiocina capaz de atrair células T, eosinófilos e basófilos e é capaz de se ligar aos receptores CCR1, CCR3 e CCR5 ⁽¹³⁰⁾. O TNF α é uma citocina envolvida em processos inflamatórios, regulação de células imune, indução de apoptose, inibir gênese tumoral e replicação viral. É principalmente produzida pelos macrófagos ⁽¹³¹⁾.

No grupo infectado iNOS KO, os níveis de mRNA expressos das quimiocinas MCP-1 (Figura 21B), IP-10 (Figura 21D) e Rantes (Figura 21E) aumentaram significativamente em relação ao grupo C57BL/6 WT infectado, provavelmente pela resposta imune ser insuficiente

e deficitária em conter a infecção por HSV-1, ocorrendo então uma tentativa compensatória de aumentar a população de macrófagos no local. Uma tendência no aumento da expressão de TNF α (Figura 21F) ocorre no grupo iNOS KO, em decorrência à provável quimiotaxia produzida por MCP-1 e IP-10 no órgão infectado causando aumento populacional de macrófagos, que são as principais células produtoras de TNF α .

Para o grupo infectado RAG KO, foi verificada diminuição significativa no índice de MCP-1 (Figura 21B) e iNOS (Figura 21C) em relação ao grupo infectado C57BL/6 WT. Não houve resposta alguma, pois não houve diferença significativa em relação ao controle não infectado em nenhuma das quimiocinas/citocinas e grupo iNOS.

No grupo infectado CCL3 KO, verificamos uma diminuição significativa da expressão de MCP-1 (Figura 21B) e uma tendência de aumento na expressão de iNOS (Figura 21C) em relação ao C57BL/6 WT infectado. As quimiocinas MCP-1 e CCL3 são quimiotáticas para macrófagos ⁽¹³²⁾. Nos animais CCL3KO não há logicamente expressão de CCL3, e há diminuição de MCP-1 (Figura 21B). O aumento na expressão de iNOS (Figura 21C), em um único indivíduo, pode ter ocorrido por outras células produtoras de iNOS, como neutrófilos ⁽¹³³⁾, ou mesmo pela ação redundante de outras quimiocinas capazes de atrair macrófagos (lembrando que estes animais tem mortalidade de 20-50% aproximadamente, e, portanto, ainda têm alguma capacidade de controle do vírus).

Essas informações aliadas aos dados de pesquisas bibliográficas ^(66; 80; 81; 82; 88; 134) e trabalhos prévios do nosso grupo ⁽⁵⁶⁾, direcionaram o foco da pesquisa em animais WT e KO para TLRs para as células leucocitárias, principalmente para as células T (especialmente CD8+), macrófagos e células dendríticas.

Nos cortes histológicos de gânglios trigêmeos, corados por Giemsa (Figura 22A-B) e HE (Figura 23A-B), os animais C57BL/6 infectados apresentaram aumento da celularidade, entretanto não apresentaram lesões teciduais extensas como as que ocorreram nos animais TLR2 KO, TLR9 KO e TLR2/9 KO (Figura 23 C-D; E-F; G-H). Tais resultados corroboram com dados da curva de sobrevivência ⁽⁵⁶⁾, já publicados por nosso grupo e citados anteriormente (Figura 32).

Também verificamos com a imunofluorescência e a citometria de fluxo dos GT a presença de macrófagos e células T CD8 (Figura 22 e 27 respectivamente) e o aumento da produção de IFN γ nas células T CD8 de C57BL/6 WT (Figura 27). Estas informações

corroboraram com dados de pesquisadores que citam os macrófagos, CD8 e IFN γ como importantes por evitar replicação do vírus no gânglio, e manter o vírus em latência^(80, 81).

Sabendo da importância de macrófagos, CD8 e IFN γ , e tendo os dados de sobrevivência dos camundongos iNOS KO (Figura 20), lançamos mão da análise por PCR em tempo real e verificamos a expressão de iNOS nos GT dos TLRs KOs, importante por ser responsável direto para produção de NO e consequentemente RNS⁽¹⁰⁵⁾ e também a expressão de gp91^{phox} e p22^{phox} que são importantes subunidades do NADPH oxidase, e são proteínas de membrana que compõem o Flavocitocromo b₅₅₈ responsável pela transferência de elétrons^(123, 135) e consequentemente responsáveis diretos pela produção de ROS. Estes resultados mostraram aumento significativo da expressão de iNOS nos C57BL/6 WT em relação aos animais TLRs KO (Figura 30). De outra forma, por meio da imunofluorescência foi demonstrada a presença de iNOS junto aos macrófagos, por meio de marcação dupla, nos gânglios de C57BL/6 WT infectados (Figura 24), o que não ocorreu com os animais TLR2/9 KO que apresentaram mortalidade de 100%⁽⁵⁶⁾.

Em ensaio de reação de Griess para avaliar a produção de NO por macrófagos peritoneais, após estimulados por HSV-1, os macrófagos dos animais C57BL/6 WT apresentaram-se mais responsivos, mostrando aumento significativo na produção de NO em relação aos grupos TLRs nocautes (Figura 31). Tais dados corroboram com informações que citam a importância do iNOS na defesa contra o HSV-1 e que, em outros experimentos, o NO foi capaz de inibir a multiplicação do HSV-1 em ensaio “*in vitro*”^(80, 136, 137).

Analizamos a população celular dos linfonodos cervicais superficiais dos camundongos C57BL/6 WT, no 5º dpi, por meio de citometria e verificamos que houve um aumento da produção de IFN γ principalmente por células NK e TCD4 (Figura 28B) e apesar da hipertrofia visualizada (Figura 25), isto não traduziu-se em aumento celular (Figura 28A), mas provavelmente pelo aumento da produção de citocinas. Verificamos então a expressão de outras citocinas pelo PCR em tempo real, também no 5º dpi, em camundongos C57BL/6 WT e TLRs KO, e o aumento da expressão de IFN γ nos animais C57BL/6 WT (Figura 29A) corroboram com os dados coletados pelo ensaio de citometria. Ocorreu também aumento da expressão de IL-1 beta (Figura 29B) neste grupo. O IL-1 beta é produzido por macrófagos e responsável pela ativação de macrófagos e células T⁽³⁾. Como as células T CD4 demonstraram ser a maior população celular nos linfonodos (Figura 28A) e são importantes células produtoras de IFN γ ⁽³⁾, parece lógico a correlação do aumento da expressão destas duas citocinas nos linfonodos dos animais WT. Demonstramos aumento da expressão de IL-

IL-12 p40 nos camundongos TLR9 KO, que é uma citocina produzida por macrófagos e células dendríticas, responsável por ativação de células NK, células T e diferenciação de células T_H em células T_{H1} ⁽³⁾. Além disso, a IL-12 é capaz de ativar diretamente o aumento da produção de IFN γ pelas células T_{H1} ⁽¹³⁸⁾. Em trabalho do nosso grupo, verificamos no GT de animais C57BL/6 WT aumento de IL-12 p40 ⁽¹³⁹⁾, no 5º dpi, o que não ocorreu no linfonodo. Provavelmente porque no 5º dpi, a IL-12 no linfonodo WT já passou pelo seu pico, mas como GT é o local onde está o HSV-1, provavelmente continua atuando no GT. Além disso, em trabalho anterior do nosso grupo ⁽⁵⁸⁾, foi verificado que IL-12 p40 é produzido em altos níveis por células dendríticas (DC) de animais C57BL/6 WT, mas DC de animais TLR9 KO produziram níveis intermediários quando comparadas às DC dos camundongos WT, utilizando o mesmo tempo de incubação. Tais dados permitem hipotetizar um atraso na resposta imune nos animais TLR9 KO, visto que as DC são principalmente apresentadoras de antígeno e responsáveis pela ligação da resposta imune inata e adaptativa, e que nos animais TLR9 KO a sobrevivência é de 40% (Figura 32), o que parece ser compatível com um quadro de resposta deficiente, mas não irresponsável. Além disso, pesquisadores demonstraram em um modelo de infecção de HSV-1 na pele que células T “naive” são drenadas rapidamente para linfonodos regionais, em até 96 horas ⁽¹⁴⁰⁾, o que não justificaria um pico de IL12 p40 no 5º dpi como aconteceu nos animais TLR9 KO. Além disso, MCP-1 também está aumentada no linfonodo do grupo TLR9 KO, o que parece ser compatível com dados verificados em trabalho do nosso grupo ⁽⁵⁹⁾ onde ocorre aumento desta citocina no 5º dpi no GT dos animais TLR9 KO e também no grupo TLR2/9 KO, o que não se repetiu nos linfonodos para o grupo TLR2/9 KO.

Os dados obtidos nesta pesquisa colaboram para melhor entendimento das correlações moleculares e celulares dentro da resposta imune contra a infecção por HSV-1 em modelo de encefalite herpética, e podem no futuro, contribuir para a prevenção ou controle do vírus no sistema nervoso.

7 CONCLUSÃO

Neste trabalho concluímos que a importância dos TLRs 2 e 9 no controle da encefalite herpética ocorre também por haver uma interrelação entre a expressão destes TLRs, pois de forma geral os grupos TLR2 KO, TLR9 KO e TLR2/9 KO tiveram diminuição da expressão de outros TLRs nos gânglios trigêmeos, facilitando assim a chegada do vírus no cérebro destes camundongos, o que poderia contribuir para a morte dos mesmos. Em nosso modelo, o gânglio trigêmeo parece ser o principal local onde a imunidade inata é organizada, e quando o HSV-1 chega ao cérebro, somente os animais TLR2 KO foram capazes de conter a infecção eficientemente.

Verificamos que o $\text{IFN}\gamma$ é muito importante para o controle do vírus, e que as principais células responsáveis pela sua produção no gânglio trigêmeo são as células T CD8, e que conseqüentemente este $\text{IFN}\gamma$ é responsável pela maior ativação de macrófagos infiltrados aumentando assim a produção de iNOS por essas células, e que os TLRs 2 e 9 são importantes também para a produção de NO, não somente pela produção de $\text{IFN}\gamma$.

A importância das células T, principalmente T CD8, e dos macrófagos pode ser evidenciada no ensaio de curva de sobrevivência. Além disso, verificamos que os linfonodos parecem também desempenhar papel na montagem da imunidade inata, pois tiveram aumento da produção de $\text{IFN}\gamma$ pelas células T CD4 e NK residentes, além de demonstrar também aumento da expressão de IL-1 beta nos linfonodos cervicais superficiais.

Associado a essas informações, o registro do aumento de lesões teciduais nos gânglios dos grupos TLRs KOs evidenciou a fragilidade e dificuldade destes animais em orquestrar eficientemente uma resposta imune satisfatória contra o HSV-1.

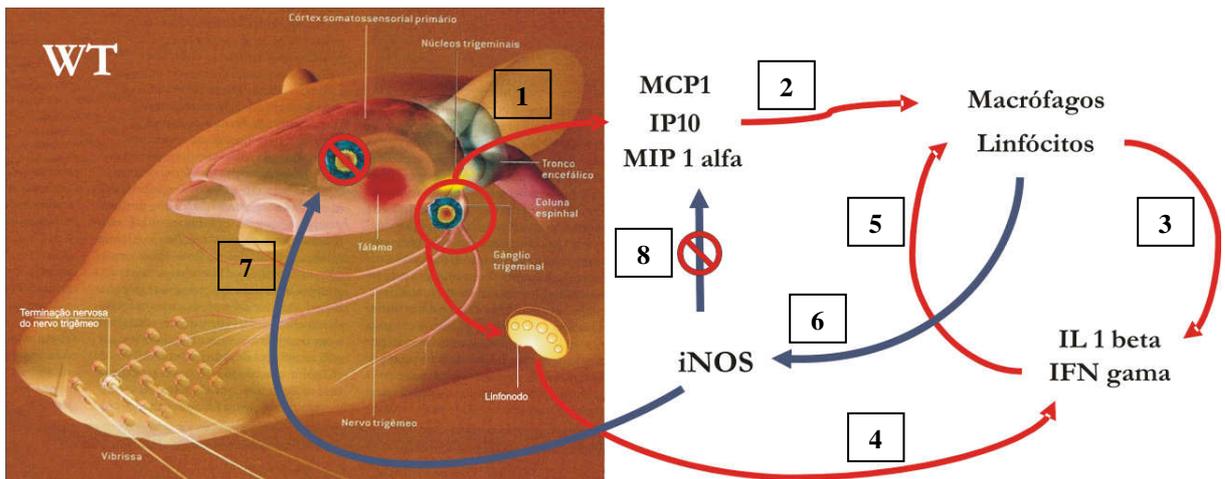


Figura 33 - Modelo Proposto: Após a infecção intranasal de camundongos C57BL/6 (WT) com HSV-1, o vírus alcançaria os gânglios trigêmeos, onde ocorreria o controle da infecção. Inicialmente, células dos gânglios produziram quimiocinas (1), que atrairiam células do sistema imune até o tecido (2). O infiltrado inflamatório (3) e os linfonodos regionais (4) produziram citocinas que ativariam as células (5), aumentando a produção de iNOS (6), promovendo um controle eficiente da infecção e evitando que o vírus alcançasse o cérebro (7). Com o controle da multiplicação viral, a produção das quimiocinas seria inibida (8).

8 ANEXOS

8.1 *Coorientações em trabalhos de conclusão de curso de graduação*

- Braulio Henrique Freire Lima. IMPORTÂNCIA DE CCR5 NA RESPOSTA IMUNE MURINA EM MACHOS E FÊMEAS APÓS INFECÇÃO INTRANASAL POR HUMAN HERPESVIRUS 1. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Minas Gerais. Orientador: Marco Antônio Silva Campos.

- Mariana das Graças Almeida Silva. EXPRESSÃO DAS CITOCINAS IL-12, IFN γ , MCP-1 EM CAMUNDONGOS C57BL/6, TLR2-/-, TLR9-/- E TLR 2/9-/- IE EXPRESSÃO DE IFN α E IFN β EM CAMUNDONGOS C57BL/6 INFECTADOS COM HSV-1 (HHV-1). Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais – PUC/MG. Orientador: Marco Antônio Silva Campos

8.2 *Coorientações em iniciação científica*

- Natalia Lima Pessoa. EXPRESSÃO DE TLRs APÓS INFECÇÃO COM HSV-1. em andamento. Iniciação Científica - Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Orientador: Marco Antônio Silva Campos.

- Isabelle Cristina de Oliveira Santos. O PAPEL DE NEUTRÓFILOS EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM HSV-1. em andamento. Iniciação Científica - Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Orientador: Marco Antônio Silva Campos.

- Mariana das Graças Almeida Silva. EXPRESSÃO DE CITOCINAS/QUIMIOCINAS EM GÂNGLIOS TRIGÊMIOS DE CAMUNDONGOS SELVAGENS E NOCAUTES, INFECTADOS COM HSV-1. 2010. Iniciação Científica - Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). Orientador: Marco Antônio Silva Campos.

- Marcela França Dias. EXPRESSÃO DE TLRs EM GÂNGLIOS TRIGÊMEOS DE CAMUNDONGOS SELVAGENS E NOCAUTES, INFECTADOS COM HSV-1. 2010. Iniciação Científica - Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Orientador: Marco Antônio Silva Campos.

- Uschi Wischhoff. EXPRESSÃO DE TLRs EM GÂNGLIOS TRIGÊMIOS DE CAMUNDONGOS SELVAGENS E NOCAUTES, INFECTADOS COM HSV-1. 2009. Iniciação Científica - Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Orientador: Marco Antônio Silva Campos.

- Bráulio Henrique Freire Lima. CINÉTICA DE MULTIPLICAÇÃO VIRAL EM INFECÇÃO MURINA POR VÍRUS HERPES SIMPLEX 1. 2008. Iniciação Científica - Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). Orientador: Marco Antônio Silva Campos.

8.3 Colaborações

- Kátia Paulino Ribeiro de Souza. VIRULÊNCIA DE *DENGUE VIRUS* "IN VIVO". Em andamento. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Programa de Pós-graduação em Microbiologia. Orientadora: Dra. Erna Geessien Kroon.

- Graciela Kunrath Lima. TLR2 E TLR9: RECEPTORES ESSENCIAIS PARA O CONTROLE DA INFECÇÃO POR VÍRUS HERPES SIMPLEX DO TIPO 1. 2010. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Programa de Pós-graduação em Microbiologia. Orientador: Marco Antônio Silva Campos.

8.4 Participação em eventos

- XXI National Meeting of Virology, 2010; TLRs expression in the trigeminal ganglia and brain of wild type and knockout mice infected with HSV-1. Gramado. Virus Reviews and Research, 2010.
- Encontro INCT Vacinas, BH. 2010
- XXXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia e X Simpósio Internacional de Alergia e Imunidade Clínica, 2009; TLRs expression in the trigeminal ganglia of wild type and knockout mice infected with HSV-1. Salvador. IMUNO 09, 2009.
- Innate Immunity Workshop BH. 2008.
- Comemoração dos 46 anos do Laboratório de Virus. 2008.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



Comissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-6/11

Certificamos que o protocolo (P-17/10-5), intitulado "Moléculas da imunidade inata envolvidas na resposta à infecção por Herpes simplex virus tipo 1.", sob a responsabilidade de MARCO ANTONIO DA SILVA CAMPOS, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 07/02/2015 e inclui o uso total de :

Mus musculus

- 141 Machos de C57BL/6, Idade: 7 Semana(s), Peso: 20,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 41 Machos de B6;129 TLR2 tm, Idade: 7 Semana(s), Peso: 20,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 41 Machos de B6;129 TLR6 tm, Idade: 7 Semana(s), Peso: 20,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 41 Machos de B6;129 TLR9 tm, Idade: 7 Semana(s), Peso: 20,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 41 Machos de TLR2/TLR9 KO, Idade: 7 Semana(s), Peso: 20,0000 Grama(s).

Rio de Janeiro, 7 de fevereiro de 2011

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Manguinhos - Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 13/2008**, relativo ao projeto intitulado "**Proteínas envolvidas na resposta imune do hospedeiro em infecção com o vírus herpes simplex 1**", que tem como responsável(is) **Erna Geessien Kroon**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **13/ 08/2008**.

Este certificado expira-se em **13/ 08/ 2013**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 13/2008**, related to the project entitled "**Proteins involved in the host's immune response to herpes simplex virus 1 infection**", under the supervisors of **Erna Geessien Kroon**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **August 13, 2008**.

This certificate expires in **August 13, 2013**.

Belo Horizonte, 18 de Agosto de 2008.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

8.7 Artigo publicado: Lima GK, Zolini GP, Mansur DS, Freire Lima BH, Wischhoff U, Astigarraga RG, Dias MF, das Graças Almeida Silva M, Béla SR, do Valle Antonelli LR, Arantes RM, Gazzinelli RT, Báfica A, Kroon EG, Campos MA. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR9 expressed in trigeminal ganglia are critical to viral control during herpessimplex virus 1 infection. *Am J Pathol.* 2010 Nov;177(5):2433-45. Epub 2010 Sep 23. PubMed PMID: 20864677; PubMed Central PMCID: PMC2966801. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2966801/pdf/JPATH177002433.pdf>>. Acesso em: 04 jun. 2012

Immunopathology and Infectious Diseases

Toll-Like Receptor (TLR) 2 and TLR9 Expressed in Trigeminal Ganglia are Critical to Viral Control During Herpes Simplex Virus 1 Infection

Graciela Kunrath Lima,* Guilherme Pimenta Zolini,[†] Daniel Santos Mansur,* Bráulio Henrique Freire Lima,[†] Uschi Wischhoff,[†] Ruiz Gerhardt Astigarraga,[†] Marcela França Dias,[†] Mariana das Graças Almeida Silva,[†] Samantha Ribeiro Béla,[†] Lis Ribeiro do Valle Antonelli,[†] Rosa Maria Arantes,[‡] Ricardo Tostes Gazzinelli,^{†§¶} André Báfica,^{||} Erna Geessien Kroon,* and Marco Antônio Campos[†]

From the Departamentos de Microbiologia,* Patologia Geral,[‡] and Bioquímica e Imunologia,[§] Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; the Laboratório de Imunopatologia,[†] Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz, Belo Horizonte, Brazil; the University of Massachusetts Medical School,[¶] Worcester, Massachusetts; and the Laboratório de Imunologia e Doenças Infecciosas,^{||} Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

Herpes simplex virus 1 (HSV-1) is a neurotropic DNA virus that is responsible for several clinical manifestations in humans, including encephalitis. HSV-1 triggers toll-like receptors (TLRs), which elicit cytokine production. Viral multiplication and cytokine expression in C57BL/6 wild-type (WT) mice infected with HSV-1 were evaluated. Virus was found in the trigeminal ganglia (TG), but not in the brains of animals without signs of encephalitis, between 2 and 6 days postinfection (d.p.i.). Cytokine expression in the TG peaked at 5 d.p.i. TLR9^{-/-} and TLR2/9^{-/-} mice were more susceptible to the virus, with 60% and 100% mortality, respectively, as opposed to 10% in the WT and TLR2^{-/-} mice. Increased levels of both CXCL10/IP-10 and CCL2/MCP-1, as well as reduced levels of interferon- γ and interleukin 1- β transcripts, measured in both the TG and brains at 5 d.p.i., and the presence of virus in the brain were correlated with total mortality in TLR2/9^{-/-} mice. Cytokine alterations in TLR2/9^{-/-} mice coincided with histopathological changes in their brains, which did not occur in WT and TLR2^{-/-} mice and occurred only slightly in TLR9^{-/-} mouse brain. Increased cellularity, macrophages, CD8 T cells producing interferon- γ , and ex-

pression levels of TLR2 and TLR9 were detected in the TG of WT-infected mice. We hypothesize that HSV-1 infection is controlled by TLR-dependent immune responses in the TG, which prevent HSV-1 encephalitis. (*Am J Pathol* 2010, 177:2433–2445; DOI: 10.2353/ajpath.2010.100121)

Herpes simplex virus 1 (HSV-1) infections are widespread, and seropositivity may exceed 70% of the world population.^{1,2} The virus is transmitted primarily by contact between skin or mucosa with contaminated oral secretions.³ Primary infections are usually acquired during childhood and often present as mild self-limiting pharyngitis or are asymptomatic.³ After HSV-1 replicates in the skin and mucosa, it reaches the dorsal root ganglia termini, from which it is intraxonally transported to the trigeminal ganglia (TG), where it becomes latent.^{4,5} HSV-1 reactivation may be stimulated by hormonal alterations, UV exposure, and immunosuppression, but the mechanisms that underlie reactivation are not well understood.³ The virus causes a wide range of manifestations, from the most common herpes labialis to herpes keratitis, which is a major cause of blindness in developed countries.² HSV-1 is also the leading cause of sporadic encephalitis in immunocompromised as well as in immunocompetent individuals and without early manage-

Supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Brazil), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Brazil), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Vacinas/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (INCTV/CNPq; Brazil), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil), and the Programa Estratégico de Pesquisa em Saúde IV (PAPES) IV/FIOCRUZ/CNPq (Brazil). E.G.K., M.A.C., R.T.G., A.B., L.R.A., and R.M.A. have fellowships from CNPq.

G.K.L. and G.P.Z. contributed equally to this work.

Accepted for publication July 15, 2010.

None of the authors disclosed any relevant financial relationships.

Supplemental material for this article can be found on <http://ajp.amjpathol.org>.

Address reprint requests to Marco Antônio Campos, Ph.D., Laboratório de Imunopatologia, CPqRR/FIOCRUZ, Av. Augusto de Lima, 1715, CEP: 30.190-002 Belo Horizonte, MG, Brazil. E-mail: marcoasco@cpqrr.fiocruz.br.

ment is usually fatal.⁶ Although drug treatment has improved the outcome of these patients, morbidity remains high, and many individuals suffer from relapses or do not respond well to treatment.⁶ The mechanisms underlying HSV-1 manifestations, especially encephalitis, have not been well defined but involve the immune system.

Toll-like receptors (TLRs) are membrane-bound pattern recognition receptors that recognize pathogen-associated molecular patterns in endosomes (TLR3, 7 to 9) and the extracellular space (all remaining TLRs).^{7,8} There are 10 human (TLRs 1 to 10) and 12 murine (TLR1 to 9 and TLR11 to 13) TLR family members.^{7,8} Since the first description of TLRs in mammals, many TLR agonists have been described: peptidoglycans⁹ and the *Trypanosoma cruzi* glycosyl phosphatidylinositol (GPI) anchor for TLR2,¹⁰ lipopolysaccharide (LPS) for TLR4,¹¹⁻¹⁴ double-stranded RNA (dsRNA) for TLR3,¹⁵ flagellin for TLR5,¹⁶ and CpG DNA for TLR9.¹⁷ TLRs activate inflammatory responses and modulate immunity by several different signal transduction pathways. The most well-characterized pathway involves myeloid differentiation factor 88 (MyD88), an adapter molecule composed of a Toll-interleukin-1 receptor domain and a death domain.¹⁸ MyD88 recruits the serine/threonine kinase interleukin (IL) receptor associated kinase-4, which activates tumor necrosis factor (TNF)- α receptor-associated factor-6 that, in turn, phosphorylates inhibitor NF kappa B kinase (I κ B) and causes it to dissociate from and release nuclear factor κ B in the cytoplasm. Nuclear factor κ B then translocates to the nucleus and acts as a transcription factor of innate immunity-associated genes.^{18,19} In addition, TLR3 appears to activate the inflammatory response through another adapter molecule, named Toll-interleukin-1 receptor domain-containing adaptor-inducing interferon (IFN)- β .¹⁹ This pathway is MyD88 independent and culminates with the translocation of interferon regulatory factor 3 to the nucleus, leading to the production of IFN β and IFN-inducible genes.¹⁹

Many studies have examined the participation of innate immunity in HSV-1-related diseases and in the control of infection. In particular, TLRs have been intensively investigated. In 2004 Kurt-Jones et al²⁰ demonstrated that HSV-1 activated TLR2 *in vitro* and that TLR2 null ($-/-$) mice inoculated intraperitoneally with HSV-1 KOS showed increased resistance to infection. In the same year, Hochrein et al²¹ and Krug et al²² showed that TLR9 was important for the dendritic cell response to HSV-1. However, Krug et al²² could not find differences in viral replication or in susceptibility in TLR9 $-/-$ and MyD88 $-/-$ mice infected in the footpad or in the corneas with HSV-1. Nevertheless, our group²³ demonstrated that TLRs (and/or IL-1 β) are essential to control the virus in an intranasal model of HSV-1 infection because 100% of MyD88 $-/-$ mice developed lethal encephalitis after viral inoculation. We also showed that 50% of the inoculated IFN- γ knockout (KO) mice died from encephalitis.²³ Additionally, cooperation between TLR2 and TLR9 in HSV control has been demonstrated in HSV-1 infected dendritic cells²⁴ and, more recently, in an HSV-2 mouse model of vaginal and intraperitoneal infection.²⁵ TLRs have also been proposed to be important in Herpes simplex encephalitis in humans.^{26,27}

How innate immunity and which TLRs contribute to the control of HSV-1 and related diseases are still unknown. In this study, we investigated how HSV-1 infection is controlled in a murine model of intranasal infection by using the HSV-1 EK strain, which was isolated from a human case of recurrent oral herpes with blisters. Our experiments indicated that in C57BL/6 wild-type (WT) mice, control of virus infection seemed to be highly regulated at the level of the TG. The levels of cytokine transcripts were directly related to the viral load in TG, and once the virus was controlled, the cytokine levels were reduced. Additionally, we found that TLR2 and, more importantly, TLR9 play a role in immune responses and immune control in the TG and mouse brain. Thus, it seems that HSV-1 infection control in the intranasal murine model occurs in the TG and brain, and TLR deficiencies may cause deregulated inflammation in these organs, which consequently allows virus entry into the brain and raises the susceptibility of mice to infection.

Materials and Methods

Virus

HSV-1 strain EK,²⁸ isolated from a human case of recurrent oral herpes with blisters, was multiplied in Vero cells as previously described²³ and purified as previously described.²⁹ The virus titers obtained were 3.0×10^9 plaque forming units (PFU)/ml.

Vero Cells

Vero cells (American Type Culture Collection, Manassas, VA) were maintained in minimal essential medium supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum and antibiotics in 5% CO₂ at 37°C. These cells were used for multiplication and titration of the virus.

Human Embryo Kidney Cells

Human embryo kidney (HEK) 293 cells stably transfected with the pcDNA3 plasmid (Invitrogen, Carlsbad, CA) containing the human TLR2, TLR4MD.2, or TLR9 sequences or the empty vector, each fused with yellow fluorescent protein, were a kind gift from Dr. Douglas T. Golenbock (Division of Infectious Diseases and Immunology, Department of Medicine, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA). Cells were stimulated with HSV-1 (10^5 PFU/ml or at multiplicities of infection [MOIs] of 2 or 10), LPS (100 ng/ml; from *Escherichia coli*, 055:B5; Sigma, St. Louis, MO), Malp-2 (10 ng/ml; Alexis Biochemicals, San Diego, CA), CpG 2006 and 1826 (5 μ mol/L; Alexis Biochemicals), or *E. coli* (100 units/cell) for 6 or 24 hours. Human IL-8 was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; BD, Franklin Lakes, NJ) in the supernatants of HEK293, HEK TLR4, and HEK TLR2 cells 24 hours after stimulation, and the relative increase in luciferase activity was measured in HEK TLR9 cells 6 hours after stimulation.

Intraperitoneal Macrophages

Thioglycollate-elicited peritoneal macrophages were obtained from either C57BL/6, TLR2^{-/-}, TLR9^{-/-}, or TLR2/9^{-/-} mice by peritoneal washing, activated with murine IFN- γ as previously described,²³ and then stimulated with HSV-1 (MOI of 10) for 24 hours. Murine TNF α and IL-12 p40 were measured in the supernatants by ELISA (BD).

Mice

TLR2^{-/-} and TLR9^{-/-} mice were generated at Osaka University (Osaka, Japan) and were kind gifts from Shizuo Akira, and the TLR2/9^{-/-} mice were obtained by crossing TLR2^{-/-} and TLR9^{-/-} mice at the National Institutes of Health (Bethesda, MD) and were kind gifts from Alan Sher. The mice were backcrossing to the C57BL/6 background for eight generations. The C57BL/6 (wild-type, control) and the knockout mice were maintained in a pathogen-free, barrier environment in the Centro de Pesquisas René Rachou, Oswaldo Cruz Foundation (CPqRR/FIOCRUZ; Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil). Six- to ten-week-old male mice were anesthetized with ketamine (AgribRANDS do Brasil Ltda, Brazil), and 10⁸ PFU of purified HSV-1 in 10 μ l was inhaled by the mice as described previously.³⁰ The control mice inhaled PBS. The mouse colonies and all experimental procedures were performed according to the institutional animal care and use guidelines from the CPqRR/FIOCRUZ. The project was previously approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation (Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) from Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) and Comitê de Ética em Utilização de Animais (CEUA) from CPqRR/FIOCRUZ).

Tissue Culture Infectious Dose Titration

Frozen mouse tissues were ground with sterile sand and 300 μ l (trigeminal ganglia) or 500 μ l (brains) of Dulbecco's modified Eagle's medium containing 1% fetal bovine serum and antibiotics. Then the samples were centrifuged at 6700 g for 10 minutes at 4°C, and the supernatants were used for titration in a standard tissue culture infectious dose (TCID₅₀) assay.³¹

RNA Extraction

Trigeminal ganglia and brains were aseptically removed and stored at -70°C until processing. RNA extraction was performed by using the TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's procedures. One microliter of the extracted RNA was quantified with a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer at wavelengths of 260 and 280 nm.

Reverse Transcription

Reverse transcription was performed according to the procedures provided by the manufacturer of the M-MLV RT enzyme (Promega, Madison, WI).

Real-Time PCR

Real-time quantitative PCR (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) was performed to measure mRNA expression in the trigeminal ganglia and brains of mice infected with HSV-1. The reactions were performed by using the SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) in an Applied Biosystems 7000 Sequence Detection System and at 50°C for 2 minutes, 95°C for 10 minutes, and 40 cycles of 95°C for 15 minutes and 60°C for 1 minute, followed by a final dissociation stage. The following oligonucleotides were used in the reactions: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (forward: 5'-GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG-3'; reverse: 5'-GATTCAACTTGCCTCATCTTAGGC-3'); IFN β (forward: 5'-CTGGAGCAGCTGAATGGAAA-3'; reverse: 5'-TGTCTGCTGGTGGAGTTCAT-3'); IP-10 (CXCL10; forward: 5'-GCCGTCATTTTCTGCCTCAT-3'; reverse: 5'-GCTCCCTATGGCCCTCATT-3'); MCP-1 (CCL2; forward: 5'-CTTCTGGGCTGCTGTTCATCA-3'; reverse: 5'-CCAGCCTACTCATTGGGATCA-3'); MIP-1 α (CCL3; forward: 5'-ACTGCCTGCTGCTTCTCCTA-3'; reverse: 5'-TTGGAGTCAGCGCAGATCTG-3'³²); IL-1 β (forward: 5'-CGCAGCAGCACATCAACAAGAGC-3'; reverse: 5'-TGTCTCATCCTGGAAGGTCCACG-3'); α trans-inducing factor (forward: 5'-TTTGACCCGCGAGATCCTAT-3'; reverse: 5'-GCTCCGTTGACGAACATGAA-3'³³); TLR2 (forward: 5'-TTGCTCCTGCGAACTCCTAT-3'; reverse: 5'-AGCCTGGTGACATTCCAAGA-3'); and TLR9 (forward: 5'-ACCTCAGC-CACAACATTCTC-3'; reverse: 5'-TGCACCTCCAACAGT-AAGTC-3').³⁴ The comparative Ct method with the formula 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} was used to analyze the data. Gene expression was normalized to the expression of the constitutively expressed gene Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase. All reactions were replicated.

ELISA Assays

Supernatants from HEK293 cells (empty vector and TLR2 and TLR4MD.2 transfected cells) were tested for the presence of human IL-8 (BD) according to the manufacturer's protocols. Supernatants from macrophages stimulated with HSV-1 were tested for the presence of murine TNF α and murine IL-12 p40 (BD) according to the manufacturer's protocols. Mice sera were tested for the presence of murine IL-1 β and CXCL10 (IP10) by using ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN) and for murine IFN- γ and CCL2 (MCP1) by using the cytometric bead array (CBA) mouse inflammation kit (BD) according to the manufacturer's protocols.

Luciferase Activity Measurement

HEK TLR9 cells were cultured in 96-well plates (2 \times 10⁴ cells/well). After incubation for 1 day, cells were transiently transfected (using Genejuice [Novagen, Darmstadt, Germany] according to manufacturer's instructions) with a plasmid containing an artificial promoter preceding the firefly luciferase gene with five binding sites for nuclear factor κ B. Cells were also co-transfected with a plasmid containing a constitutively expressed Renilla-luciferase reporter gene

(Promega). After 24 hours, the cells were stimulated as described in *Human Embryo Kidney Cells*. After 6 hours, the cells were lysed, and 20 μ l of each protein extract was used for the activity measurement. Extracts were distributed in 96-well plates, and 100 μ l of luciferin was added to each well at room temperature immediately before the reading. Luciferase activity levels were detected in a Lumat LB 9501 over 10 seconds of luminosity.

Histopathology

Brain samples were fixed with 10% formaldehyde in phosphate buffer, routinely processed, and embedded in paraffin as previously described.²³ For each group, topographically matched temporal lobe and periventricular white matter consecutive sections were scored in 14 microscopic fields (20 \times objective; $n = 3$ per group). The histopathological aspects of parenchyma and meninges were evaluated by vascular reactivity (endothelial reactivity and proliferation and level of perivascular cell infiltration) and scored as mild (+), moderate (++), or intense (+++). Vascular changes, edema, and cell infiltration of leptomeninges were scored as mild (+), moderate (++), or intense (+++).

Histopathology and Immunostaining

For trigeminal ganglia immunostaining, samples were frozen in Tissue-Tek O.C.T. compound (Sakura, Finetek, Torrance, CA), and 5- μ m slices were cut with a HM505N microtome cryostat (Mikron, Vista, CA). Tissues were stained as previously described³⁵ with modifications (see Supplemental Figure 1, A–E, at <http://ajp.amjpathol.org>). Briefly, the tissue sections were incubated with primary antibodies for 2 hours, washed, and incubated with labeled secondary antibody. The sections were counterstained with *Hoechst* and mounted in Hydromount aqueous medium (National Diagnostics, Atlanta, GA). The primary antibodies used were CD3 (1:100) and CD8 (1:100; Serotec, Raleigh, NC). The secondary antibody was Alexa Fluor 488 goat anti-rat IgG (1:500; Molecular Probes, Carlsbad, CA). Nuclei counterstaining was performed by using *Hoechst* (0.2 μ g/ml; Molecular Probes). The stained sections were observed and photographed on an Olympus BX51 microscope (Olympus, Tokyo, Japan) by using a Megacybernetics color digital camera and the Image Pro-Express software.

Cell Preparation and Flow Cytometry

Single-cell suspensions were prepared from the TG of WT mice that were divided into control and infected groups. Tissues were digested with collagenase for 30 minutes at 37°C. After incubation, the TGs were disrupted by grinding with a syringe plunger. The cells were washed, suspended in RPMI with 10% fetal bovine serum, and counted by trypan blue exclusion with high viability. A total of 10⁶ cells were plated for macrophage and dendritic cell measurements, and 5 \times 10⁵ for CD4, CD8, and natural killer (NK) cell measurements. Cells were incubated for 1 hour in 5% CO₂ at 37°C. Then the BD GolgiPlug Protein Transport

Inhibitor (BD Biosciences, San Jose, CA) was added to the wells where IFN- γ production was evaluated, and the plates were incubated for 8 hours. Plates were centrifuged at 532 \times g for 5 minutes at 4°C and suspended in Fluorescence activated cell sorting (FACS) buffer solution with anti-mouse CD11c (FITC; BD Pharmingen, San Diego, CA), anti-mouse CD11b (PECy7; eBioscience, San Diego, CA), and anti-mouse F4/80 (APC; eBioscience) antibodies to identify macrophages and dendritic cells; with anti-mouse NK1.1 (FITC; BD Pharmingen), anti-mouse CD4 (APC; eBioscience), anti-mouse CD8 (PECy5; BD Pharmingen), and anti-mouse I-A^b (PE; BD Pharmingen) antibodies to identify CD4, CD8, and NK cells; and with FC Block (BD Pharmingen) for all of the markers. The cells were then incubated for 20 minutes at room temperature, washed two times, and suspended in 200 μ l of FACS buffer. For T and NK cells marked with IFN- γ , cells were incubated with BD cytofix/cytoperm solution (15 minutes at 4°C in the dark), followed by washing and incubation with BD Perm/Wash solution (150 ml/well). After washing and centrifugation at 532 \times g for 5 minutes at 4°C, the cells were suspended in BD Perm/Wash solution with IFN- γ (PE; BD Pharmingen) and incubated for 30 minutes at 4°C in the dark. The cells were washed with BD Perm/Wash and centrifuged twice (532 \times g for 5 minutes, 4°C). The cells were finally suspended in 200 μ l of FACS buffer solution. For each sample, between 100,000 and 200,000 events were captured for analysis. The data were analyzed using the FlowJo 7.2.5 software (Tree Star, Inc., Ashland, OR) and are presented as the percentage of positive cells within the gated population.

Statistical Analysis

The real-time PCR results were statistically analyzed by using Mann-Whitney nonparametric t -tests. The HEK cells results were analyzed with analysis of variance tests. The macrophage and flow cytometry results were analyzed with unpaired t -tests. The analyses were performed by using the GraphPad Prism 5 software for Windows (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA).

Results

Infectious HSV-1 Reaches the TG of C57BL/6 Mice on Day 2 Postinfection and Peaks on Day 5 Postinfection

C57BL/6 WT mice were intranasally infected with 10⁶ PFU of HSV-1. The animals were euthanized over the course of 8 days postinfection (d.p.i.), and the brains and TG were aseptically removed and snap frozen to verify the presence of infectious virus particles. Mouse TG supernatants induced an HSV-1 cytopathic effect in Vero cells from 2 to 6 d.p.i. (Table 1). For a few animals, it was possible to calculate infectious particles in the TG (3 to 5 d.p.i.), with an average of 10^{2.99} TCID₅₀/ml. The mouse brain supernatants did not present any detectable infectious particles.

Table 1. Kinetics of HSV-1 Multiplication in C57BL/6 Mouse Organs

d.p.i.	CPE of TGs in Vero cells*	TCID ₅₀ /ml in TGs†	CPE of brains in Vero cells*
1	ND‡	ND	ND
2	+(3/4)	ND	ND
3	+(3/4)	10 ^{3.3} (1/4)	ND
4	+(3/4)	10 ^{2.9} (1/4)	ND
5	+(3/4)	10 ^{2.7} and 10 ^{2.9} (2/4)	ND
6	+(2/4)	ND	ND
7	ND	ND	ND
8	ND	ND	ND

*Cytopathic effect (CPE) detected in Vero cells infected with TG or brain supernatants; n/4 indicates the number of positive mice in a total of four mice per day.

†TCID₅₀/ml, median tissue infective dose.

‡ND, virus was not detected.

Viral, Cytokine, and TLR Transcripts Are Increased in C57BL/6 Mice TG on Day 5 Postinfection

Another group of C57BL/6 WT mice was intranasally infected with 10⁶ PFU of HSV-1. This experiment was performed as described above, except that only TGs were analyzed to verify the expression of viral and cytokine transcripts by real-time quantitative PCR. HSV-1 Virion Protein 16 (VP-16; also known as α trans-inducing factor), a late viral gene expressed only during the replication cycle of the virus,³³ was detected in mouse TG from 2 to 8 d.p.i. (Figure 1A). The level of the VP-16 transcript increased until 5 d.p.i. (when it had a more pronounced expression) and decreased until 8 d.p.i. (Figure 1A). The cytokines/chemokines IFN- γ , CXCL10/IP-10, CCL2/MCP-1, and CCL3/MIP 1 α measured in mouse TG showed a similar profile, with increased expression until

5 d.p.i., followed by a decrease until 8 d.p.i., when the levels returned to baseline (Figure 1, B–E). The increase in the transcripts was only statistically significant for the chemokines CXCL10/IP10 (4, 5, and 6 d.p.i.; Figure 1C), CCL2/MCP-1 (5 and 6 d.p.i.; Figure 1D), and CCL3/MIP 1 α (5 d.p.i.; Figure 1E). As for IFN- γ , the level of the IFN β transcript was higher on day 5 postinfection but was not statistically significant (data not shown). TLRs 2 and 9 expression levels were also significantly increased in WT infected mice on day 5 postinfection (Figure 1F). Thus, the presence of infectious virus particles and its replication seemed to correlate with increases in cytokine and TLR expression in the TG of C57BL/6 mice, with a peak of viral and cytokine expression on day 5 postinfection.

HSV-1 Activates TLR2 and TLR9 in Transfected HEK293 Cells

HEK293 cells stably transfected with plasmids expressing TLR2, TLR4, or TLR9, or an empty vector were stimulated with HSV-1. Control cells had only basal levels of IL-8 expression for all stimuli tested (Figure 2A). In TLR4-expressing cells (Figure 2B), HSV-1 did not stimulate IL-8 production, indicating that our purified virus was not contaminated with LPS and that the virus does not activate this receptor. Only cells expressing TLR2 (Figure 2C) or TLR9 (Figure 2D) were activated after viral stimulation, as measured by the production of IL-8 in the supernatants or by luciferase activity, respectively. These results indicate that TLR2 and TLR9 recognize HSV-1 and stimulate an immune response against the virus.

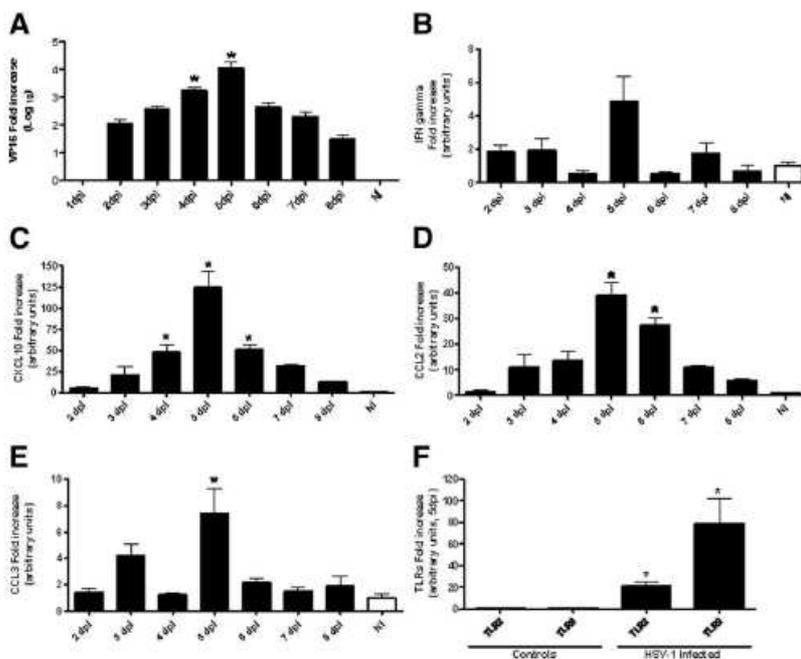


Figure 1. Patterns of viral, cytokine, and chemokine transcript expression and TLR expression in C57BL/6 mouse trigeminal ganglia. C57BL/6 mice were intranasally infected with 10⁶ PFU HSV-1, and four pools of trigeminal ganglia of three animals were collected each day from 1 to 8 d.p.i. Uninfected mice (ND) aspirated only PBS. After RNA extraction and reverse transcription, real-time PCR was performed. (A) VP-16 HSV-1 transcript, (B) IFN- γ , (C) CXCL10 (IP-10), (D) CCL2 (MCP-1), and (E) CCL3 (MIP 1 α). In F, TLR2 and 9 expression levels were measured in WT mice on day 5 postinfection. **P* < 0.05. Statistical analyses were performed with Kruskal-Wallis nonparametric tests and Dunn's multiple comparison tests. Bars represent the SEM. The results shown are representative of two experiments that yielded similar results.

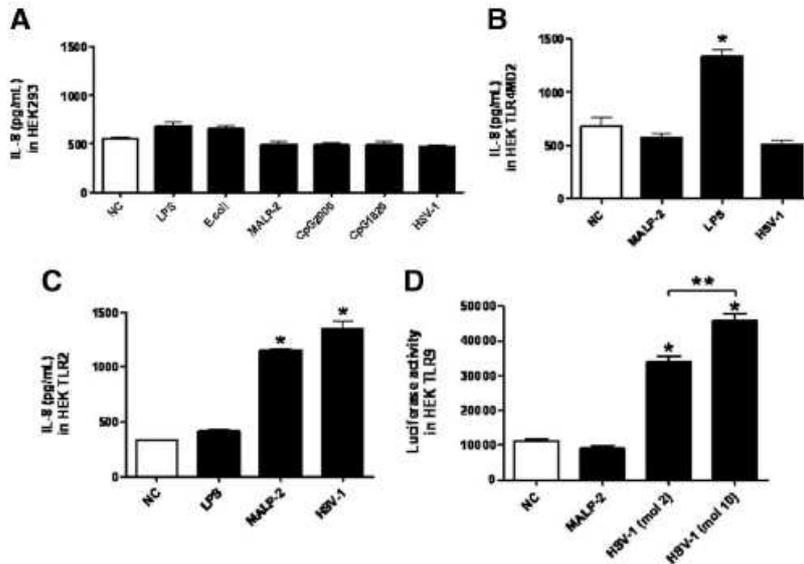


Figure 2. TLR2 and TLR9 activation in HEK cells after HSV-1 stimulation. HEK cells were stably transfected with plasmids expressing TLR2, TLR4, or TLR9 and were then stimulated with HSV-1 (10^5 PFU/ml in A, B, and C, or at MOIs of 2 and 10 in D), LPS (10 ng/ml), Malp-2 (10 ng/ml), CpG 2006, and 1826 (5 μ mol/L), or *E. coli* (100 units/cell), as indicated in the figure. After 24 hours of stimulation, IL-8 in the supernatants (for A, B, and C) or the relative increase in luciferase expression (for D) was measured. (A) HEK 293; (B) HEK TLR4; (C) HEK TLR2; and (D) HEK TLR9. The results shown are representative of two experiments that yielded similar results. Statistical analyses were performed with analysis of variance tests, and the bars represent the SEM. * $P < 0.05$; statistical difference between the bar and the respective negative control (medium stimulated). ** $P < 0.05$; statistical difference between the indicated bars.

TLR2 and TLR9 Contribute to Production of IL-12p40 and TNF α in Macrophages

C57BL/6 WT, TLR2^{-/-}, TLR9^{-/-}, and TLR2/9^{-/-} mouse-derived macrophages were stimulated with HSV-1, and the levels of IL12p40 and TNF α were measured in the cell supernatants. All infected macrophages derived from TLR null mice showed reduced production of cytokines when compared with infected macrophages derived from WT infected mice (Figure 3, A and B). TLR2 and TLR9 seemed to contribute synergistically to the production of IL12p40 in macrophages because the double KO mice had a more pronounced reduction in this cytokine compared with the single KOs (Figure 3A).

TLR9^{-/-} and TLR2/9^{-/-} Mice Have Higher Susceptibility to HSV-1 Intranasal Infection

C57BL/6 WT, TLR2^{-/-}, TLR9^{-/-}, and TLR2/9^{-/-} mice were intranasally infected with 10^6 PFU of HSV-1. Mice were observed daily for clinical signs of encephalitis (prostration, ruffled fur, hunched posture, and posterior paw paralysis). After the symptoms were observed, mice

were euthanized, and their brains were collected and snap frozen to verify the presence of the virus. Most of the mice died on day 6 postinfection, but the TLR2/9^{-/-} mice began to die earlier than the other groups (Figure 4). C57BL/6 WT and TLR2^{-/-} infected mice had low mortality rates of around 10% (Figure 4). TLR9^{-/-} infected animals had a more pronounced mortality of approximately 60% (Figure 4). The mortality was even higher for TLR2/9^{-/-} infected mice, with 100% of the mice dying from infection (Figure 4). Brain TCID₅₀ titrations demonstrated that all euthanized animals with encephalitis had HSV-1 in their brains (Table 2), and the virus titers were two logs higher in TLR9^{-/-} and TLR2/9^{-/-} mice and one log lower in TLR2^{-/-} mice compared with the titer of WT mice (Table 2). Infectious virus particles were not found in the brains of mice without signs of encephalitis (Table 2).

TLR2/9^{-/-} Mice Have Major Histopathological Changes in the Brain on Day 5 Postinfection

For all experiments described from this point on, C57BL/6 WT, TLR2^{-/-}, TLR9^{-/-}, and TLR2/9^{-/-} mice were intranasally infected with 10^6 PFU of HSV-1. Because the

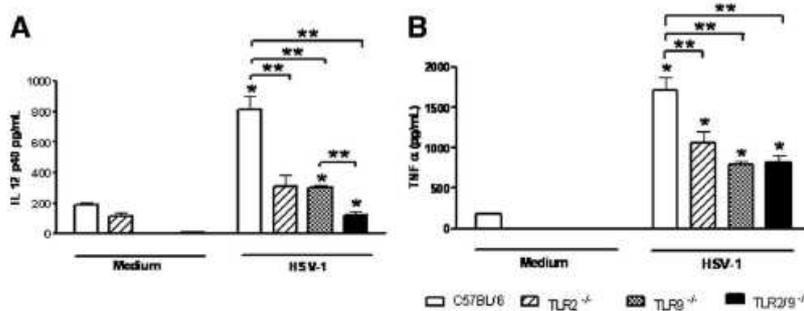


Figure 3. TNF α and IL-12 p40 production in peritoneal macrophages stimulated with HSV-1. A and B: Macrophages derived from C57BL/6 WT mice (white columns), TLR2^{-/-} mice (striped columns), TLR9^{-/-} mice (pointed columns), or TLR2/9^{-/-} mice (black columns) were exposed to HSV-1 (MOI of 10), and the levels of IL12 p40 (A) and TNF α (B) were measured in the culture supernatants 24 hours after stimulation. This experiment is representative of two experiments. Statistical analyses were performed with unpaired *t*-tests, and the bars represent the SEM. * $P < 0.05$; statistical difference between the bar and the respective negative control (medium stimulated). ** $P < 0.05$; statistical difference between the indicated bars.

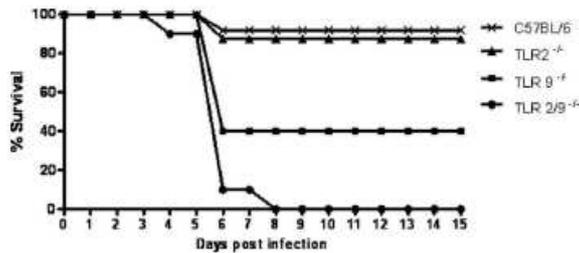


Figure 4. Survival rates of mice intranasally inoculated with HSV-1. C57BL/6 (crosses), TLR2^{-/-} (triangles), TLR9^{-/-} (squares), and TLR2/9^{-/-} (circles) mice were intranasally inoculated with 10⁶ PFU HSV-1, and mouse mortality was quantified daily (*n* = 10 for each group). This experiment is representative of three analyses.

previous experiments indicated that 5 d.p.i. was probably an important point for virus control in WT mouse TG and because many mice died after day 5, we euthanized the animals on day 5 postinfection. Half of each brain was formalin fixed for histopathological analysis. Microscopic examination of the brains stained with H&E on day 5 postinfection revealed slight endothelial cell reactivity and perivascular edema of parenchyma and meninges of WT and TLR2^{-/-} infected mice (Figure 5, A-I; Table 3). TLR9^{-/-} mice presented an intermediate intensity of changes, as shown in Figure 5, A-I, and Table 3. The most severe neuropathological signs of encephalitis were seen in TLR2/9^{-/-} infected mice and were characterized by intense leptomeningitis associated with edema, white matter vacuolization, endothelial reactivity, and perivascular edema (Figure 5, J-L; Table 3). Focal encephalitis characterized by mononuclear cell infiltrates and activated glial cells associated with perivascular cuffing were found exclusively in these animals (Figure 5; Table 3).

Cytokine and Chemokine Transcript Profiles Are Altered in the TG of TLR2/9^{-/-} Mice on Day 5 Postinfection

To compare viral and cytokine expression in the TG and brains of WT and knockout mice, sera, TG and half of each brain were aseptically removed from the animals, snap frozen, and processed for analysis. Real-time quantitative PCR indicated that the HSV-1 VP-16 mRNA was detected in similar amounts in TG of mice from all groups (Figure 6A). All cytokine transcripts measured were significantly up-regulated in the TG of all groups of infected mice but in different amounts (Figure 6, B-E). IFN- γ (Figure 6B) was down-regulated in all infected knockout mice compared with infected WT mice. A lower level of expression of IL-1 β (Figure 6C) was found in TLR2/9^{-/-} infected mice compared with

the other groups of infected animals. CXCL10/IP-10 (Figure 6D) was overexpressed in infected TLR2/9^{-/-} animals compared with the other groups. CCL2/MCP-1 (Figure 6E) had a similar profile, but there was not a difference between infected TLR2/9^{-/-} and TLR9^{-/-} mice. IFN β and CCL3/MIP 1 α had similar levels of transcript up-regulation in all infected groups (data not shown).

Cytokine Expression Profile Alterations Are Not Evident in TLR2/9^{-/-} Mouse Brains and Sera on Day 5 Postinfection

Brains of the same animals from the experiment described above were analyzed for cytokine transcripts by real-time quantitative PCR. The cytokine transcripts were significantly up-regulated in brains of almost all groups of infected mice (in different amounts; Figure 7, A-D) compared with uninfected mice, except for IFN- γ and IL1 β transcripts in TLR2/9^{-/-} mice (Figure 7, A and B) and for IFN- γ in WT mice (Figure 7A). CXCL10/IP-10 (Figure 7C) and CCL2/MCP-1 (Figure 7D) were over expressed in infected TLR2/9^{-/-} animals compared with the other groups. Unlike the results for TG, IFN- γ transcripts (Figure 7A) were not up-regulated in infected C57BL/6 WT mouse brains compared with infected knockouts; however, the transcript levels in brains of infected TLR2/9^{-/-} mice were not increased compared with the respective control mice. A lower level of IL-1 β (Figure 7B) was observed in TLR2/9^{-/-} mice compared with the other groups of infected animals, but this difference was significant only when compared with infected WT mice. IFN β and CCL3/MIP 1 α showed similar patterns of up-regulation in all infected groups (data not shown). To quantify cytokine production in mice sera, ELISA and CBA were performed. IP-10/CXCL10 and IL 1 β were not detected in the sera (data not shown), although there were detectable amounts of IFN- γ and MCP-1/CCL2 in infected mice compared with controls (Figure 7, E and F). However, only MCP-1/CCL2 exhibited a significant difference between the groups, which was shown by an increase in production in TLR2/9^{-/-} when compared with WT mice (Figure 7F).

TG of HSV-1 Infected C57BL/6 Mice Have Increased Macrophage Population in Comparison to TG of Noninfected Mice

To study the cell populations in TG of infected and non-infected WT mice, we performed Giemsa staining of different areas of WT control (see Supplemental Figure 1A at <http://ajp.amjpathol.org>) and WT infected (see Supple-

Table 2. HSV-1 Presence in Mouse Brains

Mouse group	Mice without signs of encephalitis		Mice with signs of encephalitis	
	%	Mean brain TCID ₅₀ /ml	%	Mean brain TCID ₅₀ /ml
C57BL/6	92	0	8	10 ²
TLR2 ^{-/-}	90	0	10	10
TLR9 ^{-/-}	40	0	60	10 ⁴
TLR2/9 ^{-/-}	0	0	100	10 ⁴

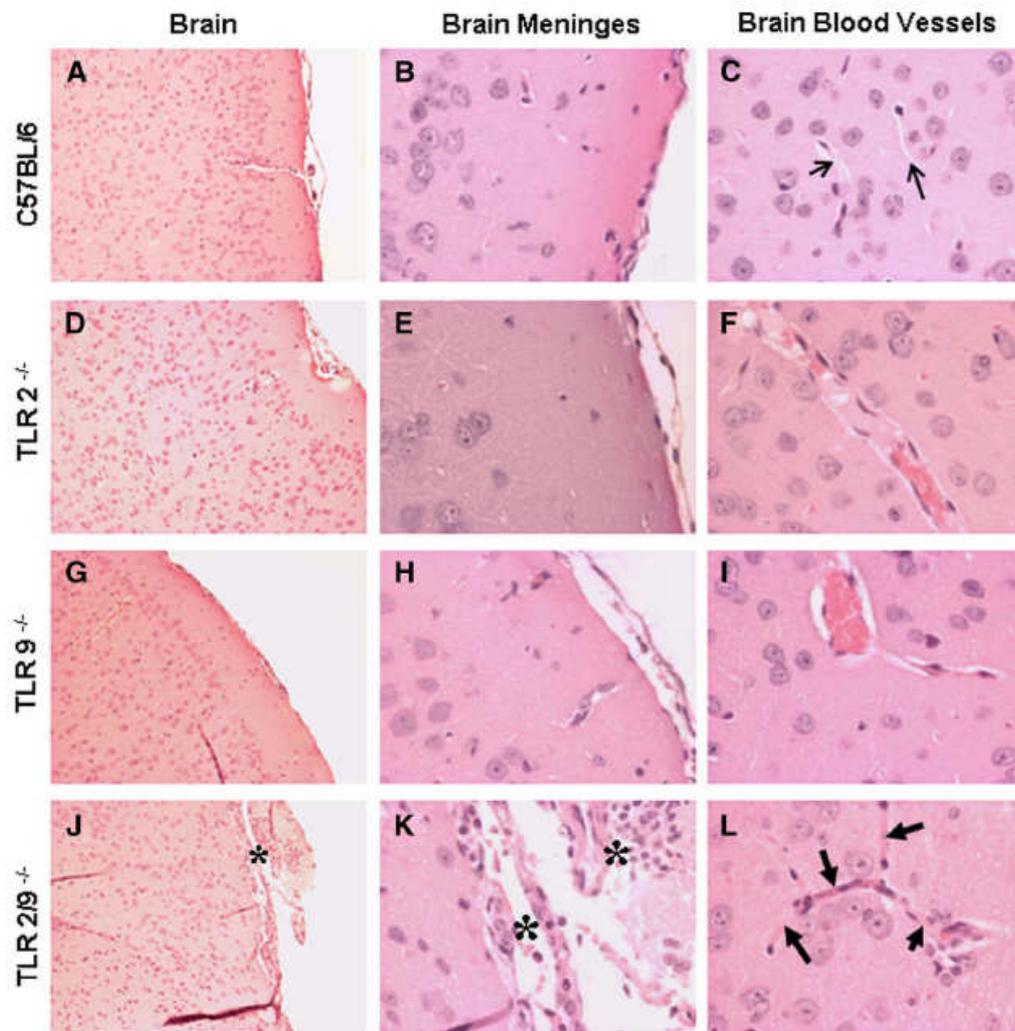


Figure 5. Histopathological analysis of knockout mouse brains on day 5 postinfection. C57BL/6, TLR2^{-/-}, TLR9^{-/-}, and TLR2/9^{-/-} mice were intranasally infected with 10⁶ PFU HSV-1, and the brains of three animals per group were collected on day 5 postinfection and processed for histopathological analysis. **A–I** Changes in the brain parenchyma and meninges of C57BL/6, TLR2^{-/-}, and TLR9^{-/-} mice were mild. **J and K:** Intense leptomeninges cell infiltration and edema were apparent in TLR2/9^{-/-} mice (asterisks). **L:** Endothelial vascular reactivity in a small vessel of the brain parenchyma vessels was more intense in TLR2/9^{-/-} mice (arrows). In **C**, note the regular aspect of the parenchymal vessels (arrows). Original magnification of the mouse brain, ×100 (left). Original magnification of the mouse brain meninges, ×400 (middle). Original magnification of the mouse brain blood vessels, ×400 (right).

mental Figure 1B at <http://ajp.amjpathol.org>) ganglia. The data showed increased cellularity of the ganglia root (double asterisks) and close to neurons (single asterisk), where many small mononuclear cells were

detected in infected mice (arrows). Furthermore, flow cytometry showed an increase in macrophages in the TG of WT infected mice compared with noninfected mice (Figure 8A).

Table 3. Histopathological Changes in HSV-1-Infected Mice at 5 d.p.i.

Parameters*	Endothelial reactivity and proliferation	Perivascular cuffing and perivascular cell infiltration	Edema and cell infiltration of leptomeninges
Groups			
C57BL/6	+ (3/3)	+ (3/3)	+ (3/3)
TLR2 ^{-/-}	+ (3/3)	+ (3/3)	+ (3/3)
TLR9 ^{-/-}	++ (3/3)	++ (3/3)	+ (3/3)
TLR2/9 ^{-/-}	+++ (3/3)	+++ (3/3)	+++ (3/3)

*Histopathological changes were scored as mild +, moderate ++, or intense +++; (3/3), three of three examined animals presented the degree of indicated changes.

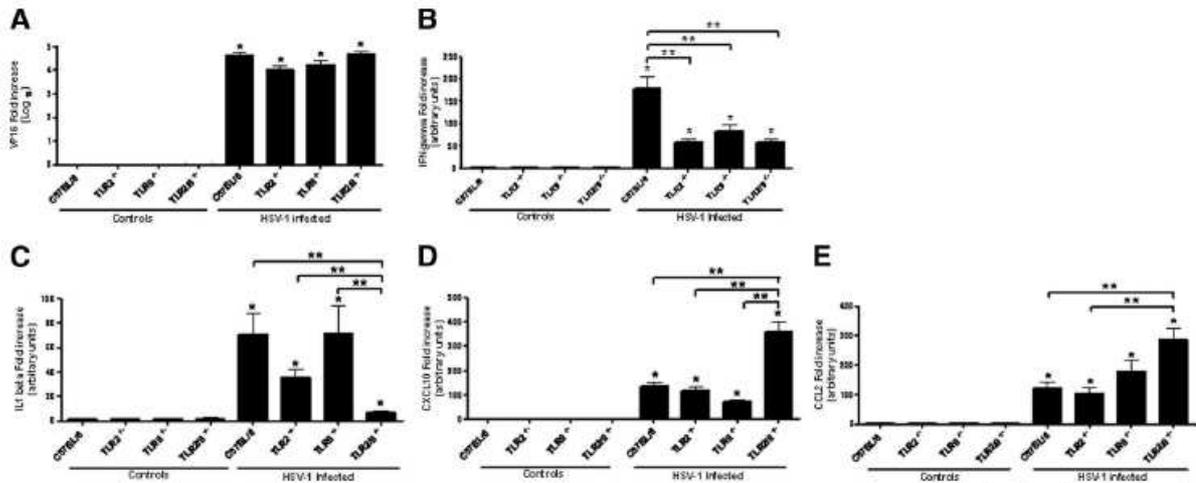


Figure 6. Viral, cytokine, and chemokine transcripts in knockout mouse trigeminal ganglia on day 5 postinfection. C57BL/6, TLR2^{-/-}, TLR9^{-/-}, and TLR2/9^{-/-} mice were intranasally infected with 10⁶ PFU HSV-1, and trigeminal ganglia of six to nine animals per group were collected on day 5 postinfection. Control mice aspirated only PBS (*n* = 4 for each group). After RNA extraction and reverse transcription, real-time PCR was performed. (A) VP-16 HSV-1 transcript; (B) IFN-γ; (C) IL-1β; (D) CXCL10 (IP-10); and (E) CCL2 (MCP-1). This experiment is representative of two replicates. **P* < 0.05; statistical difference between the bar and the respective negative control. ***P* < 0.05; statistical difference between the indicated bars. Statistical analyses were performed with Mann-Whitney *t*-tests, and the bars represent the SEM.

CD8 Cells Produce a Higher Amount of IFN-γ in TG after Infection with HSV-1

We detected CD3 (see Supplemental Figure 1D at <http://ajp.amjpathol.org>) and CD8 (see Supplemental Figure 1E

at <http://ajp.amjpathol.org>) positive cells in the TG of infected mice but not in noninfected mice (see Supplemental Figure 1C at <http://ajp.amjpathol.org>). Additionally, we performed flow cytometry analysis of TG after treatment with collagenase. Although the differences in CD8 T cells

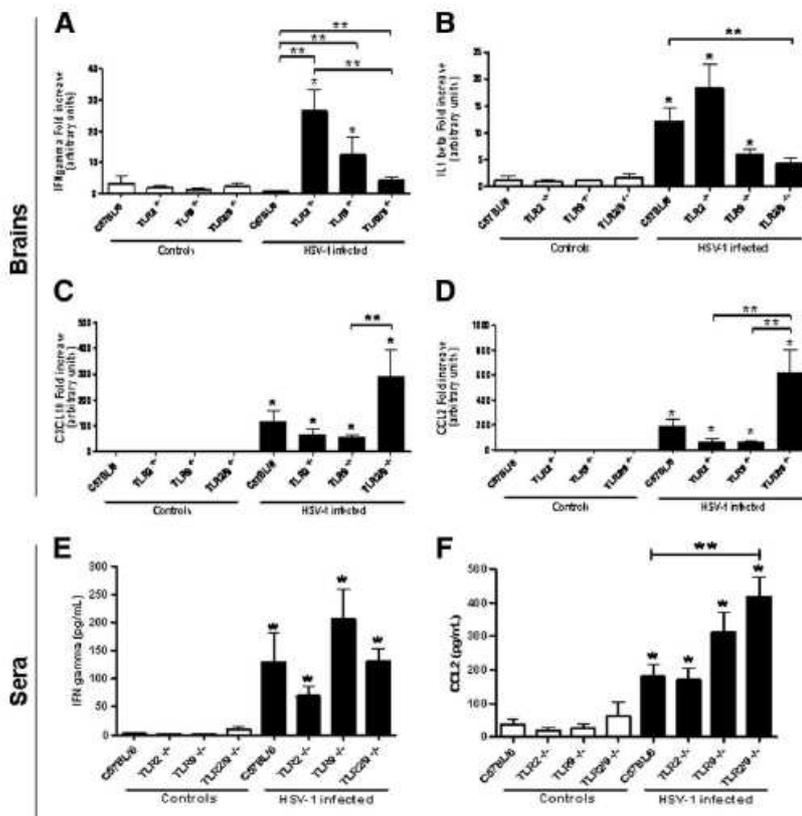


Figure 7. Cytokine and chemokine transcript expression levels in knockout mouse brains and cytokine production in mice sera on 5 d.p.i. C57BL/6, TLR2^{-/-}, TLR9^{-/-}, and TLR2/9^{-/-} mice were intranasally infected with 10⁶ PFU HSV-1, and brains and sera of six to nine animals per group were collected on day 5 postinfection. Control mice aspirated only PBS (*n* = 4 for each group). After RNA extraction and reverse transcription of the brains, real-time PCR was performed. (A) IFN-γ; (B) IL-1β; (C) CXCL10 (IP-10); and (D) CCL2 (MCP-1). In the sera, levels of IFN-γ (E) and CCL2 (MCP-1; F) were measured by CBA. The results are representative of two experiments that yielded similar results. **P* < 0.05; statistical difference between the bar and the respective negative control. ***P* < 0.05; statistical difference between the indicated bars. Statistical analyses were performed with Mann-Whitney *t*-tests, and the bars represent the SEM.

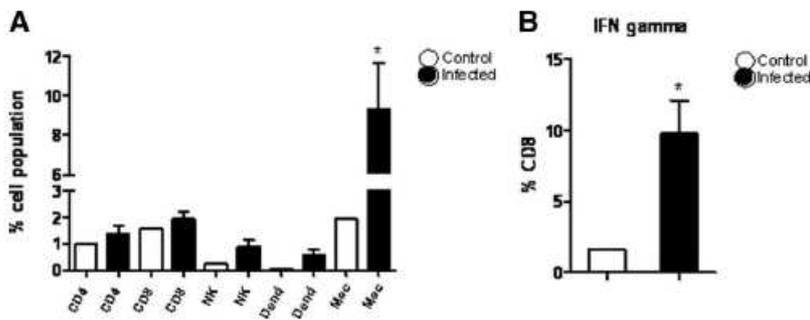


Figure 8. TG of HSV-1-infected C57BL/6 mice have increased macrophage population and CD8 cells that produce IFN- γ . Mice were intranasally infected with 10^6 PFU of HSV-1, and the TG of five animals per group were collected on day 5 postinfection. Control mice aspirated only PBS ($n = 3$ for each group). TGs were treated with collagenase, and the population of cells was analyzed by flow cytometry by using antibodies against the indicated cells (A). An antibody against IFN- γ was used in CD8 T cells (B). All data presented are the mean \pm SEM; * $P < 0.05$ for comparison by *t*-test.

were not statistically significant between WT infected and noninfected TG mice (Figure 8A), the CD8 T cells of infected mice produced a higher level of IFN- γ than the CD8 T cells of noninfected mice (Figure 8B).

Discussion

Innate immunity to HSV-1 has been studied by many different research groups in recent years.^{20–24,26,27,35,36} Although these studies show the importance of TLRs and other immune receptors and cytokines/chemokines in HSV-1 recognition and control, some discrepancies remain concerning the benefits of these responses. The differences in results are probably due to the high diversity in the animal models used in these works.³⁷ Viral strain, mouse strain, and inoculation route variations may produce different immune responses,³⁸ making comparisons between the results of each experiment difficult. However, each different model may have indications for one specific clinical manifestation of the broad spectrum of herpetic manifestations. Our research group uses a strain of HSV-1 that was isolated from a naturally occurring human lip recurrence. Additionally, the intranasal inoculation route that we used in our experiments³⁰ is similar to the natural route of infection because the lips (natural infection) and nose have common innervations.

In this work, we demonstrated that most C57BL/6 WT mice, which have a low susceptibility to an intranasal inoculation of 10^6 PFU of HSV-1, are capable of controlling viral replication in TG, which prevents the infectious virus from reaching the brain, because the infectious virus was found in TG but not in the brains of WT animals. HSV-1 infection generally leads to a localized infection; the virus initiates replication in mucosa and then reaches the dorsal root ganglia termini, from which it is intraxonally transported to the TG, where it replicates or becomes latent.³ However, sometimes, for reasons that are not well understood, the virus reaches the brain, where it causes encephalitis.⁶ Using an intranasal inoculum of 10^4 PFU, a previous study from our group demonstrated by immunohistochemistry that only mice with signs of encephalitis expressed viral proteins in brain cells, but all infected mice expressed viral proteins in TG cells 8 d.p.i.²³ With the higher PFU inoculation used in this study, the virus reached the TG in WT mice around 2 d.p.i. (Table 1; Figure 1A), replicated until 6 d.p.i. (Table 1) and then was controlled by the mice, although

the viral VP-16 transcripts remained, in lower amounts, until day 8 postinfection (Figure 1A), which was the last day analyzed. In most of the WT mice, once the virus reached the TG, it stimulated the expression of cytokines and chemokines that control virus replication, preventing most of the infectious virus from reaching the brain. This response seems to be very well regulated because the expression of these molecules in WT mouse TG was more elevated on day 5 postinfection (Figure 1, B–E)—when the virus is replicating in higher amounts and TLR expression is increased (Figure 1F)—and returns to basal levels as soon as the infectious virus particles are controlled. The TLR-dependent immune responses in TG seem to be fundamental for controlling HSV-1 infection and preventing the virus from reaching the brain, where it could cause lethal encephalitis.

Many groups have already shown that TLR2 and TLR9 recognize HSV-1 or HSV-2, which activates an immune response to the virus.^{20–25} Because different viral strains may elicit different responses,³¹ we decided to confirm that our isolate was able to activate those receptors. Using HEK293 cells stably expressing TLRs, we have shown that HSV-1 activates TLR2 and TLR9 but not TLR4 or cells that do not express these receptors (Figure 2). Using similar cell constructs, Kurt-Jones et al²⁰ could not detect TLR9 activation on HSV-1 KOS stimulation (but they detected TLR2 activation). Although Kurt-Jones et al²⁰ did not determine whether this was due to a technical limitation, Sato et al²⁴ found similar results when comparing TLR stimulation of HSV-1 KOS and other HSV strains; however, Sato et al²⁴ also demonstrated that, although not recognized by TLR9 in HEK cells, the analyzed virus seemed to use this receptor to stimulate dendritic cell responses. Because different systems seemed to elicit different responses, we investigated whether our HSV-1 strain elicited TLR2 and TLR9 responses in HEK cells and in macrophages. We discovered that both receptors were important for cytokine production in these cells, but the level of importance varied with the type of cytokine. In macrophages (Figure 3), TLR2 and TLR9 contribute to IL12p40 and TNF α production. Although, there seemed to be some cooperation between these receptors for IL12p40 (because the double KO had a lower production when compared with the single KOs), an effect that was not observed for TNF α . Thus, the importance of the TLRs varies by cytokine type.

After we demonstrated that our isolate stimulated TLR2 and TLR9 *in vitro* and *ex vivo*, we analyzed the roles of these receptors *in vivo*. C57BL/6 WT, TLR2^{-/-}, TLR9^{-/-}, and TLR2/9^{-/-} mice were infected with HSV-1, and the mortality rates indicated that TLR2 plays a minor role in mouse survival because TLR2^{-/-} mice had a low mortality rate that was very similar to that of WT mice (Figure 4). TLR9 seemed to play a major role in infection control because null animals showed a higher mortality rate compared with WT mice (Figure 4). In a previous study,²³ it was shown that MyD88 is fundamental for immune defense against HSV-1, with 100% mortality observed in MyD88^{-/-} mice and 50% mortality in IFN- γ ^{-/-} mice. Our data strongly suggested, for the first time, that TLR2 and TLR9 cooperate *in vivo* to induce this MyD88-dependent response in HSV-1 infected mice; we showed that infection of TLR2/9^{-/-} mice results in 100% mortality (Figure 4), as previously shown for MyD88^{-/-} mice. All animals that died with signs of encephalitis (prostration, ruffled fur, hunched posture, and posterior paw paralysis) had infectious virus particles in their brains, which were not observed for animals without signs of encephalitis (Table 2). Therefore, the presence of infectious HSV-1 in mouse brains correlated with the signs of encephalitis and death, as previously shown.^{23,39} The virus titers were higher in infected TLR9^{-/-} and TLR2/9^{-/-} animals compared with infected WT or TLR2^{-/-} animals (Table 2).

The analysis of cytokine and chemokine expression indicated that high expression of CXCL10/IP-10 and CCL2/MCP-1 was related to deaths because infected TLR2/9^{-/-} mice had an increased level of these chemokines in the TG and brain (Figures 6 and 7). Kurt-Jones et al²⁰ have already shown that mice that succumbed to HSV-1 infection have high levels of the CCL2/MCP-1 transcript in the brain. Although it may be important to control the virus, CXCL10/IP-10 could also have some deleterious role in HSV-1 infection because mice treated with an anti-CXCL10 antibody showed prolonged survival, even though viral yields were significantly greater in the infected tissue.⁴⁰ Importantly, we show a correlation between low levels of IFN- γ and IL-1 β transcripts in TG and poor survival; all infected knockout mice showed reduced expression of IFN- γ in TG (Figure 6). In WT mice, the level of IFN- γ in TG would already be sufficient to control the virus, whereas the TLR2^{-/-} mice still produced IFN- γ in the brain because production in the TG was lower than in WT mice (Figures 6 and 7).

Unlike TLR2^{-/-} mice, TLR2/9^{-/-} mice had high amounts of virus in the brain (Table 2), and the absence of IFN- γ in brains of the latter (Figure 7) seems to be important for their immune response. IFN- γ possesses an important antiviral potential and is capable of controlling viral replication during the early phases of infection.⁴¹ Additionally, He et al⁴² also found that IFN- γ -deficient mice had a higher mortality rate and delayed virus clearance after an ocular inoculation of the HSV-1 Amakata strain. However, as we have reported previously,²³ 50% of IFN- γ ^{-/-} mice died when infected with HSV-1, whereas all infected MyD88^{-/-} mice died. Therefore, although expression of IFN- γ , either in the TG or brain, is necessary to control the virus, there must be another

MyD88-dependent process that is important for total immune defense against HSV-1. Interestingly, IL-1 β signaling is MyD88 dependent.⁴³ It has been shown that IL-1 β plays a critical role in Herpes Simplex virus encephalitis; in an intranasal murine model of infection with HSV-1 strain H25, IL-1 knockout mice had lethal encephalitis, higher brain viral loads, and inadequate immune responses in the brain.⁴⁴ IL-1 β also has a role in promoting the repair of the central nervous system.⁴⁵ We observed that IL-1 β expression levels were significantly reduced in infected TLR2/9^{-/-} mice TG and brains (Figures 6 and 7), and it was not reduced in the TG of infected TLR9^{-/-} or TLR2^{-/-} mice (Figure 6). This cytokine was also not reduced in the brain of TLR2^{-/-} mice (Figure 7), and it was reduced in TLR9^{-/-} mice, although it was not statistically lower compared with expression in WT mice. This reduction in IL-1 β could explain why TLR2^{-/-} and TLR9^{-/-} mice have a insignificant or only 60% mortality, respectively, compared with 100% mortality in TLR2/9^{-/-} mice, even though both TLR2^{-/-} and TLR9^{-/-} mice, as well as TLR2/9^{-/-} mice, produced lower levels of IFN- γ in the TG compared with WT mice. Additionally, TLR2^{-/-} mice showed a higher level of IFN- γ expression in the brain (Figure 7) and a higher expression level of IL-1 β in the TG and brain (Figures 6 and 7) compared with TLR2/9^{-/-} mice; this increased cytokine expression could be responsible for the effective immune response against HSV-1 in this knockout mouse.

Our results showed that IFN- β and MIP1 α were up-regulated in the TG of all groups of infected mice compared with uninfected mice (data not shown). Although important in HSV control,⁴⁶⁻⁴⁸ expression of these molecules probably does not depend on TLR2 or TLR9 in the TG.

Furthermore, TLR2/9^{-/-} infected mice have major histopathological alterations in the brain compared with those observed in WT brains or in the brains of the other knockout mice evaluated (Figure 5; Table 3). The brain parenchyma of TLR2/9^{-/-} mice had focal lesions, and the infiltration of meninges was visibly more intense than the degenerative changes in the brain parenchyma. Brain meninges were compromised in infected TLR2/9^{-/-} mice, as shown by the massive presence of inflammatory cells inside and outside the meningeal vessels. Similar brain alterations were found in susceptible mice in another study.²⁰ Marques et al⁴⁹ suggested that neurological damage might be related to CXCL10/IP-10 and CCL2/MCP-1 production and that these chemokines are probably microglia derived, a hypothesis that demands further *in vivo* and *in vitro* investigation. Our data indicated that TLR2/9^{-/-} mice had significantly higher histopathology scores (brain and meninges) than WT and TLR2^{-/-} mice, but the differences were less apparent when compared with TLR9^{-/-} mice.

Together, the results indicate that although TLR9 seems to have a more critical role *in vivo* than TLR2, both receptors are not only important receptors in HSV-1 recognition and control but also may cooperate in the activation of the immune response because the double knockout mice had higher mortality rates and more prominent immune alterations and brain pathology on day 5 postinfection. Immunological and pathological alterations

were not as evident in TLR9^{-/-} mice, probably due to differences in kinetics compared with TLR2/9^{-/-} mice because the latter began to die earlier than the former. Additionally, IFN β and CCL3/MIP 1 α transcripts had similar expression levels in the TG for all groups of animals, suggesting that other receptors could be involved and that other pattern recognition receptors may also contribute to HSV-1 control. Retinoic acid inducible gene-like receptors and DNA-dependent activator of IFN regulatory factors are some of the pattern recognition receptors that have also been shown to recognize HSV.^{50,51}

Finally, we have shown that infection control depends on an immune response in the TG and brain in the herpes intranasal model. HSV-1 control seems to be mainly local because the only cytokine profile altered in knockout susceptible mice sera was that of CCL2/MCP1 (Figure 7F). The response in the TG seems to limit virus replication to prevent too much virus (if any) from reaching the brain—an essential process to prevent encephalitis. The response in the brain may not only be an attempt to contain the virus but also may be designed to prevent brain damage. These responses must be well regulated because not only the virus but also the immune response itself may cause tissue damage and encephalitis.⁵² This indicates that, in addition to activating cytokine and chemokine production, TLRs may have a role in the regulation of the immune response. This idea is corroborated by recent findings that indicate that TLRs may suppress the immune response of T cells and NK cells,⁵³ control B cells responses,⁵⁴ transiently silence pro-inflammatory genes,⁵⁵ modulate chemokine receptors, and redirect leukocyte migration.⁵⁶ Because the brain histopathology 5 d.p.i. showed mononuclear infiltration only in the meninges of TLR2/9^{-/-} mice, we must further investigate TLR participation in HSV-1 control by identifying all of the cells that are responsible for cytokine/chemokine production in the TG and brains of resistant and susceptible mice. However, on day 5 postinfection the TG of WT infected mice show increased cellularity of the ganglia root and in areas close to neurons, where many small mononuclear cells were detected by Giemsa staining and macrophages were detected by flow cytometry. These mononuclear cells could be the TLR-producing cells. Additionally, cells of the TG from infected mice showed positive immunostaining for CD8 T cells and produced higher levels of IFN- γ , which we showed by flow cytometry. Our next goal is to study in detail each cell of the TG that participates in the immune response and its respective cytokine. The data from this work showed that the immune response in the TG is crucial to prevent against encephalitis, contributing to the understanding of innate immune responses to HSV-1 and may, in the future, provide some clues to aid in the fight against viral brain pathogens.

Acknowledgments

We thank Dr. Douglas T. Golenbock (University of Massachusetts Medical School) for providing us with the HEK cell lines; Dr. Shizuo Akira (Osaka, Japan) for providing

the TLR2^{-/-} and TLR9^{-/-} mice; and Dr. Alan Sher (NIH, Bethesda, MD) for providing us with the TLR2/9^{-/-} mice.

References

1. Cowan FM, French RS, Mayaud P, Gopal R, Robinson NJ, Artimos de Oliveira S, Faillace T, Uusküla A, Nygard-Kibur M, Ramalingam S, Sridharan G, El Aouad R, Alami K, Rbai M, Sunil-Chandra NP, Brown DW: Seroepidemiological study of herpes simplex virus types 1 and 2 in Brazil, Estonia, India, Morocco and Sri Lanka. *Sex Transm Infect* 2003, 79:286–290
2. Fatahzadeh M, Schwarz RA: Human herpes simplex virus infections: Epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *J Am Acad Dermatol* 2007, 57:737–763
3. Roizman B, Knipe DM, Whitley RJ: Herpes Simplex Viruses. *Fields virology* ed 5. Edited by DM Knipe, RM Howley. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2007, pp 2501–2576
4. Garner JA: Herpes simplex virion entry into and intracellular transport within mammalian cells. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2003, 55:1497–1513
5. Theil D, Derfuss T, Paripovic I, Herberger S, Meinel E, Schueler O, Strupp M, Arbusow V, Brandt T: Latent Herpes virus infection in human trigeminal ganglia causes chronic immune response. *Am J Pathol* 2003, 163:2179–2184
6. Whitley RJ: Herpes simplex encephalitis: adolescents and adults. *Antiviral Res* 2006, 71:141–148
7. Ishii KJ, Koyama S, Nakagawa A, Coban C, Akira S: Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. *Cell Host Microbe* 2008, 3:352–363
8. Rasmussen SB, Reinert LS, Paludan SR: Innate recognition of intracellular pathogens: detection and activation of the first line of defense. *APMIS* 2009, 117:323–337
9. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takeda H, Ogawa T, Takeda K, Akira S: Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram negative and Gram positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999, 11:443–451
10. Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Paganini E, Procópio DO, Travassos LR, Smith JA, Golenbock DT, Gazzinelli RT: Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* 2001, 167:416–423
11. Campos MA, Rosinha GMS, Almeida IC, Salgueiro XS, Jarvis BW, Splitter GA, Bruna-Romero O, Gazzinelli RT, Oliveira SC: The role of Toll-like receptor 4 in induction of cell-mediated immunity and resistance to *Brucella abortus* infection in mice. *Infect Immun* 2004, 72:176–186
12. Latz E, Visintin A, Lien E, Fitzgerald KA, Monks BG, Kurt-Jones EA, Golenbock DT, Espevik T: Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction. *J Biol Chem* 2002, 277:47834–47843
13. Lien E, Means TK, Heine H, Yoshimura A, Kusumoto S, Fukase K, Fenton MJ, Oikawa M, Qureshi N, Monks B, Finberg RW, Ingalls RR, Golenbock DT: Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 2000, 105:497–504
14. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, McNally O, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B: Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in TLR4 gene. *Science* 1998, 282:2085–2088
15. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA: Recognition of double-stranded RNA and activation of NF κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001, 413:432–438
16. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A: The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001, 410:1099–1103
17. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S: A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000, 408:740–745
18. Takeda K, Kaisho T, Akira S: Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003, 21:335–376
19. Yamamoto M, Takeda K, Akira S: TIR domain-containing adaptors

- define the specificity of TLR signaling. *Mol Immunol* 2004, 40:861–868
20. Kurt-Jones EA, Chan M, Zhou S, Wang J, Reed G, Bronson R, Arnold MM, Knipe DM, Finberg R W: Herpes simplex virus 1 interaction with toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101:1315–1320
 21. Hochrein H, Schlatter B, O’Keeffe M, Wagner C, Schmitz F, Schiemann M, Bauer S, Suter M, Wagner H: Herpes simplex virus type-1 induces IFN-alpha production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101:11416–11421
 22. Krug A, Luker GD, Barchet W, Leib DA, Akira S, Colonna M: Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) activates murine natural interferon-producing cells (IPC) through Toll-like receptor 9. *Blood* 2004, 103:1433–1437
 23. Mansur DS, Kroon EG, Nogueira ML, Arantes RME, Rodrigues SCO, Akira S, Gazzinelli RT, Campos MA: Lethal encephalitis in myeloid differentiation factor 88: deficient mice infected with herpes simplex virus 1. *Am J Pathol* 2005, 166:1419–1426
 24. Sato A, Linehan MM, Iwasaki A: Dual recognition of herpes simplex viruses by TLR2 and TLR9 in dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, 103:17343–17348
 25. Sorensen LN, Reinert LS, Malmgaard L, Bartholdy C, Thomsen AR, Paludan SR: TLR2 and TLR9 synergistically control herpes simplex virus infection in the brain. *J Immunol* 2009, 181:8604–8612
 26. Casrouge A, Zhang S, Eidenschenk C, Jouanguy E, Puel A, Yang K, Alcais A, Picard C, Mahfouf N, Nicolas N, Lorenzo L, Plancoulaine S, Sénéchal B, Geissmann F, Tabet K, Hoebe K, Du X, Miller RL, Héron B, Mignot C, de Villemeur TB, Lebon P, Dulac O, Rozenberg F, Beutler B, Tardieu M, Abel L, Casanova JL: Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-93B deficiency. *Science* 2006, 314:308–312
 27. Zhang S, Jouanguy E, Ugolini S, Smahi A, Elain G, Romero P, Segal D, Sancho-Shimizu V, Lorenzo L, Puel A, Picard C, Chapgier A, Plancoulaine S, Titeux M, Cognet C, von Bernuth H, Ku CL, Casrouge A, Zhang XX, Barreiro L, Leonard J, Hamilton C, Lebon P, Héron B, Vallée L, Quintana-Murci L, Hovnanian A, Rozenberg F, Vivier E, Geissmann F, Tardieu M, Abel L, Casanova JL: TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science* 2007, 317:1522–1527
 28. Nogueira ML, Siqueira RC, Freitas N, Amorim JB, Bonjardim CA, Ferreira PC, Orefice F, Kroon EG: Detection of herpesvirus DNA by the polymerase chain reaction (PCR) in vitreous samples from patients with necrotising retinitis. *J Clin Pathol* 2001, 54:103–106
 29. Campos MA, Kroon EG: Critical period of irreversible block of Vaccinia virus replication. *Rev Bras Microbiol* 1993, 24:104–110
 30. Boivin G, Coulombe Z, Rivest S: Intranasal herpes simplex virus type 2 inoculation causes a profound thymidine kinase dependent cerebral inflammatory response in the mouse hindbrain. *Eur J Neurosci* 2002, 16:29–43
 31. Schmidt NJ: Cell culture techniques for diagnostic virology. *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial, and Chlamydial Infections*. Edited by EH Lennette, NJ Schmidt. Washington DC, American Public Health Association Inc, 1979, p 100
 32. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C: An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 2001, 25:386–401
 33. Broberg EK, Nygardas M, Salmi AA, Hukkanen V: Low copy number detection of herpes simplex virus type 1 mRNA and mouse Th1 type cytokine mRNAs by light cycler quantitative real time PCR. *J Virol Methods* 2003, 112:53–65
 34. Kuhlicke J, Frick JS, Morote-Garcia JC, Rosenberger P, Eltzschig HK: Hypoxia inducible factor (HIF)-1 coordinates induction of toll-like receptors TLR2 and TLR6 during hypoxia. *PLoS One* 2007, 2:e1364
 35. Préhaud C, Mégret F, Lafage M, Lafon M: Virus infection switches TLR3 positive human neurons to become strong producers of beta interferon. *J Virol* 2006, 79:12893–12904
 36. Sarangi PP, Kim B, Kurt-Jones E, Rouse BT: Innate recognition network driving the HSV induced corneal immunopathology: role of Toll pathway in the early inflammatory events in stromal keratitis. *J Virol* 2007, 81:11128–11138
 37. Sancho-Shimizu V, Shen-Ying Z, Laurent A, Tardieu M, Rozenberg F, Jouanguy E, Casanova J: Genetic susceptibility to herpes simplex virus 1 encephalitis in mice and humans. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007, 7:495–505
 38. Kern ER: Use of viral infections in animal models to assess changes in the immune system. *EHP* 1982, 43:71–79
 39. Lopez C: Genetics of natural resistance to herpesvirus infections in mice. *Nature* 1975, 258:152–153
 40. Carr DJJ, Chodosh J, Ash J, Lane TE: Effect of anti-CXCL10 monoclonal antibody on Herpes Simplex Virus Type 1 keratitis and retinal infection. *J Virol* 2003, 77:10037–10046
 41. Elleman-Eriksen S: Macrophages and cytokines in the early defense against herpes simplex virus. *J Virol* 2002, 2:59–89
 42. He J, Ichimura H, Iida T, Minami M, Kobayashi K, Kita M, Sotozono C, Tagawa Y, Iwakura Y, Imanishi J: Kinetics of cytokine production in the cornea and trigeminal ganglion of C57BL/6 mice after corneal HSV-1 infection. *J Interferon Cytokine Res* 1999, 19:609–615
 43. Sun D, Ding A: MyD88-mediated stabilization of interferon-gamma-induced cytokine and chemokine mRNA. *Nature Immunol* 2006, 7:375–381
 44. Sergerie Y, Rivest S, Boivin G: Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta play a critical role in the resistance against lethal herpes simplex virus encephalitis. *J Infect Dis* 2007, 196:853–860
 45. Mason JL, Suzuki K, Chaplin DD, Matsuhashita GK: Interleukin 1-beta promotes repair of the CNS. *J Neurosci* 2001, 21:7046–7052
 46. Carr DJJ, Campbell IL: Herpes simplex virus type 1 induction of chemokine production is unrelated to viral load in the cornea but not in the nervous system. *Viral Immunol* 2006, 19:741–746
 47. Sainz Jr., B, Halford WP: Alpha/Beta Interferon and gamma interferon synergize to inhibit the replication of herpes simplex virus type 1. *J Virol* 2002, 76:11541–11550
 48. Vollstedt S, Arnold S, Schwerdel C, Franchini M, Alber G, Di Santo JP, Ackermann M, Suter M: Interplay between alpha/beta and gamma interferons with B, T, and natural killer cells in the defense against herpes simplex virus type 1. *J Virol* 2004, 78:3846–3850
 49. Marques CP, Hu S, Sheng W, Lokensgard JR: Microglial cells initiate vigorous yet non-protective immune responses during HSV-1 brain infection. *Virus Res* 2006, 121:1–10
 50. Rasmussen SB, Jensen SB, Nielsen C, Quartin E, Kato H, Chen ZJ, Silverman RH, Akira S, Paludan SR: Herpes simplex virus infection is sensed by both Toll-like receptors and retinoic acid-inducible gene-like receptors, which synergize to induce type I interferon production. *J Gen Virol* 2009, 90:74–78
 51. Takaoka A, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, Ban T, Lu Y, Miyagishi M, Kodama T, Honda K, Ohba Y, Taniguchi T: DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 2007, 448:501–505
 52. Lundberg P, Ramakrishna C, Brown J, Tyska JM, Hamamura M, Hinton DR, Kovats S, Nalcioglu O, Weinberg K, Openshaw H, Cantin EM: The immune response to herpes simplex virus type 1 infection in susceptible mice is a major cause of central nervous system pathology resulting in fatal encephalitis. *J Virol* 2008, 82:7078–7088
 53. Vaknin V, Blinder L, Wang L, Gazit R, Shapira E, Genina O, Pines M, Pikarsky E, Baniyash M: A common pathway mediated through Toll-like receptors leads to T- and natural killer-cell immunosuppression. *Blood* 2008, 111:1437–1447
 54. Pasare C, Medzhitov R: Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature* 2005, 438:364–368
 55. Foster SL, Hargreaves DV, Medzhitov R: Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature* 2007, 447:972–978
 56. McKimmie CS, Moore M, Fraser AR, Jamieson T, Xu D, Burt C, Pitman NI, Nibbs RJ, McInnes IB, Liew FY, Graham GJ: A TLR2 ligand suppresses inflammation by modulation of chemokine receptors and redirection of leukocyte migration. *Blood* 2009, 113:4224–4231

9 REFERÊNCIAS

1. Pellet, P.E. & Roizman, B. The Family *Herpesviridae*: A brief Introduction. In: Knipe D.M. & Howley R.M. Fields virology. 5th ed.. Philadelphia - Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2479–99.
2. Medzhitov, R.; Preston-Hurlburt, P.; Janeway, C.A.Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997; 388(6640): 394-7
3. Janeway, C.A.; Travers, P.; Walport, M.; Shlomchik, M.J. *Imunobiologia - O sistema imune na saúde e na doença*. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
4. Lund, J.; Sato, A.; Akira, S.; Medzhitov, R.; Iwasaki, A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med*. 2003; 198(3): 513-20.
5. Kurt-Jones, E. A., Chan, M., Zhou, S., Wang, J., Reed, G., Bronson, R., *et al*. Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 1315-20.
6. Mansur, D.S.; Kroon, E.G.; Nogueira, M.L.; Arantes, R.M.E.; Rodrigues, S.C.O.; Akira, S. *et al*. Lethal Encephalitis in Myeloid Differentiation Factor 88-Deficient Mice Infected with Herpes Simples Virus 1. *Am J Pathol*. 2005; 166: 1419-26.
7. ICTVdB Management. 00.031.1.01.001. Human herpesvirus 1. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4, Columbia University, New York: Büchen-Osmond, C. (Ed); 2006.
8. Davison, A.J.; Eberle, R.; Ehlers, B.; Hayward, G.S.; McGeoch, D.J.; Minson, A.C. *et al* The order *Herpesvirales*. *Arch Virol*. 2009; 154:171–77.
9. Reske, A.; Pollara, G.; Krummenacher, C.; Chain, B.M.; Katz, D.R. Understanding HSV-1 entry glycoproteins. *Rev Med Virol*. 2007; 17, 205-15.
10. Garner, J.A. Herpes simplex virion entry into and intracellular transport within mammalian cells. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003; v.55: 1497-513.
11. Roizman, B; Knipe, D.M.; Whitley, R.J. Herpes Simplex Viruses. In: Knipe, D.M. & Howley, R.M. Fields virology. 5th ed. Pennsylvania-Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p.2502–601.

12. Arduino, P.G. & Porter, S.R. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features. *J Oral Pathol Med.* 2008; 37(2): 107-21.
13. Kelly, B.J.; Fraefel, C.; Cunningham, A.L.; Diefenbach, R.J. Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Virus Res.* 2009; 145(2): 173-86.
14. Mettenleiter, T.C.; Klupp, B.G.; Granzow, H. Herpesvirus assembly: an update. *Virus Res.* 2009; 143(2): 222-34.
15. Heldwein, E.E. & Krummenacher, C. Entry of herpesviruses into mammalian cells. *Cell Mol Life Sci.* 2008; 65(11): 1653-68.
16. Akhtar, J. & Shukla, D. Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry. *FEBS J.* 2009; 276(24): 7228-36.
17. Nicola, A.V.; Hou, J.; Major, E.O.; Straus, S.E. Herpes simplex virus type 1 enters human epidermal keratinocytes, but not neurons, via a pH-dependent endocytic pathway. *J Virol.* 2005; 79 (12): 7609-16.
18. Clement, C.; Tiwari, V.; Scanlan, P.M., Valyi-Nagy, T.; Yue, B.Y.J.T.; Shukla, D. A novel role for phagocytosis-like uptake in herpes simplex virus entry. *J Cell Biol.* 2006; 174 (7): 1009-21.
19. Whitley, R.J. & Roizman, B. Herpes simplex viruses: is a vaccine tenable? *J Clin Invest.* 2002; 109: 145-51.
20. Heldwein, E.E. & Krummenacher, C. Entry of herpesviruses into mammalian cells. *Cell Mol Life Sci.* 2008; 65(11): 1653-68.
21. Lehman, I.R. & Boehmer, P.E. Replication of Herpes Simplex Virus DNA. *J Biol Chem.* 1999; 40: 28059-62.
22. Strang, B.L. & Stow, N.D. Circularization of the herpes simplex virus type 1 genome upon lytic infection. *J Virol.* 2005; 79(19): 12487-94.
23. Preston, C.M. Repression of viral transcription during herpes simplex virus latency. *J Gen Virol.* 2000; 81: 1-19.

24. Jacobs, A.; Breakefield, X.O.; Fraefel, C. HSV-1-based vectors for gene therapy of neurological diseases and brain tumours: Part. I. HSV-1 structure, replication and pathogenesis. *Neoplasia*. 1999; 1(5): 387-401.
25. Weir, J.P. Regulation of herpes simplex virus gene expression. *Gene*. 2001; 271: 117-30.
26. Schmutzhard, E. Viral infections of the CNS with special emphasis on herpes simplex infections. *J Neurol*. 2001; 248: 469-77.
27. Cunningham, A.L.; Diefenbach, R.J.; Miranda-Saksena, M.; Bosnjak, L.; Kim, M.; Jones, C.; *et al.* The cycle of human herpes simplex virus infection: virus transport and immune control. *J Infect Dis*. 2006; 194: S11-8.
28. Hübner, K.; Derfuss, T.; Herberger, S.; Sunami, K.; Russell, S.; Sinicina, I.; *et al.* Latency of alpha herpes viruses is accompanied by a chronic inflammation in human trigeminal ganglia but not in dorsal root ganglia. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006; 65(10): 1022-30.
29. Conrady, C.D.; Drevets, D.A.; Carr D.J.J. Herpes simplex type I (HSV-1) infection of the nervous system: Is an immune response a good thing? *J Neuroimmunol*. 2010; 220(1-2): 1-9.
30. Halford, W.P.; Gebhardt, B.M.; Carr, D.J.J. Mechanisms of Herpes Virus Type 1 Reactivation. *J Virol*. 1996; 70: 5051-60.
31. Bloom, D.C.; Giordani, N.V.; Kwiatkowski, D.L. Epigenetic regulation of latent HSV-1 gene expression. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1799(3-4): 246-56.
32. Schiffer, J. T.; Abu-Raddad, L.; Mark, K. E.; Zhu, J.; Selke, S.; Magaret, A. *et al.* Frequent Release of Low Amounts of Herpes Simplex Virus From Neurons: Results of a Mathematical Model. *Sci Transl Med*. 2009; 1(7): 1-9.
33. Kolokotronis, A. & Doulas, S. Herpes simplex virus infection, with particular reference to the progression and complications of primary herpetic gingivostomatitis. *Clin Microbiol Infect*. 2006; 12: 202-211.
34. Simmons, A. Clinical Manifestations and Treatment considerations of Herpes simplex virus infection. *J Infect Dis*. 2002; 186: 871-7.
35. Schleiss, M.R. Persistent and recurring viral infections: the human herpesviruses. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2009; 39(1): 7-23.

36. Liesegang, T. J. Herpes simplex virus epidemiology and ocular importance. *Cornea*. 2001; 20: 1-13.
37. Looker, K.J. & Garnett, G.P. A systematic review of the epidemiology and interaction of herpes simplex virus types 1 and 2. *Sex Transm Infect*. 2005; 81: 103-7.
38. Livorsi, D.; Anderson, E.; Qureshi, S.; Howard, M.; Wang, Y.F.; Franco-Paredes, C. Brainstem encephalitis: an unusual presentation of herpes simplex virus infection. *J Neurol*. 2010; 257(9): 1432-7.
39. Itzhaki, R.F. & Wozniak, M.A. Herpes simplex virus type 1 in Alzheimer's disease: the enemy within. *J Alzheimers Dis*. 2008; 13(4): 393-405.
40. Holmes, C. & Cotterell, D. Role of infection in the pathogenesis of Alzheimer's disease: implications for treatment. *CNS Drugs*. 2009; 23(12): 993-1002.
41. Cowan, F. M. *et al*. Seroepidemiological study of herpes simplex virus types 1 and 2 in Brazil, Estonia, India, Morocco and Sri Lanka. *Sex Transm Infect*. 2003; 79: 286-90.
42. Xu, F.; Sternberg, M.R.; Kottiri, B.J.; McQuillan, G.M.; Lee, F.K.; Nahmias, A.J.; *et al*. Trends in herpes simplex virus type 1 and type 2 seroprevalence in the United States. *JAMA*. 2006; 296(8): 964-73.
43. Shiley, K. & Blumberg, E. Herpes viruses in transplant recipients: HSV, VZV, human herpes viruses, and EBV. *Infect Dis Clin North Am*. 2010; 24(2): 373-93.
44. Clemens, S.A. & Farhat, C.K. Seroprevalence of herpes simplex 1-2 antibodies in Brazil. *Rev Saude Publica*. 2010; 44(4): 726-34.
45. Flemington, E.K. Herpesvirus lytic replication and cell cycle: arresting new developments. *J Virol*. 2001; 75: 4475 – 81.
46. Paladino, P. & Mossman, K.L. Mechanisms employed by herpes simplex virus 1 to inhibit the interferon response. *J Interferon Cytokine Res*. 2009; 29(9): 599-607.
47. Melroe, G.T.; Deluca, N.A.; Knipe, D.M. Herpes simplex virus 1 has multiple mechanisms for blocking virus-induced interferon production. *J Virol*. 2004; 78(16): 8411-20.

48. Whitley, R.J. & Roizman, B. Herpes simplex virus infections. *The Lancet*. 2001; 357: 1513 – 18.
49. Tan, S.L. & Katze, M.G. HSV.com: maneuvering the internetworks of viral neuropathogenesis and evasion of the host defense. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(11): 5684-6568.
50. Khodarev, N.N.; Advani, S.J.; Gupta, N.; Roizman, B.E.; Weichselbaum, R.R. Accumulation of specific RNAs encoding transcriptional factors and stress response proteins against a background of severe depletion of cellular RNAs in cells infected with herpes simplex virus 1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 12062-7.
51. Kim, J.C.; Choi, S.H.; Kim, J.K.; Kim, Y.; Kim, H.J.; Im, J.S.; *et al*. Herpes simplex virus type 1 ICP27 induces apoptotic cell death by increasing intracellular reactive oxygen species. *Mol Biol (Mosk)*. 2008; 42(3): 470-7
52. Gupta, A.; Gartner, J.J.; Sethupathy, P.; Hatzigeorgiou, A.G.; Fraser, N.M. Anti-apoptotic function of microRNA encoded by the HSV-1 latency-associated transcript. *Nature*. 2006; 442: 82-5.
53. Herbst-Kralovetz, M.M. & Pyles, R.B. Toll-like receptors, innate immunity and HSV pathogenesis. *Herpes*. 2006; 13(2): 37-41.
54. Krug, A.; Luker, G.D.; Barchet, W.; Leib, D.A.; Akira, S.; Colonna, M. Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood*. 2004; 103: 1433-43.
55. Sato, A. & Iwasaki, A. Induction of antiviral immunity requires toll-like receptor signaling in both stromal and dendritic cell compartments. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 16274 –9.
56. Lima, G.K.; Zolini, G.P.; Mansur, D.S.; Lima, B.H.; Wischhoff, U.; Astigarraga, R.G. *et al* Toll-Like Receptor (TLR) 2 and TLR9 Expressed in Trigeminal Ganglia are Critical to Viral Control During Herpes Simplex Virus 1 Infection. *AJP*. 2010; 177(5): 2433 - 45.
57. Cunningham, A.L. & Mikloska, Z. Immune control of herpes diseases. *Herpes*. 2001; 8: 6 -10.
58. Mansur, D.S. O papel dos receptores do tipo toll na infecção pelo HSV-1. Tese. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas; 2007.

59. Lima, G.K. TLR2 e TLR9: Receptores Essenciais Para o Controle da infecção por vírus Herpes Simplex do Tipo 1. Tese. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas; 2010.
60. Janeway, C.A.Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1989; 54 (1): 1-13.
61. Junqueira, L.C. & Carneiro, J. *Histologia básica.* 9^a ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan; 1999. p.79-139.
62. GRAEBER, M.B. & STREIT, W.J. Microglia: biology and pathology *Acta Neuropathol.* 2010; 119(1): 89-105.
63. Gosselin, R.D.; Suter, M.R.; Ji, R.R.; Decosterd, I. Glial Cells and Chronic Pain. *Neuroscientist.* 2010; 16(5): 519-31.
64. Esiri, M.M.; Drummond, C.W.E.; Morris, C.S. Macrophages and microglia in HSV-1 infected mouse brain. *J Neuroimmunol.* 1995; 62: 201-5.
65. Lokensgard, J.R.; Cheeran, M.C.J.; Hu, S.; Gekker, G.; Peterson, P.K. Glial Cell Responses to Herpesvirus Infections: Role in Defense and Immunopathogenesis. *J Infect Dis.* 2002; 186: S171-9.
66. Marques, C.P.; Hu, S.; Sheng, W.; Lokensgard, J.R. Microglial cells initiate vigorous yet non-protective immune responses during HSV-1 brain infection. *Virus Res.* 2006; 121: 1-10.
67. Aravalli, R.N.; Peterson, P.K.; Lokensgard, J.R. Toll-like receptors in defense and damage of the central nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2007; 2(4): 297-312.
68. Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010; 11(5): 373-84.
69. Takeda, K.; Kaisho, T.; Akira, S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003; 21: 335-76.
70. Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature.* 2004; 430(6996): 257-63.

71. Akira, S.; Uematsu, S.; Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124: 783-801.
72. Beutler, B.; Jiang, Z.; Georgel, P.; Crozat, K.; Croker, B.; Rutschmann, S.; *et al.* Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu Rev Immunol.* 2006; 24: 353-89.
73. Barbalat, R.; Lau, L.; Locksley, R.M.; Barton, G.M. Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. *Nat. Immunol.* 2009; 10: 1200-7.
74. Blasius, A.L. & Beutler, B. Intracellular toll-like receptors. *Immunity.* 2010; 32(3): 305-15.
75. Palsson-McDermott, E.M., Doyle, S.L., McGettrick, A.F., Hardy, M., Husebye, H., Banahan, K., *et al.* TAG, a splice variant of the adaptor TRAM, negatively regulates the adaptor MyD88-independent TLR4 pathway. *Nat. Immunol.* 2009; 10: 579-86.
76. Vandevenne, P.; Sadzot-Delvaux, C.; Piette, J.; Innate immune response and viral interference strategies developed by Human Herpesviruses; *Biochem. Pharmacol.* 2010; 80: 1955-72.
77. Brennan, K. & Bowie, A.G. Activation of host pattern recognition receptors by viruses. *Curr Opin Microbiol.* 2010; 13(4): 503-7.
78. Ishii, K.J.; Koyama, S.; Nakagawa, A.; Coban, C.; Akira, S. Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. *Cell Host Microbe.* 2008; 3(6): 352-63.
79. Keating, S.E.; Baran, M.; Bowie, A.G. Cytosolic DNA sensors regulating type I interferon induction. *Trends Immunol.* 2011; 32(12): 574-81.
80. Kodukula, P.; Liu, T.; Rooijen, N.; Jager, M.J.; Hendricks, R.L. Macrophage control of herpes simplex virus type 1 replication in the peripheral nervous system. *J Immunol.* 1999; 162: 2895-905.
81. Liu, T.; Tang, Q.; Hendricks, R.L. Inflammatory infiltration of the trigeminal ganglion after herpes simplex virus type 1 infection. *J Virol.* 1996; 70: 264-71.

82. Lint, A.; Ayers, M.; Brooks, A.G.; Coles, R.M.; Heath, W.R.; Carbone, F.R. Herpes simplex virus-specific CD8⁺ T cells can clear established lytic infections from skin and nerves and can partially limit early spread of virus after cutaneous inoculation. *J Immunol.* 2004; 172: 392-7.
83. Lundberg, P.; Welander, P.; Han, X.; Cantin, E. Herpes simplex virus type 1 DNA is immunostimulatory in vitro and in vivo. *J Virol.* 2003; 77 (20): 11158-69.
84. Janeway, C.A.Jr. & Medzhitov, R. Innate Immune Recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 2002; 20: 197-216.
85. Zanoni, I.; Foti, M.; Ricciardi-Castagnoli, P.; Granucci, F. TLR-dependent activation stimuli associated with Th1 responses confer NK cell stimulatory capacity to mouse dendritic cells. *J Immunol.* 2005; 175: 286-92.
86. Reding, P.C.; Whitney, P.G.; Barr, D.P.; Smyth, M.J.; Brooks, A.G. NK cells contribute to the early clearance of HSV-1 from the lung but cannot control replication in the central nervous system following intranasal infection. *Eur. J. Immunol.* 2006; 36: 897-905.
87. Lima, G.K. Cinética De Multiplicação Viral e Análise da Expressão de IFN gama e Quimiocinas em Infecção Murina por Vírus Herpes Simplex 1. Dissertação. Belo Horizonte (MG); Universidade Federal de Minas Gerais– Instituto de Ciências Biológicas; 2007.
88. Mott, K.R.; Bresee, C.J.; Allen, S.J.; BenMohamed, L.; Wechsler, S.L.; Ghiasi, H. Level of herpes simplex virus type 1 latency correlates with severity of corneal scarring and exhaustion of CD8⁺ T cells in trigeminal ganglia of latently infected mice. *J Virol.* 2009; 83(5): 2246-54.
89. Stock, A.T.; Jones, C.M.; Heath, W.R.; Carbone, F.R. Rapid recruitment and activation of CD8⁺ T cells after herpes simplex virus type 1 skin infection. *Immunol Cell Biol.* 2011; 89(1): 143-8.
90. Pease, J.E. & Williams, T.J. The attraction of chemokines as a target for specific anti-inflammatory therapy. *Br J Pharmacol.* 2006; 147: 212-21.
91. Wuest, T.R. & Carr, D.J. The role of chemokines during herpes simplex virus-1 infection. *Front Biosci.* 2008; 13: 4862-72.
92. Cook, W.J.; Kramer, M.F.; Walker, R.M.; Burwell, T.J.; Holman, H.A.; Coen, D.M. *et al.* Persistent expression of chemokine and chemokine receptor RNAs at primary and latent sites of herpes simplex 1 infection. *Virol J.* 2004; 1: 5.

93. Carr, D.J.J. & Campbell, I.L. Herpes simplex virus type 1 induction of chemokine production is unrelated to viral load in the cornea but not in the nervous system. *Viral Immunol.* 2006; 19: 741-6.
94. Vollstedt, S.; Arnold, S.; Schwerdel, C.; Franchini, M.; Alber, G.; Di Santo, J.P. *et al.* Interplay between alpha/beta and gamma interferons with B, T and natural killer cells in the defense against herpes simplex virus type 1. *J Virol.* 2004; 78 (8): 3846-50.
95. Sainz Jr, B. & Halford, W.P. Alpha/Beta Interferon and gamma interferon synergize to inhibit the replication of herpes simplex virus type 1. *J Virol.* 2002; 76(22): 11541-50.
96. Pierce, A.T.; DeSalvo, J.; Foster, T.P.; Kosinski, A.; Weller, S.K.; Halford, W.P. Beta interferon and gamma interferon synergize to block viral DNA and virion synthesis in herpes simplex virus-infected cells. *J Gen Virol.* 2005; 86(9): 2421-32.
97. Ank, N.; West, H.; Bartholdy, C.; Eriksson, K.; Thomsen, A.R.; Paludan, S.R. Lambda interferon (IFN-lambda), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo. *J Virol.* 2006; 80(9): 4501-9.
98. Ank, N.; Iversen, M.B.; Bartholdy, C.; Staeheli, P.; Hartmann, R.; Jensen, U.B. *et al.* An important role for type III interferon (IFN-lambda/IL-28) in TLR-induced antiviral activity. *J Immunol.* 2008; 180(4): 2474-85.
99. Sommereyns, C.; Paul, S.; Staeheli, P.; Michiels, T. IFN-lambda (IFN-lambda) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo. *PLoS Pathog.* 2008; 4(3): e1000017.
100. Okabayashi, T.; Kojima, T.; Masaki, T.; Yokota, S.; Imaizumi, T.; Tsutsumi, H. *et al.* Type-III interferon, not type-I, is the predominant interferon induced by respiratory viruses in nasal epithelial cells. *Virus Res.* 2011; 160(1-2): 360-6.
101. Li, J.; Ye, L.; Wang, X.; Hu, S.; Ho, W. Induction of interferon- λ contributes to toll-like receptor 3-mediated herpes simplex virus type 1 inhibition in astrocytes. *J Neurosci Res.* 2012; 90(2): 399-406.
102. Shimeld, C.; Whiteland, J.L.; Williams, N.A.; Easty, D.L.; Hill, T.J. Cytokine production in the nervous system of mice during acute and latent infection with herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol.* 1997; 78: 3317-25.

103. Sergerie, Y.; Rivest, S.; Boivin, G. Tumor Necrosis Factor-Alpha and Interleukin-1beta Play a Critical Role in the Resistance against Lethal Herpes Simplex Virus Encephalitis. *J Infect Dis.* 2007; 196: 853-60.
104. Schroder, K.; Hertzog, P.J.; Ravasi, T.; Hume, D.A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 2004; 75(2): 163–89
105. Flannagan, R.S.; Cosío, G.; Grinstein, S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat Rev Microbiol.* 2009; 7(5): 355-66.
106. Johnson, K.E.; Knipe, D.M. Herpes simplex virus-1 infection causes the secretion of a type I interferon-antagonizing protein and inhibits signaling at or before Jak-1 activation. *Virology.* 2010; 396(1): 21-9.
107. Marques, C.P.; Cheeran, M.C.; Palmquist, J.M.; Hu, S.; Lokensgard, J.R. Microglia are the major cellular source of inducible nitric oxide synthase during experimental herpes encephalitis. *J Neurovirol.* 2008; 14(3): 229-38.
108. Harrison, C.J.; Miller, R.L.; Bernstein, D.I. Posttherapy suppression of genital herpes simplex virus (HSV) recurrences and enhancement of HSV-specific T-cell memory by imiquimod in guinea pigs. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994; 38: 2059-64.
109. Boivin, N.; Sergerie, Y.; Rivest, S.; Boivin, G. Effect of pretreatment with Toll-like receptor agonists in a mouse model of herpes simplex virus type 1 encephalitis. *JID.* 2008; 198: 664-72.
110. Gebhardt, B.M. & Halford, W.P. Evidence that spontaneous reactivation of herpes virus do not occur in mice. *J Virol,* 2005; 2: 67.
111. Sancho-Shimizu, V.; Shen-Ying, Z.; Laurent, A.; Tardieu, M.; Rozemberg, F.; Jouanguy, E. *et al.* Genetic susceptibility to herpes simplex virus 1 encephalitis in mice and humans. *Curr Opin Allergy Clin Immunol,* 2007; 7: 495-505.
112. Halford, W.P.; Balliet, J.W.; Gebhardt, B.M. Re-evaluating natural resistance to Herpes Simplex Virus 1. *J Virol,* 2004; 78: 10086-95.
113. Lopez, C. Genetics of natural resistance to herpesvirus infections in mice. *Nature,* 1975; 258: 152-3.

114. Jones, C.; Inman, M.; Peng, W.; Derson, G.; Doster, A.; Perng, G. *et al.* The herpes simplex virus type 1 that encodes the latency-associated transcript enhances the frequency of encephalitis in male BALB/c mice. *J Virol*, 2005; 79: 14465 – 9.
115. Lewandowski, G.; Zimmerman, M.N.; Denk, L.L.; Porter, D.D.; Prince, G.A. Herpes simplex type 1 infects and establishes latency in the brain and trigeminal ganglia during primary infection of the lip in cotton rats and mice. *Arch Virol*, 2002; 147: 167-79.
116. Lewandowski, G. Immunohistochemical examinations of intracerebral T-cell recruitment and adhesion molecule induction in herpes simplex virus-infected mice. *Brain Behav Immun*, 1997; 11: 264-72.
117. Nogueira, M.L. Diagnóstico da Infecção Herpética Mucocutânea Através Da Reação Em Cadeia de Polimerase (PCR), Dissertação, Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas, 1998.
118. Nogueira, M.L.; Siqueira, R.C.; Freitas, N.; Amorim, J.B.; Bonjardim, C.A.; Ferreira, P.C. *et al.* Detection of herpesvirus DNA by the polymerase chain reaction (PCR) in vitreous samples from patients with necrotising retinitis. *J Clin Pathol*. 2001; 54: 103-6.
119. Boivin, G.; Coulombe, Z.; Rivest, S. Intranasal herpes simplex virus type 2 inoculation causes a profound thymidine kinase dependent cerebral inflammatory response in the mouse hindbrain. *Eur J Neurosci*. 2002; 16: 29-43.
120. Kuhlicke, J.; Frick, J.S.; Morote-Garcia, J.C.; Rosenberger, P.; Eltzhig, H.K. Hypoxia inducible factor (HIF)-1 coordinates induction of Toll-like receptors TLR2 and TLR6 during hypoxia. *PLoS One*. 2007; 2(12): e1364.
121. Letiembre, M.; Hao, W.; Liu, Y.; Walter, S.; Mihaljevic, I.; Rivest, S. *et al.* Innate immune receptor expression in normal brain aging. *Neuroscience*. 2007; 146(1): 248-54.
122. Giulietti, A.; Overbergh, L.; Valckx, D.; Decallonne, B.; Bouillon, R.; Mathieu, C. An overview of real time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*. 2001; 25(4): 386-401.
123. Yao, J.; Wang, J.Y.; Liu, L.; Li, Y.X.; Xun, A.Y.; Zeng, W.S., *et al.* Anti-oxidant effects of resveratrol on mice with DSS-induced ulcerative colitis. *Arch Med Res*. 2010; 41(4): 288-94.

124. Drapier, J.C.; Wietzerbin, J.; Hibbs, J.B. Jr. Interferon-gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. *Eur J Immunol*, 1988; 18(10): 1587-92.
125. Sarangi, P.P.; Kim, B.; Kurt-Jones, E.; Rouse, B.T. Innate recognition network driving herpes simplex virus-induced corneal immunopathology: role of the toll pathway in early inflammatory events in stromal keratitis. *J Virol*. 2007; 81(20): 11128-38.
126. Pierce, A.T.; DeSalvo, J.; Foster, T.P.; Kosinski, A.; Weller, S.K.; Halford, W.P. Beta interferon and gamma interferon synergize to block viral DNA and virion synthesis in herpes simplex virus-infected cells. *J. Gen. Virol*. 2005; 86 (9): 2421-32.
127. Leonard, E.J. & Yoshimura, T. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Adv Exp Med Biol*. 1991; 305: 47-56.
128. Penido, C.; Vieira-de-Abreu, A.; Bozza, M.T.; Castro-Faria-Neto, H.C.; Bozza, P.T. Role of monocyte chemotactic protein-1/CC chemokine ligand 2 on gamma delta T lymphocyte trafficking during inflammation induced by lipopolysaccharide or *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin. *J Immunol*. 2003; 171(12): 6788-94.
129. Dufour, J.H.; Dziejman, M.; Liu, M.T.; Leung, J.H.; Lane, T.E.; Luster, A.D. IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J. Immunol*. 2002; 168(7): 3195–204.
130. Maghazachi, A.A.; Al-Aoukaty, A.; Schall, T.J. CC chemokines induce the generation of killer cells from CD56+ cells, *Eur J Immunol*. 1996; 26: 315-19.
131. Locksley, R.M.; Killeen, N.; Lenardo, M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001; 104(4): 487–501.
132. Maurer, M. & Von Stebut, E. Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36(10): 1882-86.
133. Fortin, C.F.; McDonald, P.P.; Fülöp, T.; Lesur, O. Sepsis, leukocytes, and nitric oxide (NO): an intricate affair. *Shock*. 2010; 33(4): 344-52.
134. Rajasagi, N.K.; Kassim, S.H.; Kollias, C.M.; Zhao, X.; Chervenak, R.; Jennings, S.R. CD4+ T cells are required for the priming of CD8+ T cells following infection with herpes simplex virus type 1. *J Virol*. 2009; 83(10): 5256-68.

135. Yu, L.; Quinn, M.T.; Cross, A.R.; Dinauer, M.C. Gp91(phox) is the heme binding subunit of the superoxide-generating NADPH oxidase. *Proc Natl Acad Sci.* 1998, 95(14): 7993-98.
136. Karupiah, G.; Xie, Q.; Buller, R. M. L.; Nathan, C.; Duarte, C.; MacMicking, J. D. Inhibition of viral replication by interferon-g-induced nitric oxide synthase. *Science.* 1993; 261: 1445.
137. Karupiah, G.; Harris, N. Inhibition of viral replication by nitric oxide and its reversal by ferrous sulfate and tricarboxylic acid cycle metabolites. *J. Exp. Med.* 1995; 181: 2171.
138. Yu, J. J.; Tripp, C. S.; Russell, J. H.. Regulation and phenotype of an innate Th1 cell: role of cytokines and the p38 kinase pathway. *J. Immunol.* 2003; 171: 6112–18.
139. Silva, M.G.A. Expressão das citocinas IL-12, IFN γ , MCP-1 em camundongos C57BL/6, TLR2^{-/-}, TLR9^{-/-} e TLR 2/9^{-/-} e expressão de IFN α e IFN β em camundongos C57BL/6 infectados com HSV-1 (HHV-1). Monografia de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) -. Belo Horizonte (MG): Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais – PUC MG; 2011.
140. Stock, A.T.; Jones, C.M.; Heath, W.R.; Carbone, F.R. Rapid recruitment and activation of CD8⁺ T cells after herpes simplex virus type 1 skin infection. *Immunol Cell Biol.* 2011; 89(1):143-8.