

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

**CÉLULAS DENDRÍTICAS, MACRÓFAGOS, NATURAL KILLER E LINFÓCITOS T
CD8⁺ DESEMPENHAM PAPEL FUNDAMENTAL NO CONTROLE DO HSV-1 NO
GÂNGLIO TRIGÊMEO PRODUZINDO IL-1 BETA, iNOS E GRANZIMA B**

por

Natália Lucinda

Belo Horizonte

2017

NATÁLIA LUCINDA

**CÉLULAS DENDRÍTICAS, MACRÓFAGOS, NATURAL KILLER E LINFÓCITOS T
CD8⁺ DESEMPENHAM PAPEL FUNDAMENTAL NO CONTROLE DO HSV-1 NO
GÂNGLIO TRIGÊMEO PRODUZINDO IL-1 BETA, iNOS E GRANZIMA B**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências – área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Marco Antônio da Silva Campos

Co-orientação: Alexandre M. Vieira Machado

Belo Horizonte

2017

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

L938c Lucinda, Natália.

2017

Células dendríticas, macrófagos, natural killer e linfócitos t CD8⁺ desempenham papel fundamental no controle do HSV-1 no gânglio trigêmeo produzindo IL-1 beta, iNOS e granzima B / Natália Lucinda. – Belo Horizonte, 2017.

xx, 113 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 99 - 111

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/prevenção & controle 2. Imunidade Inata/imunologia 3. Receptores Toll-Like /uso terapêutico I. Título. Campos, Marco Antônio da Silva (Orientação). III. Machado, Alexandre de Magalhães Vieira (Co-orientação)

CDD – 22. ed. – 616.936 2

NATÁLIA LUCINDA

**CÉLULAS DENDRÍTICAS, MACRÓFAGOS, NATURAL KILLER E LINFÓCITOS T
CD8⁺ DESEMPENHAM UM PAPEL FUNDAMENTAL NO CONTROLE DO HSV-1
NO GÂNGLIO TRIGÊMEO PRODUZINDO IL-1 BETA, iNOS E GRANZIMA B**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências – área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Banca Examinadora:

Dr. Marco Antônio da Silva Campos (CPqRR/FIOCRUZ) - Presidente

Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva (CPqRR/FIOCRUZ) - Titular

Dra. Jaquelline Germano de Oliveira (CPqRR/FIOCRUZ) - Titular

Dra. Giliane de Souza Trindade (UFMG) - Titular

Dra. Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes (UFMG) - Titular

Dr. Pedro Augusto Alves (CPqRR/FIOCRUZ) - Suplente

Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte, 23/02/2017.

*Dedico este trabalho à minha família,
em especial à minha mãe e ao meu
pai, por tudo que são e representam
pra mim.*

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos...

Aos meus pais, Elciane e Luiz, que sempre uniram esforços em prol da minha formação acadêmica e souberam dar força e incentivo nos momentos que mais precisei.

Aos meus irmãos Felipe e Pedro que sempre estiveram do meu lado incentivando-me e apoiando-me.

Ao meu noivo Guilherme, que sempre esteve ao meu lado tranquilizando e incentivando-me em todos os momentos, acreditando sempre no meu potencial.

À família Pacheco Chaves, por me receberem tão bem em Belo Horizonte e por me fazerem sentir em casa quando a saudade apertava.

À minha amiga Karoline dos Anjos, que seguramente tenho como uma irmã, por toda paciência em me ouvir, confortando-me sempre com palavras de incentivo.

À Marta Maria Figueiredo, por todo incentivo, preciosa ajuda e trabalho árduo com o experimento de citometria de fluxo. Você foi uma amiga que o doutorado me presenteou. Serei eternamente grata a você.

À Lis Ribeiro do Valle Antonelli, que deu suporte de suma importância na parte de citometria de fluxo. Sua colaboração foi essencial para a realização deste trabalho.

Ao Danilo Bretas de Oliveira, pelo incentivo, descontração, esclarecimentos sobre qPCR e ajuda com a multiplicação e purificação do vírus.

Ao Bruno Galvão Filho pelo incentivo, presteza e ajuda com os ensaios de CBA.

Ao José Manuel Latorre Estivalis pelo incentivo, presteza, esclarecimentos e ajuda com os ensaios de PCR em tempo Real.

À Beatriz Senra e Natália Lima pela preciosa ajuda na realização dos experimentos. A ajuda de vocês foi essencial para este trabalho, muito obrigada.

A todos os ICs que me ajudaram nas realizações dos experimentos, Bruna Coura, Mariana Cotta, Aline Diniz, Ana Paula Garcia, Talita Machado, Nathália Guimarães e Arthur Molinari, muito obrigada.

À Fernanda Barbosa e à Plataforma de Real Time PCR, pelo suporte técnico.

À Tiza e à Plataforma de Citometria de Fluxo, pelo suporte técnico.

À equipe do biotério, Ana Carolina Peixoto, Fernanda Trindade, Neviton Neves, Ana Paula Araújo, Rosângela Pereira e Samuel Matias, pela ajuda e disponibilidade de sempre.

À Clécia de Oliveira, Raquel Horsth e Lídia Ferreira, por todo suporte nos momentos que precisei.

Ao meu orientador Marco Antônio da Silva Campos por ter me recebido em seu grupo de pesquisa, pelos ensinamentos e orientação.

Ao meu co-orientador Alexandre de Magalhães Vieira Machado, pelo apoio, disponibilidade e ajuda sempre que precisei.

À professora Erna Geessien Kroon por me permitir realizar a multiplicação e purificação do vírus no LabVírus, pelo apoio e contribuição na elaboração do artigo.

À todos do grupo de pesquisa Imunologia de Doenças Virais, Pedro Alves, Fernanda Trindade, Ana Paula Gonçalves, Arthur Molinari, Lídia Faustino e Nathália Guimarães pela amizade, ajuda e gratificante convivência. Em especial, à Natália Lima, Thaís Souza, Beatriz Senra, Gustavo Pereira, Paula Laice e Ketyllen Reis,

pelos conselhos, alegrias, companheirismo, e incentivo nos momentos de dificuldade.

À CAPES, pela concessão da minha bolsa, e à FAPEMIG, CNPq, INCTV, Fiocruz pelo suporte financeiro concedido para a realização deste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para o êxito deste trabalho, minha sincera gratidão.

E acima de tudo, agradeço a Deus por me conceder esta oportunidade de estudo e realização profissional.

O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano.

(Isaac Newton)

RESUMO

O Herpes simples tipo 1 (HSV-1) é um vírus neurotrópico que causa sintomas brandos mas também, em alguns casos, cegueira e encefalite. Estudos anteriores demonstraram que a resposta imune contra o HSV-1 ocorre principalmente no gânglio trigêmeo (GT) e que os receptores do tipo Toll 2 e 9 (TLR2/9) são importantes na mediação desta resposta. Adicionalmente, foi evidenciado que a enzima iNOS (óxido nítrico sintase) e a interleucina 1 beta (IL-1 β) têm papel essencial na defesa contra a infecção por HSV-1. Assim, o presente trabalho teve como objetivo identificar as principais células responsáveis pela produção de iNOS e IL-1 β , bem como, avaliar outras importantes células e moléculas que podem ou não dependerem dos receptores TLR2/9 para mediar a resposta imune contra o HSV-1. Para tanto, camundongos C57BL/6 (selvagens, WT) e TLR2/9^{-/-} foram infectados por via intranasal com 1 x 10⁶ p.f.u. de HSV-1. Para análise das populações de células, suspensões celulares do GT e baço de animais WT e TLR2/9^{-/-}, infectados e não infectados, foram obtidas e analisadas por citometria de fluxo. A porcentagem de células produtoras de iNOS, IL-1 β , granzima B e perforina também foi determinada por citometria de fluxo. Os mRNAs das quimiocinas MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos 1) e IP-10 (proteína 10 induzida por interferon gama (IFN- γ)) foram quantificados no pulmão e na traqueia por PCR em tempo real. A quimiocina MCP-1 também foi quantificada em nível de proteína, contudo, por Cytometric Bead Array (CBA) no GT, baço, linfonodo e pulmão. As expressões dos transcritos de IL-1 β , dos IFNs do tipo I, das interleucinas 5 e 10 (IL-5 e IL-10) e da granzima B foram quantificados por real time PCR. Os resultados indicam que as células dendríticas (DCs) e os monócitos/macrófagos (Mo/M ϕ) são as principais células produtoras de IL- β e iNOS, respectivamente, e que, junto com os IFNs do tipo I, são essenciais para a resposta imune contra o HSV-1. Além disso, demonstramos que a granzima B produzida por linfócitos T CD8⁺ e células NK e, as quimiocinas MCP-1 e IP-10 são também importantes para esta resposta imune. Do mesmo modo, nossos dados indicam que os níveis substanciais de MCP-1, IP-10 e granzima B ou são TLR-independentes ou regulados por estes receptores no GT de camundongos TLR2/9^{-/-} infectados. Assim, nossos dados fornecem forte evidência de que as respostas mediadas por DCs, Mo/M ϕ , NK e linfócitos T CD8⁺ através da produção de IL-1 β , iNOS e granzima B, respectivamente, em conjunto com a precoce produção dos IFNs do tipo I no início da infecção, são cruciais para a defesa do hospedeiro contra o HSV-1.

Palavras-chave: herpes simples tipo 1; imunidade inata; células dendríticas; macrófagos; linfócitos T CD8⁺; receptores do tipo Toll; modelo murino; neuropatogênese; encefalite.

ABSTRACT

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is a neurotropic virus, causing mild symptoms, but also blindness and encephalitis. It was previously shown that the immune response against HSV-1 occurs mainly in the trigeminal ganglia (TG) and that Toll-like receptors 2 and 9 (TLR2/9) are important in mediating this response. Additionally, it was also demonstrated that iNOS (nitric oxide synthase) and interleukin 1 beta (IL-1 β) play an essential role in the defense against HSV-1 infection. Importantly, the present work aimed to identify the primary cells responsible for iNOS and IL-1 β production and search for other important molecules and cells that might or might not depend on TLR2/9 receptors to mediate the immune response against HSV-1. So, C57BL/6 (wild type, WT) and TLR2/9^{-/-} mice were infected by the intranasal route with HSV-1 (1 x 10⁶ p.f.u.). Cells were obtained from the TG and spleen tissues and the profile of immune cells was determined by flow cytometry in infected and mock infected WT and knockout mice. The percentage of cells producing iNOS, IL-1 β , granzyme B and perforin was also determined by flow cytometry. The chemokines MCP1 (monocyte chemoattractant protein-1) and IP-10 (interferon gamma-induced protein 10) transcripts were measured by real time PCR in the trachea and lung. MCP-1 chemokine was also measured at protein level, however, by Cytometric Bead Array (CBA) in the TG, spleen, lymph node and lung. Expression of type I interferons (IFNs), interleukins (IL) 5 and 10, IL-1 β and granzyme B were quantified by real time PCR. The results indicate that dendritic cells (DCs) and monocytes/macrophages (Mo/M ϕ) were the main sources of IL-1 β and iNOS, respectively, which, together with type I IFNs, were essential for the immune response against HSV-1. Additionally, we showed that granzyme B produced by CD8⁺ T lymphocytes and NK cells and, the chemokines MCP-1 and IP-10 were also important for this immune response. Moreover, our data indicate that the substantial level of MCP-1, IP-10 and granzyme B is either TLR-independent or regulated by these TLRs, in the TG of TLR2/9^{-/-} infected mice. Taken together, our data provide strong evidence that the responses mediated by DCs, Mo/M ϕ , NK and CD8⁺ T lymphocytes through IL-1 β , iNOS and granzyme B production, respectively, together with the production of type I IFN early in the infection, are crucial to host defense against HSV-1.

Keywords: herpes simplex virus 1; innate immunity; dendritic cells; macrophages; CD8⁺ T lymphocytes; Toll-like receptors; murine model; neuropathogenesis; encephalitis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Arquitetura da partícula do HSV-1	23
Figura 2 – Organização genômica do HSV-1	24
Figura 3 – Ciclo de vida e replicação do HSV-1	26
Figura 4 – Patogênese da infecção por HSV-1	29
Figura 5 – Manifestações clínicas do HSV-1	31
Figura 6 – Localização dos receptores do tipo Toll (TLRs)	35
Figura 7 – Vias de sinalização dos receptores do tipo Toll (TLRs)	37
Figura 8 – Modelo proposto	45
Figura 9 – Perfil da população de leucócitos e células mielóides presentes no gânglio trigêmeo de camundongos C57BL/6 e TLR2/9 ^{-/-} infectados com HSV-1	66
Figura 10 – Perfil da população de leucócitos e células mielóides presentes no baço de camundongos C57BL/6 e TLR2/9 ^{-/-} infectados com HSV-1	66
Figura 11 – Perfil da população de células do sistema imune presentes no gânglio trigêmeo de camundongos C57BL/6 e TLR2/9 ^{-/-} infectados com HSV-1	67
Figura 12 – Perfil da população de células do sistema imune presentes no baço de camundongos C57BL/6 e TLR2/9 ^{-/-} infectados com HSV-1	68
Figura 13 – Cinética de expressão de IL-1 β em macrófagos peritoneais derivados de camundongos C57BL/6 e TLR2/9 ^{-/-} infectados com HSV-1	70
Figura 14 – Produção de IL-1 β por células mielóides no gânglio trigêmeo e no baço de camundongos C57BL/6 e TLR2/9 ^{-/-} infectados com HSV-1	71
Figura 15 – Produção de IL-1 β por células dendríticas no gânglio trigêmeo e no baço de camundongos C57BL/6 e TLR2/9 ^{-/-} infectados com HSV-1	72

Figura 16 – Produção de iNOS por células mielóides no gânglio trigêmeo e no baço de camundongos C57BL/6 e TLR2/9 ^{-/-} infectados com HSV-1	73
Figura 17 – Produção de iNOS por monócitos/macrófagos no gânglio trigêmeo e no baço de camundongos C57BL/6 e TLR2/9 ^{-/-} infectados com HSV-1	74
Figura 18 – Produção de iNOS por monócitos/macrófagos no gânglio trigêmeo e no baço de camundongos C57BL/6 e TLR2/9 ^{-/-} infectados com HSV-1	75
Figura 19 – Expressão de IFNs do tipo I no pulmão de camundongos C57BL/6 e TLR2/9 ^{-/-} infectados com HSV-1	76
Figura 20 – Expressão de IP-10 na traqueia e no pulmão de camundongos C57BL/6 e TLR2/9 ^{-/-} infectados com HSV-1	77
Figura 21 – Níveis de produção de MCP-1 em diferentes tecidos de camundongos C57BL/6 e TLR2/9 ^{-/-} infectados com HSV-1	78
Figura 22. Níveis de expressão de MCP-1 na traqueia de camundongos C57BL/6 e TLR2/9 ^{-/-} infectados com HSV-1	79
Figura 23 – Expressão de granzima no gânglio trigêmeo e no baço de camundongos C57BL/6 e TLR2/9 ^{-/-} infectados com HSV-1	80
Figura 24 – Análise da população de leucócitos produtores de granzima presentes no gânglio trigêmeo e baço de camundongos C57BL/6 e TLR2/9 ^{-/-} infectados com HSV-1	81
Figura 25 – Produção de granzima por diferentes populações de células do gânglio trigêmeo e baço de camundongos C57BL/6 e TLR2/9 ^{-/-} infectados com HSV-1	83
Figura 26 – Produção de perforina por diferentes populações de células do gânglio trigêmeo e baço de camundongos C57BL/6 e TLR2/9 ^{-/-} infectados com HSV-1	85
Figura 27 – Expressão de IL-5 e IL-10 no gânglio trigêmeo de camundongos C57BL/6 e TLR2/9 ^{-/-} infectados com HSV-1	87
Figura 28. Modelo de resposta imunológica à infecções por HSV-1 que ocorre no gânglio trigêmeo de camundongos C57BL/6 e TLR2/9 ^{-/-}	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Iniciadores utilizados na PCR em Tempo Real	60
Tabela 2 – Anticorpos monoclonais e fluoróforos utilizados para as análises das subpopulações de células presentes no gânglio trigêmeo e baço de animais C57BL/6 e TLR2/9 ^{-/-} , infectados e não infectados	64

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACK – *Ammonium-Chloride-Potassium Lise Buffer* (Tampão de Lise)

APC – *Antigen-presenting cell* (Célula apresentadora de antígeno)

APS – *Ammonium Persulfate* (Persulfato de amônio)

ATCC – *American Type Culture Collection*

CBA – *Cytometric Beads Array*

CD4 – *Cluster of differentiation 4* (correceptor de células de defesa)

CD8 – *Cluster of differentiation 8* (correceptor de células de defesa)

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais (FIOCRUZ)

CLR – *C-type lectin receptor* (Receptor de lecitina do tipo C)

CMC – Carboxi-metil-celulose

DAI – *DNA-dependent activator of interferon-regulatory factor* (Ativador de fator regulador de interferon dependente de DNA)

DAMP – *Danger-associated molecular patterns* (Padrões moleculares associados a perigo)

DC – Dendritic cell (Célula dendrítica)

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Meio Mínimo de Eagle Modificado por Dulbecco)

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)

cDNA – DNA complementar

dsDNA – *double-strand DNA* (DNA de fita dupla)

dNTP – *Desoxirribonucleotídeos trifosfato*

d.p.i. – Dias após infecção

EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid (Ácido etilenodiaminotetracético)

FACS – PBS 1x suplementado com 2% de SFB

FasL – Ligante de Fas

g – Força gravitacional

GT – Gânglio trigêmeo

HHV – Human herpesvirus

HSV – Herpes simples vírus

HPRT – Hipoxantil ribosil transferase

ICTV – Comitê internacional de Taxonomia de Vírus

IFI16 – *Interferon γ -inducible protein 16* (Proteína 16 induzida por interferon gama)

IFN – Interferon

IL – Interleucina

IP-10 – *Interferon gamma-induced protein 10* (Proteína 10 induzida por IFN gama)

IRF – *Interferon regulatory fator* (Fator regulador de interferon)

iNOS – *Inducible nitric oxide synthase* (Óxido nítrico sintase induzível)

KO – Animais knockouts

LAT – *Latency-associated transcript* (Transcrito associado à latência)

LPS – Lipopolissacarídeos

LRR – *Leucine-rich repeats* (Repetições ricas em leucina)

ml – Mililitros

mg – Miligramas

μ l – Microlitros

mM – Milimolar

M – Molar (mol/L)

MCP-1 – *Monocyte chemoattractant protein-1* (Proteína 1 quimiotática de macrófago)

MHC – *Major histocompatibility complex* (Complexo principal de histocompatibilidade)

M-MLV RT – *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (Transcriptase reversa do *Moloney murine leukemia virus*)

m.o.i – *Multiplicity of infection* (Multiplicidade de infecção)

M ϕ – Macrófago

Mo/M ϕ – Monócito/macrófago

MyD88 – *Myeloid differentiation factor 88* (Fator de diferenciação mielóide 88)

NF- κ B – *Nuclear factor kappa B* (Fator nuclear kappa B)

ng – Nanogramas

NK – *Natural killer cell* (Célula natural killer)

NK T – *Natural killer T cell* (Célula T natural killer)

NLR – *Nod-like receptor* (Receptor tipo NOD)

NO – *Nitric oxide* (Óxido Nítrico)

PAGE – *Polyacrylamide gel electrophoresis* (Eletroforese em gel de poliacrilamida)

PAMP – *Pathogen-associated molecular patterns* (Padrões moleculares associados a patógenos)

pb – Pares de bases

PBS – *Phosphate-buffered saline* (Tampão fosfato salino)

PCR – Reação em cadeia da polimerase

qPCR – PCR quantitativa ou Real Time PCR

PRR – *Pattern recognition receptor* (Receptor de reconhecimento de padrões)

RIG – *Retinoic acid-inducible gene* (Gene induzido por ácido retinóico)
RLR – *RIG-I-like receptor* (Receptores tipo RIG-1)
RNA – *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico)
dsRNA – *double-strand RNA* (RNA de fita dupla)
mRNA – RNA mensageiro
rpm – Rotações por minuto
RPMI – *Roswell Park Memorial Institute Medium* (Meio Roswell Park Memorial Institute)
RT – *Reverse transcription* (Transcrição reversa)

SFB – Soro fetal bovino

TBE – Tris borato EDTA
TEMED – *Tetramethylethylenediamine* (Tetrametiletilenediamina)
TGF – *Transforming growth factor* (Fator de transformação do crescimento)
Th – Célula T helper
TIR – *Toll/IL-1R receptor* (Receptor de IL-1/Toll)
TIRAP – *TIR domain-containing adaptor protein* (Proteína adaptadora contendo domínio TIR)
TLR – *Toll-like receptor* (Receptor do tipo Toll)
TLR2/9^{-/-} – Animais duplo knockouts para TLR2 e TLR9
Tm – *Melting temperature* (Temperatura de dissociação)
TNF – *Tumor necrosis factor* (Fator de necrose tumoral)
Treg – *Regulatory T cell* (Célula T reguladora)
TRAM – *TRIF-related adaptor molecule* (Molécula adaptadora relacionada a TRIF)
TRIF – *TIR domain-containing adaptor inducing interferon- β* (Adaptador contendo domínio TIR indutor de IFN- β)

U_L – Sequência única longa
U_S – Sequência única curta
u.f.p. – Unidades Formadoras de placa
VZV – Varicela-zóster vírus
V – Volts
WT – Animais wild type (selvagem)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Os herpesvírus e a família <i>Herpesviridae</i>	21
1.2 HSV-1: arquitetura, organização genômica e ciclo de replicação	22
1.3 HSV-1: patogênese	27
1.4 HSV-1: epidemiologia e manifestações da doença	29
1.5 Imunidade nas infecções por HSV-1	32
1.5.1 Aspectos Gerais	32
1.5.2 Imunidade Inata	33
1.5.3 Receptores tipo Toll (TLRs)	34
1.5.4 IFNs do tipo I, citocinas inflamatórias e células do sistema imune	37
1.5.5 Imunidade Adaptativa	39
1.6 O Gânglio Trigêmeo no controle da infecção	42
1.7 Justificativa	46
2 OBJETIVOS	48
2.1 Objetivo Geral	48
2.2 Objetivos Específicos	48
3 METODOLOGIA	49
3.1 Desenho Experimental	49
3.2 Cultivo Celular	53
3.3 Vírus	53
3.3.1 Produção do Pool Trabalho e Purificação Viral	53
3.3.2 Titulação por contagem de placas	54
3.4 Animais	54
3.4.1 Anestesia	55

3.4.2 Infecção Intranasal	55
3.4.3 Eutanásia e coleta dos órgãos	55
3.5 Cultivo primário de macrófagos peritoneais	56
3.6 Extração de RNA de tecidos e macrófagos peritoneais	57
3.7 Eletroforese em Gel de Agarose	58
3.8 Tratamento com DNase	58
3.9 Reação de transcrição reversa (RT)	58
3.10 PCR em tempo real (qPCR)	59
3.11 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)	61
3.12 <i>Cytometric Beads Array</i> (CBA)	62
3.13 Isolamento de células	62
3.14 Citometria de Fluxo	63
3.15 Análises Estatísticas	64
4 RESULTADOS	65
4.1 Análise da população de células presentes no gânglio trigêmeo e baço de animais C57BL/6 e TLR2/9 ^{-/-} infectados por HSV-1	65
4.2 Análise da expressão e produção de IL-1 β em animais C57BL/6 e TLR2/9 ^{-/-} infectados por HSV-1	69
4.3 Análise da produção de iNOS no gânglio trigêmeo e baço de animais C57BL/6 e TLR2/9 ^{-/-} infectados por HSV-1	73
4.4 Cinética da expressão de IFNs do tipo I no pulmão de animais C57BL/6 e TLR2/9 ^{-/-} infectados por HSV-1	75
4.5 Análise da expressão e produção de citocinas em animais C57BL/6 e TLR2/9 ^{-/-} infectados por HSV-1	77
4.6 Análise da expressão e produção de granzima em animais C57BL/6 e TLR2/9 ^{-/-} infectados por HSV-1	79
4.7 Análise da produção de perforina em animais C57BL/6 e TLR2/9 ^{-/-} infectados por HSV-1	84

4.8 Análise da expressão de IL-10 e IL-5 no gânglio trigêmeo de animais C57BL/6 e TLR2/9 ^{-/-} infectados por HSV-1	86
5 DISCUSSÃO	88
6 CONCLUSÃO	96
REFERÊNCIAS	99
APÊNDICES	112
APÊNDICE I – Artigos publicados	112
APÊNDICE II – Participação em Eventos	130
APÊNDICE III – Co-orientações	130
ANEXOS	132
ANEXO I – Comissão de Ética no Uso de Animais: Licença LW-6/11	132
ANEXO II – Comissão de Ética no Uso de Animais: Licença LW-20/15	133

1 INTRODUÇÃO

1.1 Os herpesvírus e a família *Herpesviridae*

Nos primórdios da taxonomia de vírus, os herpesvírus eram classificados dentro da família *Herpesviridae*, baseados apenas em suas características morfológicas. Desta forma, um grande número de vírus distintos, com hospedeiros variando desde bivalves até humanos eram classificados dentro do mesmo grupo taxonômico (PELLETT; ROIZMAN, 2013).

Com os avanços nas técnicas de biologia molecular se tornou possível o acesso às sequências dos genomas virais levando, desta forma, ao estabelecimento de novos critérios de classificação taxonômica e, conseqüentemente, à proposição de novos grupos taxonômicos (PELLETT; ROIZMAN, 2013). Assim, em 2005 o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) propôs uma atualização na classificação do grupo, dividindo a família *Herpesviridae* em três novas famílias e, assim, estabelecendo uma nova ordem taxonômica, a *Herpesvirales* (DAVISON et al., 2009; PELLETT et al., 2011).

Na antiga família *Herpesviridae* manteve-se os vírus de mamíferos, pássaros e répteis. Já os vírus de peixes e anfíbios foram incorporados à família *Alloherpesviridae* e os vírus de moluscos à família *Malacoherpesviridae* (PELLETT et al., 2011; PELLETT; ROIZMAN, 2013).

Amplamente distribuídos na natureza, os herpesvírus (família *Herpesviridae*) compreendem um grupo abundante de vírus de DNA com distinta arquitetura do vírion. Além disso, apresentam uma vasta variedade de espécies hospedeiras e propriedades biológicas variadas, a partir das quais estes vírus são classificados nas subfamílias *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae* (PELLETT et al., 2011; PELLETT; ROIZMAN, 2013).

A subfamília *Alphaherpesvirinae* caracteriza-se por apresentar vírus com ampla gama de hospedeiros, curto ciclo de multiplicação, rápida capacidade de disseminação em cultura celular, eficiente destruição de células infectadas e capacidade de estabelecer infecções latentes principalmente nos gânglios sensoriais. Fazem parte deste grupo o herpes simples vírus do tipo 1 (HSV-1), o herpes simples vírus do tipo 2 (HSV-2) e o varicella-zoster vírus (VZV), todos eles alphaherpesvírus humanos (PELLETT et al., 2011; PELLETT; ROIZMAN, 2013).

Membros da subfamília *Betaherpesvirinae*, por sua vez, têm longo ciclo de replicação, crescem lentamente em cultura celular, tendem a ser tipo celular-específico em cultura e são linfotrópicos. Os betaherpesvírus humanos deste grupo taxonômico são o citomegalovírus, os vírus do exantema súbito infantil e o *Human herpesvirus 7* (HHV-7) (PELLETT et al., 2011; PELLETT; ROIZMAN, 2013).

Já os membros da subfamília *Gammapherpesvirinae* caracterizam-se por infectarem predominantemente linfócitos T e B e são conhecidos por seu potencial oncogênico. Os gammaherpesvírus humanos são o vírus Epstein-Barr e o vírus do sarcoma de Kaposi (PELLETT et al., 2011; PELLETT; ROIZMAN, 2013).

Estes herpesvírus são conhecidos por causarem uma ampla variedade de doenças em humanos e, assim como todos os membros do grupo, compartilham uma característica fundamental da família *Herpesviridae*, a habilidade de estabelecer latência (PELLETT; ROIZMAN, 2013).

1.2 HSV-1: arquitetura, organização genômica e ciclo de replicação

Designada formalmente pelo ICTV como *Human herpesvirus 1* (HHV-1), a espécie tipo do grupo dos alphaherpesvírus é, contudo, comumente designada como Herpes simplex virus type 1 ou Herpes simplex tipo 1 (HSV-1), nomenclatura empregada ao longo do trabalho (PELLETT et al., 2011; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013).

Um dos primeiros herpesvírus humanos a ser descoberto e intensivamente investigado, o HSV-1 foi, por muitos anos, pouco estudado devido ao seu tamanho e complexidade (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013).

O vírion deste herpesvírus caracteriza-se por ser uma partícula esférica de até 225 nm de diâmetro e apresentar estruturalmente quatro elementos principais: envelope, tegumento, capsídeo e cerne (Figura 1) (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013).

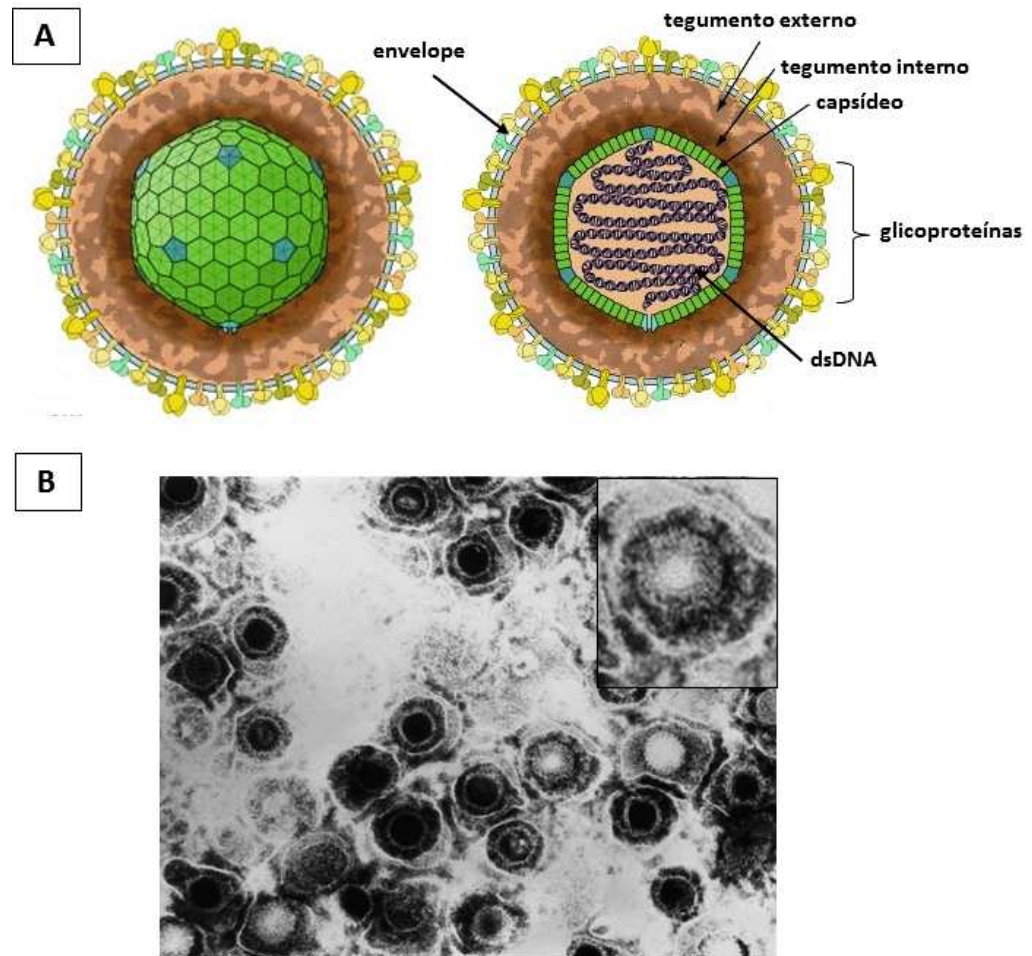


Figura 1. Arquitetura da partícula do HSV-1. (A) Desenho esquemático do vírion de HSV-1. As setas indicam o envelope, o tegumento, o capsídeo e o material genético (dsDNA) do vírus. As glicoproteínas virais estão indicadas entre a chave. (B) Micrografia eletrônica de transmissão mostrando partículas virais de HSV-1. É possível ver nucleocapsídeos vazios evidenciados pela marcação eletro-densa. No detalhe, uma partícula de HSV-1 completa. Fonte: (A) ViralZone: <http://viralzone.expasy.org> (modificado); (B) Erskine Palmer - Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (modificado).

O envelope, estrutura que envolve a partícula viral mais externamente, constitui-se de uma bicamada lipídica com glicoproteínas virais em sua superfície. Esta camada lipídica é adquirida durante o processo de brotamento e deriva de membranas celulares do hospedeiro (METTENLEITER; KLUPP; GRANZOW, 2006; VAN GENDEREN et al., 1994).

O espaço entre o envelope e o nucleocapsídeo é chamado de tegumento. O tegumento é uma camada proteinácea amorfa que serve como compartimento de proteínas virais requeridas no curso da infecção (GRÜNEWALD et al., 2003).

Mais internamente localiza-se o nucleocapsídeo icosaédrico, o qual abriga o material genético da partícula viral, que se encontra densamente empacotado no centro da partícula, o cerne do vírus (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013).

O cerne da partícula contém o genoma do vírus, uma molécula de DNA linear de fita dupla (dsDNA) de 152 kpb, com conteúdo de G+C de cerca de 68%. Este dsDNA consiste de componentes covalentemente ligados, designados como sequência única curta (U_S) e sequência única longa (U_L), as quais encontram-se flanqueadas por sequências repetidas invertidas (Figura 2) (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013).

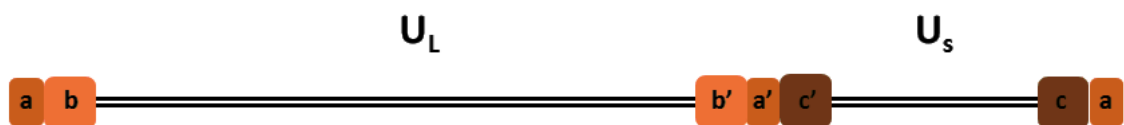


Figura 2. Organização genômica do HSV-1. Cada molécula de DNA é formada por dois segmentos covalentemente ligados. Cada segmento é composto de sequências únicas longas (U_L) e curtas (U_S) flanqueadas por repetições invertidas (caixas). As repetições do segmento longo são designadas com ab e $b'a'$; e as do segmento curto como $a'c'$ e ca . O número de repetições pode ser variado. Fonte: (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013) (modificado).

O genoma do HSV-1 contém mais de 100 genes e codifica ao menos 84 proteínas. Estes genes são divididos em três classes cinéticas principais: os genes α ou imediatamente precoces, os quais regulam a replicação viral; os genes β ou precoces, que são importantes para a replicação do DNA viral; e os genes γ ou tardios, que codificam as proteínas estruturais do vírion (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013).

A expressão dos genes virais é de grande importância para o estabelecimento e sucesso da infecção, uma vez que eles irão atuar não só nas etapas de entrada, montagem e evasão da partícula, mas também, sobre os mecanismos de defesa do hospedeiro (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013).

O processo de infecção como um todo envolve algumas etapas até que a progênie viral seja produzida e esteja apta a infectar células hospedeiras adjacentes (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013).

Neste sentido, a infecção por este herpesvírus inicia-se com a ligação de suas glicoproteínas aos receptores de superfície da célula hospedeira (Figura 3a). Várias

glicoproteínas (gB, gD, gH e gL) estão envolvidas na entrada do HSV-1, já tendo sido evidenciado que a ausência destas glicoproteínas impede que o vírus infecte as células (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013; SPEAR, 2004; SPEAR; LONGNECKER, 2003). O mecanismo de entrada adotado pela partícula viral pode se dar de duas formas, ou através da fusão do envelope do vírus com a membrana plasmática da célula (Figura 3b) ou por endocitose (CAMPADELLI-FIUME et al., 2012; CLEMENT et al., 2006; NICOLA et al., 2005).

Após a entrada na célula, o tegumento e o nucleocapsídeo são então liberados no citoplasma celular sendo transportados através de microtúbulos para o núcleo da célula (Figura 3c) (RADTKE et al., 2010; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013). Quando a partícula viral atinge o núcleo, o capsídeo se liga ao poro nuclear e o DNA é então liberado no interior do núcleo (Figura 3d e 3e) (OJALA et al., 2000; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013).

Durante a fase lítica da infecção o HSV-1 regula um complexo programa genético. Vários genes celulares são suprimidos e os genes virais são expressos em uma ordem específica e de maneira coordenada (FENG; EVERLY; READ, 2005; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013; TADDEO; ZHANG; ROIZMAN, 2013).

Cerca de 2-4 horas após a infecção, inicia-se no núcleo a transcrição dos genes imediatamente precoces (genes α) pela RNA polimerase II do hospedeiro (Figura 3f). Os mRNAs virais são então exportados para o citoplasma onde as proteínas virais são traduzidas (Figura 3g). Estas proteínas α , na sua maioria fatores de transcrição, retornam para o núcleo para estimular a expressão dos genes precoces (genes β) (Figura 3h) (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013).

A expressão dos genes β pode ser detectada 4 horas após a infecção, atingindo picos entre 6 e 12 horas. Dentre as várias proteínas β expressas (Figura 3i), algumas estão relacionadas à expressão de genes tardios (genes γ) e outras se ligam para formar o complexo de replicação do DNA. A replicação do DNA viral ocorre por meio do mecanismo de círculo rolante (Figura 3j) (MUYLAERT; TANG; ELIAS, 2011; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013; SKALITER; LEHMAN, 1994).

Após a síntese dos genes β inicia-se a transcrição e tradução dos genes tardios (genes γ) (Figura 3k e 3l). Estes genes codificam principalmente proteínas estruturais do vírion as quais estão envolvidas na montagem de novos capsídeos e com a formação de novas partículas (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013).

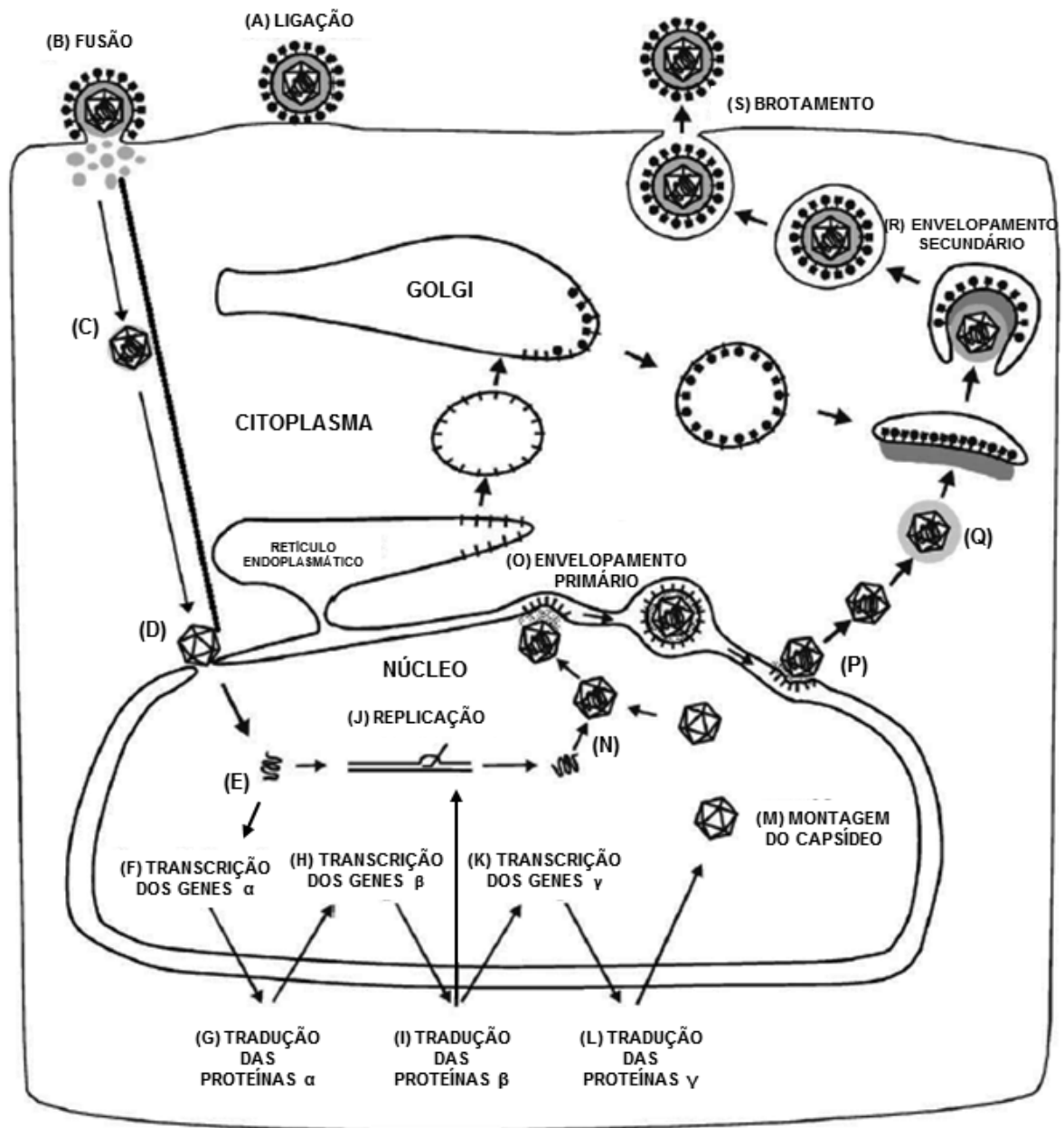


Figura 3. Ciclo de Vida e Replicação do HSV-1: Desenho esquemático do ciclo de vida e replicação do HSV-1. (A) ligação da partícula à superfície celular; (B) fusão da partícula viral com a membrana plasmática; (C) transporte do nucleocapsídeo através de microtúbulos até o poro nuclear; (D) posicionamento do capsídeo junto ao poro nuclear; (E) liberação do DNA viral no interior do núcleo; (F) transcrição dos genes α (genes imediatamente precoces); (G) tradução das proteínas α ; (H) transcrição dos genes β (genes precoces); (I) tradução das proteínas β ; (J) replicação do DNA viral; (K) transcrição dos genes γ (genes tardios); (L) tradução das proteínas γ ; (M) montagem do capsídeo; (N) encapsidação do DNA viral; (O) envelopamento primário na membrana nuclear por brotamento; (P) desenvolvimento e liberação do nucleocapsídeo no citoplasma; (Q) aquisição de proteínas do tegumento; (R) envelopamento secundário por brotamento através de vesículas do Golgi; (S) liberação das novas partículas por brotamento na superfície celular. Fonte: (METTENLEITER, 2004) (modificado).

A montagem do vírion ocorre no núcleo da célula infectada. Inicialmente são formados pro-capsídeos vazios os quais são posteriormente preenchidos com uma cópia do DNA viral, resultando em nucleocapsídeos completos (Figura 3m e 3n) (BAINES, 2011).

O mecanismo de evasão destes nucleocapsídeos do núcleo, como eles recebem seu tegumento e envelope, bem como, a maneira como a partícula viral madura sai da célula hospedeira ainda não são totalmente compreendidos. Há três teorias que explicam o mecanismo de exportação do nucleocapsídeo do núcleo celular, no entanto, o modelo mais aceito atualmente é o do “envelopamento e desenvelopamento” (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013).

Neste modelo, o capsídeo adquire um envelope primário ao brotar através da membrana nuclear interna (figura 3o), perdendo-o em seguida (desenvelopamento) ao se fundir com a membrana nuclear externa e ser liberado no citoplasma (Figura 3p). No citoplasma, estes capsídeos adquirem as proteínas do tegumento (Figura 3q) e são finalmente re-envelopados (envelopamento secundário) através do brotamento em forma de vesículas por meio de membranas citoplasmáticas de organelas como o Complexo de Golgi, onde também são adquiridas as glicoproteínas (Figura 3r). O resultado deste envelopamento secundário é uma partícula viral madura dentro de uma vesícula celular, a qual é posteriormente transportada até a membrana plasmática. Por fim, o vírus é liberado da célula hospedeira por fusão da vesícula com a membrana plasmática (exocitose) (Figura 3s) (METTENLEITER, 2002; METTENLEITER et al., 2013; METTENLEITER; KLUPP; GRANZOW, 2006).

Todo o processo desde a ligação até a liberação dos novos vírions dura entre 18 e 20 horas (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013).

1.3 HSV-1: patogênese

A patogênese de infecções por HSV-1 inicia-se com a transmissão deste herpesvírus através do contato íntimo entre indivíduos susceptíveis e infectados. Contudo, para que a infecção seja iniciada é necessário que haja, sobretudo, o contato do vírus com superfícies mucosas ou peles lesionadas. Apesar de serem capazes de infectar distintos tipos celulares, as infecções primárias por este

herpesvírus ocorrem comumente em células epiteliais da cavidade oral (sítio primário da infecção) (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013). Nestas células, após um período de infecção lítica (produzindo novos vírions), as partículas virais se disseminam para células vizinhas atingindo terminações de nervos sensórios (Figura 4a). Ao se fusionarem à terminação axonal dos neurônios, os nucleocapsídeos são transportados de maneira retrógrada até o corpo celular destas células, onde estabelecem infecção latente por toda a vida do hospedeiro (Figura 4a) (LACHMANN, 2003; NICOLL; PROENÇA; EFSTATHIOU, 2012). O sítio de latência é normalmente determinado pelo sítio de infecção primária. Nos casos de infecção da área orofacial o vírus estabelece latência no gânglio trigêmeo (GT) (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013). Neste local, o genoma viral é mantido no núcleo das células, não havendo a produção de vírions nem de proteínas virais detectáveis. No estado de latência, a expressão dos genes virais é altamente reprimida sendo os LATs (transcritos associados a latência) os únicos produtos gênicos virais expressos (LACHMANN, 2003; NICOLL; PROENÇA; EFSTATHIOU, 2012). Estes transcritos não codificam proteínas, no entanto, estão presentes em abundância em neurônios sensórios infectados. Acredita-se que os LATs sejam importantes para o estabelecimento e controle da latência viral, contudo, os mecanismos por eles adotados não são completamente conhecidos (THOMPSON; SWATELL, 1997). A interrupção da latência ocorre em indivíduos submetidos a situações de estresse, de variação hormonal, de exposição à luz ultravioleta e de imunossupressão, resultando na reativação do vírus do seu estado latente. A ativação da transcrição dos genes virais pode resultar na produção de novos vírions os quais por transporte anterógrado voltam ao sítio primário de infecção e geram infecção recorrente podendo ela ser assintomática ou com o aparecimento de lesões (Figura 4b) (LACHMANN, 2003; NICOLL; PROENÇA; EFSTATHIOU, 2012; WILSON; MOHR, 2012). A gravidade das lesões pode variar consideravelmente desde lesões pontuais a lesões graves e debilitantes, como cegueira e encefalite, em indivíduos imunossuprimidos (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013).

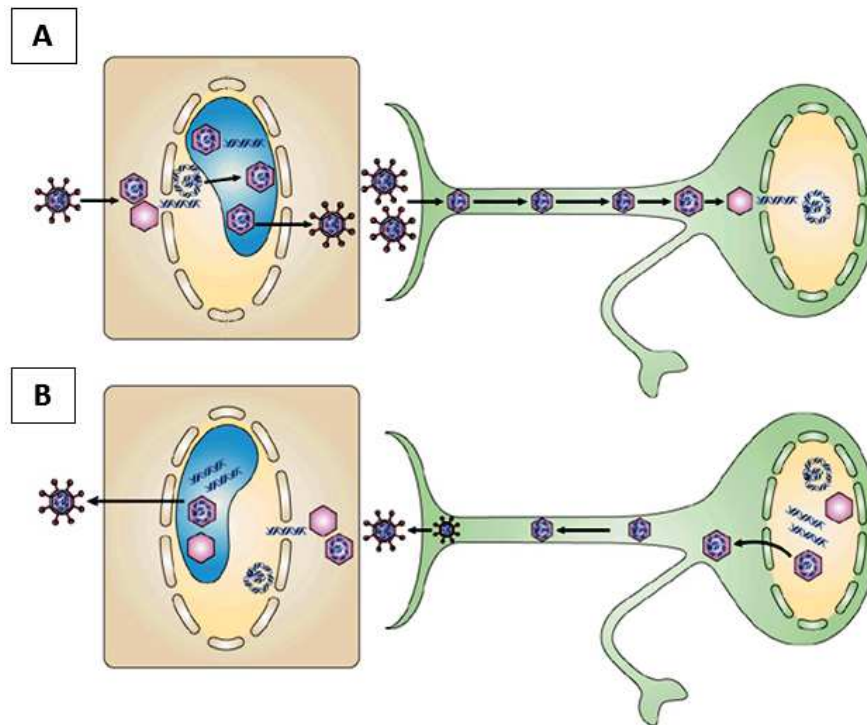


Figura 4. Patogênese da infecção por HSV-1. (A) A infecção de células epiteliais na superfície mucosa, sítio primário de infecção, dá origem a uma infecção produtiva. A progênie viral produzida pode se espalhar para as células epiteliais vizinhas e atingir terminações nervosas. Desta forma, os nucleocapsídeos virais são levados por transporte retrógrado através de axônios até os gânglios sensoriais, sítio secundário da infecção. O DNA viral é liberado no núcleo neuronal, circulariza e transcritos associados a latência são expressos, estabelecendo o estado latente do vírus. (B) Após a reativação, a expressão de genes líticos é iniciada, com a formação de novos nucleocapsídeos que são conduzidos por transporte anterógrado até às células epiteliais, onde novamente há infecção produtiva. Fonte: (KNIPE; CLIFFE, 2008) (modificado).

1.4 HSV-1: epidemiologia e manifestações da doença

Os herpesvírus HSV-1 e HSV-2 estão entre as infecções humanas mais presentes em todo o mundo. Estes vírus encontram-se amplamente distribuídos estando presentes tanto em países desenvolvidos quanto em países subdesenvolvidos. Em razão das infecções por estes herpesvírus serem raramente fatais e devido à capacidade de latência destes vírus, acredita-se que cerca de 90% das pessoas no mundo são soropositivas para um ou ambos herpesvírus e, portanto, são capazes de transmiti-los durante episódios de infecção produtiva (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013; WALD; COREY, 2007).

No que se refere às infecções por HSV-1, especificamente, sua prevalência na população mundial varia conforme a etnia, idade, localização geográfica e status socioeconômico. Apesar disso, análises realizadas com populações de vários países do mundo indicaram de forma geral uma prevalência de anticorpos para HSV-1 superior a 70% na maioria dos países avaliados (LIESEGANG, 2001; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013).

No Brasil, estudos da soroprevalência de HSV-1 na população brasileira indicaram que há também um aumento na prevalência deste herpesvírus conforme a idade dos indivíduos (superior a 65% em adultos), podendo variar de acordo com a região geográfica analisada (de 47% a 73,3%), sendo mais prevalente no norte do país (CLEMENS; FARHAT, 2010; COWAN et al., 2003).

Conforme mencionado anteriormente, as infecções primárias pelo HSV-1 ocorrem, geralmente, durante a infância mediante contato próximo entre os indivíduos. Uma vez infectado, as manifestações clínicas podem variar desde infecções assintomáticas até graves lesões em neonatos e indivíduos imunodeprimidos. A gravidade dos sintomas apresentados dependerá de fatores, como carga viral, taxa de replicação do vírus, bem como, da idade e status imunológico do hospedeiro (FATAHZADEH; SCHWARTZ, 2007; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013).

A maioria das infecções primárias por HSV-1 em crianças é assintomática ou branda e suas manifestações clínicas muitas vezes passam despercebidas. No entanto, após um período de incubação de 2-20 dias, sintomas como mal-estar ou mialgia podem surgir, seguindo, 1 a 3 dias depois, por erupções vesiculares mucocutâneas ou gengivoestomatites. Estas, tipicamente afetam a língua, lábios, gengivas, mucosa oral, palato duro e mole. O início da fase aguda é abrupto, e a sintomatologia clínica da infecção primária por HSV-1 é variável, podendo incluir febre, calafrios, náuseas, irritabilidade, mal-estar e dor de cabeça (FATAHZADEH; SCHWARTZ, 2007; SIMMONS, 2002).

As lesões labiais (ou herpes simples labial), forma predominante de herpes orofaciais recorrentes, são em geral precedidas por um período prodromático de dor local, ardor, prurido ou parestesia, que dura aproximadamente 6 horas (Figura 5C). Em um período de 24 a 48 horas após o pródrômo começam a se formar múltiplas vesículas que 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 (FATAHZADEH; SCHWARTZ, 2007; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013).

Além das clássicas lesões labiais, as infecções recorrentes por HSV-1 podem causar herpes ocular (com infecção das pálpebras, conjuntiva, córnea e retina), herpes genital, herpes do gladiador, panarício e eczema herpético, bem como complicações do sistema nervoso central tais como herpes neonatal e meningoencefalite herpética, comum em indivíduos imunodeprimidos (Figura 5a-f) (FATAHZADEH; SCHWARTZ, 2007; SIMMONS, 2002; WALD; COREY, 2007).

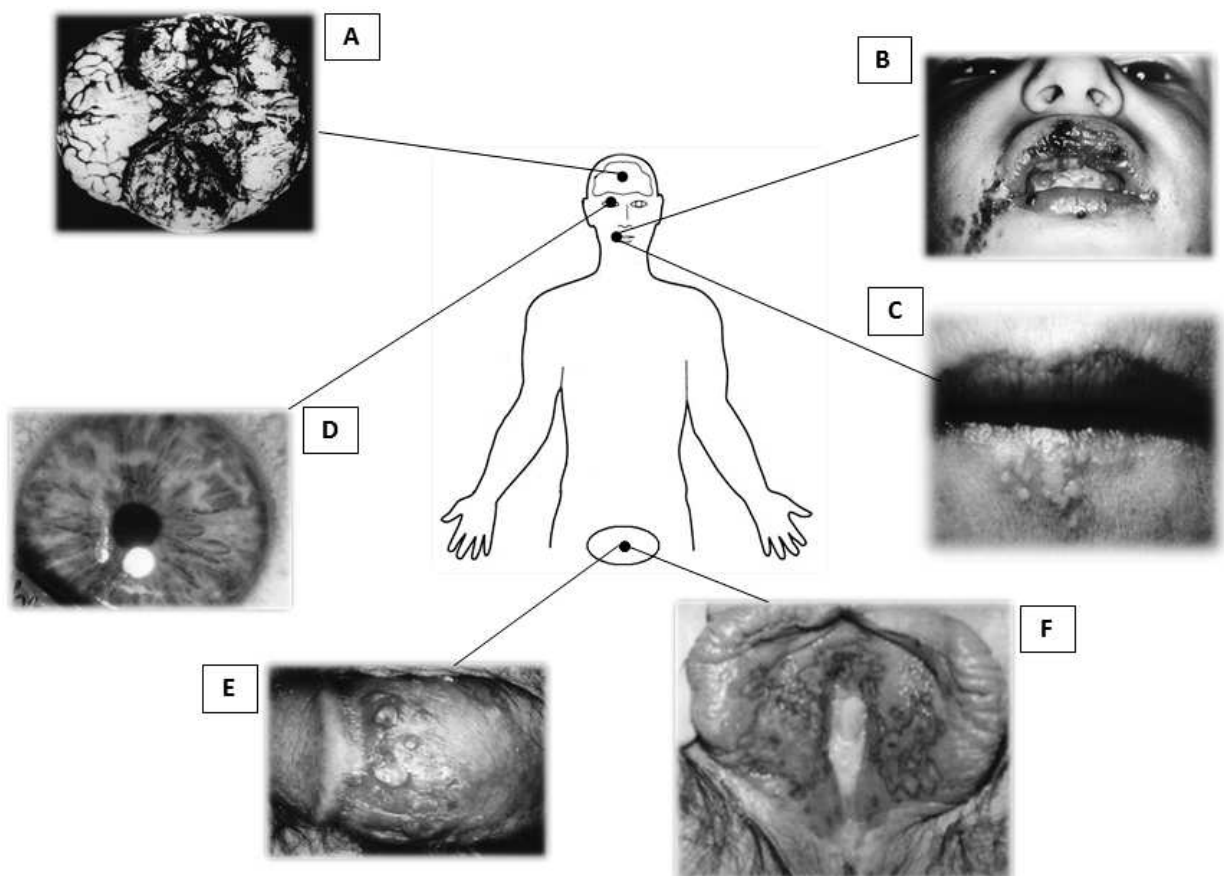


Figura 5. Manifestações Clínicas do HSV-1. As manifestações clínicas da infecção por HSV-1 podem ser bastante diversas. Em A, cérebro acometido por encefalite. Em B, criança com gengivostomatite. Em C, recorrência labial. Em D, olho com ceratite herpética. Em E e F, herpes genital acometendo o pênis e a vulva, respectivamente. Fonte: (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013) (modificado).

Dentre os casos mais graves de infecções causadas por HSV-1 vale destacar o herpes ocular e neonatal, bem como, a meningoencefalite herpética. O herpes ocular é a maior causa de lesões da córnea e perda da visão nos Estados Unidos. O herpes neonatal, por sua vez, é uma manifestação grave e muitas vezes fatal da

transmissão vertical do HSV-1 para recém-nascidos, os quais podem apresentar encefalite ou doenças congênitas. Já a encefalite herpética é uma infecção grave do sistema nervoso central que, quando não tratada, representa uma grande ameaça à vida do indivíduo acometido, principalmente imunodeprimidos (FATAHZADEH; SCHWARTZ, 2007; SIMMONS, 2002; WALD; COREY, 2007).

1.5 Imunidade nas infecções por HSV-1

1.5.1 Aspectos Gerais

A resposta imune do hospedeiro contra infecções por HSV-1 é complexa e multifatorial, envolvendo mecanismos tanto da imunidade inata quanto da imunidade adaptativa. A resposta imune inata caracteriza-se por ser a primeira linha de defesa contra a infecção por HSV-1, por esta razão, desempenha um papel crucial em determinar o curso da infecção, enquanto que a resposta imune adaptativa, mais tardia, tem um papel importante tanto na progressão da doença quanto na propagação e latência do vírus (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013).

De forma geral, a infecção primária por HSV-1 induz uma resposta inflamatória intensa no sítio de infecção. Esta resposta leva à infiltração de células, principalmente linfócitos, macrófagos, células dendríticas (DCs) e natural killer (NK), bem como, à produção de citocinas variadas, por exemplo, os interferons (IFNs) do tipo I e tipo II. Os IFNs do tipo I ativam macrófagos e células NK, os quais atuam matando células infectadas enquanto as DCs fazem a apresentação de antígenos. Mediante a apresentação de antígenos, os linfócitos T têm suas funções efetoras ativadas, sendo a atividade de células T CD8⁺ importante para o combate à infecção. Assim, em cooperação, componentes da imunidade inata e adaptativa agem em conjunto no controle da infecção por HSV-1 (BIRON; BROSSAY, 2001; BROBERG; HUKKANEN, 2005; CHEW; TAYLOR; MOSSMAN, 2009; VOLLSTEDT et al., 2004).

1.5.2 Imunidade Inata

O sistema imune inato trata-se de um importante componente do sistema imunológico que tem como principal característica a sua rápida resposta contra patógenos invasores e sinais de perigo, como os de células/tecidos danificados (CHEN; NUÑEZ, 2010; TURVEY; BROIDE, 2010). Por meio do seu repertório de receptores, citocinas e mediadores da resposta imune, o sistema imune inato age, nos casos de infecções, tanto no reconhecimento do patógeno quanto na limitação da replicação e dispersão no hospedeiro (BRUBAKER et al., 2015; TURVEY; BROIDE, 2010). A ativação desta resposta é crucial para o início e regulação das respostas do hospedeiro, sendo muito importante para o estabelecimento de respostas imunes adaptativas efetivas contra infecções (PALM; MEDZHITOV, 2009; TURVEY; BROIDE, 2010).

A primeira linha de defesa contra infecções por HSV-1 é a barreira físico-química formada pela camada epitelial da pele. A saliva e outros fluidos corporais conferem uma proteção adicional à camada mucosa, pois apresentam substâncias com função antiviral comprovada (ex: lactoferrinas, defensinas e inibidores de protease secretados por leucócitos) (HAZRATI et al., 2006; HUKKANEN; PAAVILAINEN; MATTILA, 2010; VÄLIMAA et al., 2009).

Ao superar a barreira físico-química o patógeno encontra pela frente receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), os quais reconhecem tanto PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) quanto DAMPs (padrões moleculares associados a perigo), sinalizando para o hospedeiro a presença de perigo. Os PRRs formam um grupo de distintas famílias de receptores tais como, receptores do tipo Toll (TLRs), receptores tipo RIG-1 (RLRs), receptores tipo NOD (NLRs), e receptores tipo lectina C (CLRs), os quais desempenham papel central na vigilância imunológica contra os mais variados tipos de patógenos (TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

Tanto os TLRs quanto os RLRs desempenham importantes funções diante de infecções por HSV-1. Os TLRs, ao reconhecerem a partícula viral na superfície celular e em compartimentos intracelulares, como endossomos, e os RLRs ao detectar os ácidos nucleicos virais no citoplasma. Além destes receptores, sensores de DNA citoplasmáticos como DAI (*ativador de DNA-dependente* de fatores regulatórios de *interferon*) e IFI16 também detectam a presença de HSV-1 na célula

hospedeira (PALUDAN et al., 2011; TAKAOKA et al., 2007; UNTERHOLZNER et al., 2010).

Percebe-se, portanto, que até a maturação da resposta imune adaptativa, caracterizada pela produção de anticorpos neutralizantes e ativação da atividade efetora de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, a imunidade inata torna-se a primeira barreira no combate à infecção viral. Este fato é especialmente evidente durante infecções primárias onde não há uma resposta “montada” para combater o vírus. Por esta razão, têm sido crescentes os relatos que destacam o papel da imunidade inata diante de infecções por HSV-1, especialmente através da ativação dos TLRs (KRUG et al., 2004; KURT-JONES et al., 2004; LIMA et al., 2010; SATO; IWASAKI, 2004; ZHANG et al., 2007; ZOLINI et al., 2014).

1.5.3 Receptores do tipo Toll (TLRs)

Dentre todos os PRRs, os TLRs são os receptores da imunidade inata mais extensivamente estudados e caracterizados. Estes receptores são glicoproteínas de membrana altamente conservadas caracterizadas por apresentar um ectodomínio composto por repetições ricas em leucinas (LRRs), responsável pelo reconhecimento dos PAMPs; por um domínio intermediário, que ancora estes receptores junto à membrana; e por um domínio citoplasmático, denominado domínio TIR (receptor Toll/IL-1), o qual é responsável pela sinalização intracelular (TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

Estes receptores são expressos em várias células imunológicas, incluindo macrófagos, células dendríticas (DCs), células B, tipos específicos de células T, e mesmo em células não imunológicas como fibroblastos e células epiteliais. A expressão dos TLRs não é estática sendo modulada rapidamente em resposta à agentes patogênicos, citocinas e estresses ambientais (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006).

A expressão dos TLRs pode ocorrer de duas maneiras, intra ou extracelularmente (Figura 6). Enquanto alguns TLRs (TLRs 1, 2, 4, 5 e 6) são expressos na superfície celular, outros (TLRs 3, 7, 8, e 9) são encontrados em compartimentos intracelulares, como os endossomos. Tais receptores diferenciam-se por reconhecerem distintos PAMPs, como: lipoproteínas (TLR1, TLR2, e TLR6), RNA de fita dupla (dsRNA) (TLR3), lipopolissacarídeos (LPS) (TLR4), flagelina

(TLR5), RNA de fita simples (ssRNA) (TLR7 e TLR8) e DNAs não metilados ricos em CpG (TLR9) (KAWAI; AKIRA, 2009).

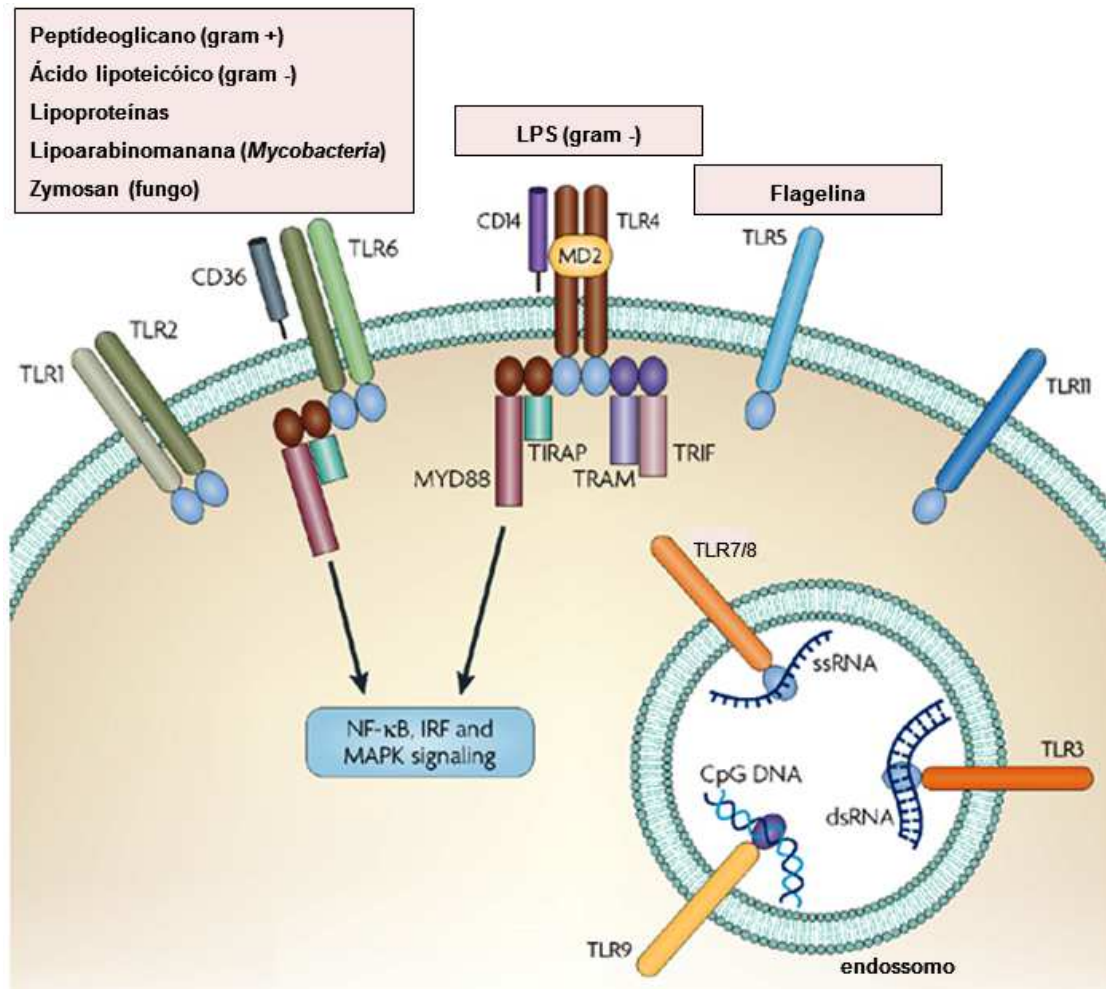


Figura 6. Localização dos receptores do tipo Toll (TLRs). Os TLRs podem ser expressos tanto na superfície da célula quanto em compartimentos intracelulares, como endossomos. Os TLRs 1, 2, 4, 5 e 6, fazem o reconhecimento de patógenos na superfície da célula. Enquanto, os TLRs 3, 7, 8 e 9 reconhecem patógenos no interior de endossomos. O TLR11 está presente na superfície celular, no entanto, sua função ainda não é conhecida. Fonte: (RAKOFF-NAHOUM; MEDZHITOV, 2009) (modificado).

O reconhecimento de PAMPs pelos TLRs pode ocorrer tanto na forma de homodímeros quanto na forma de heterodímeros (TLR2/TLR1 e TLR2/TLR6). Como resultado deste reconhecimento, há a ativação de cascatas de sinalização que se iniciam com o recrutamento de quatro moléculas adaptadoras principais, MyD88 (fator de diferenciação mieloide 88), TIRAP (proteína adaptadora contendo domínio

TIR), TRIF (adaptador contendo domínio TIR indutor de IFN- β) e TRAM (molécula adaptadora relacionada a TRIF) (Figura 7). Todos os TLRs, exceto o TLR3 recrutam MyD88 após a ligação do PAMP e iniciam uma via de sinalização dependente de MyD88. No entanto, os TLR1, TLR2, TLR4 e TLR6, necessitam de uma molécula adaptadora adicional, TIRAP, a qual serve como proteína de ligação entre os TLRs e MyD88. Ao contrário dos demais TLRs, o TLR3 recruta TRIF após a ligação do PAMP, e inicia uma via de sinalização dependente de TRIF. O TLR4, por outro lado, utiliza tanto MyD88 quanto TRIF como moléculas adaptadoras. Ambas vias de sinalização culminam na translocação de fatores de transcrição (NF κ B e IRFs) para o núcleo, levando à expressão e produção de IFNs do tipo I (IFN- α e IFN- β), bem como, de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β (interleucina 1 beta), IL-6 e TNF- α (fator de necrose tumoral alfa), além de quimiocinas. A expressão destas moléculas varia entre os diferentes TLRs e leva à indução e maturação de distintas células do sistema imune (AKIRA; TAKEDA, 2004; AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; NEILL; BOWIE, 2007; WEST; KOBLANSKY; GHOSH, 2006; YAMAMOTO et al., 2003).

Os IFNs do tipo I, especialmente IFN- α e IFN- β , são citocinas com importante atividade antiviral que agem no controle da infecção impedindo a replicação do vírus e, assim, limitando sua dispersão para outros tecidos do hospedeiro (CROUSE; KALINKE; OXENIUS, 2015; LEVY; MARIÉ; DURBIN, 2011; MCNAB et al., 2015). Além disso, estimulam macrófagos, DCs, linfócitos T e células NK, além de induzirem o processo de apoptose (KAWAMURA et al., 2006; VOGEL et al., 2014; VOLLSTEDT et al., 2004; YONEYAMA et al., 2005). Os IFNs do tipo I são produzidos por distintas populações de células, mas principalmente por DCs plasmocitóides (IFN- α) e fibroblastos (IFN- β) (ASSELIN-PATUREL; TRINCHIERI, 2005; DELHAYE et al., 2006; ITO; WANG; LIU, 2005; KRUG et al., 2004; LIU, 2005).

Em um contexto de infecção por HSV-1, as DCs têm grande importância, pois além de ativarem outras células no sítio de infecção, têm papel crucial na apresentação de antígenos a células da imunidade adaptativa (BEDOUI; GREYER, 2014; BOSNJAK et al., 2012; KRUSE et al., 2000; NOVAK; PENG, 2005; POLLARA et al., 2003). Para mediar esta resposta estas células migram até os linfonodos drenantes onde apresentam os peptídeos virais aos linfócitos *naïve*, ativando suas funções efectoras (KAWAMURA et al., 2006; YONEYAMA et al., 2005).

A ativação de células NK e macrófagos por IFNs do tipo I também são importantes para a defesa do hospedeiro contra a infecção por HSV-1 (CHEW; TAYLOR; MOSSMAN, 2009; EGAN et al., 2013). As células NK, por exemplo, são cruciais para o controle dos níveis de HSV-1 no local da infecção, pois, além de produzirem IFN- γ , importante para a modulação da resposta e ativação de linfócitos (IWASAKI; MEDZHITOV, 2015; KIM et al., 2012), agem induzindo a morte celular de células infectadas através de sua atividade citotóxica, secretando perforinas e granzimas (JOST; ALTFELD, 2013; KASSIM et al., 2006; VOGEL et al., 2014).

Já os macrófagos, além de fagocitarem células em apoptose e partículas virais, secretam citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α , induzindo uma resposta inflamatória no sítio de infecção do HSV-1 (LOKENS-GARD et al., 2001; SERGERIE; RIVEST; BOIVIN, 2007), assim como, produzem quimiocinas, principalmente IP-10 e MCP-1, as quais regulam o tráfego de leucócitos para o tecido inflamado, orquestrando a resposta imunológica diante desta infecção (BOIVIN et al., 2012; LOKENS-GARD et al., 2001; WUEST; CARR, 2008a). Além disso, os macrófagos produzem óxido nítrico (NO), um importante mediador da resposta imune, com

atividade antimicrobiana e citotóxica. Este radical livre é produzido pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), cuja produção é ativada pela secreção de IFN- γ por células NK, CD4⁺ e CD8⁺ (ELLERMANN-ERIKSEN, 2005; KODUKULA et al., 1999; MACLEAN et al., 1998; MARQUES et al., 2008; MURRAY; WYNN, 2011; ZOLINI et al., 2014).

Diante disso, é evidente a relevante contribuição que a resposta imune inata tem, não só para o combate e controle da infecção nas primeiras horas e dias de infecção, mas também para a ativação e estabelecimento de respostas adaptativas efetivas contra o HSV-1 (CHEW; TAYLOR; MOSSMAN, 2009; EGAN et al., 2013; LUNDBERG et al., 2008; MORRISON, 2004; MOSSMAN; ASHKAR, 2005; SMITH; KHANNA, 2013).

1.5.5 Imunidade Adaptativa

A resposta imune adaptativa, ao contrário da inata, estabelece memória imunológica e envolve tanto a resposta humoral de células B quanto os mecanismos efetores conduzidos por células T citotóxicas CD8⁺ e células T helper CD4⁺ (CHAPLIN, 2010).

Para que a resposta adaptativa seja ativada, o patógeno deve ser fagocitado por DCs residentes no sítio de infecção. Em seguida, estas células devem migrar até os linfonodos onde elas irão ativar linfócitos T e B, através da apresentação de antígenos por moléculas do MHC (complexo principal de histocompatibilidade) (CHAPLIN, 2010).

Células B, quando ativadas, dão início à produção de anticorpos vírus-específico, chamados também de anticorpos neutralizantes, os quais irão inibir a ligação do vírus a novas células. Esta inibição ocorre uma vez que anticorpos neutralizantes vírus-específicos se ligam às glicoproteínas virais bloqueando a ligação do vírus à superfície celular, impedindo, assim, que o vírus infecte a célula. Em infecções por HSV-1, estudos demonstraram que a produção de anticorpos HSV-específicos ocorre em indivíduos infectados, no entanto, a contribuição específica da imunidade humoral frente a estas infecções ainda não está clara (CHEW; TAYLOR; MOSSMAN, 2009; EGAN et al., 2013).

As células T, por sua vez, são o segundo grupo de células que compõem a resposta imune adaptativa. Estas células subdividem-se, segundo sua atividade efetora, em células T citotóxicas CD8⁺ e células T helper CD4⁺ (CHAPLIN, 2010).

As células T CD8⁺ são células citotóxicas que apresentam vários mecanismos para o controle e/ou eliminação de células infectadas. Elas podem atuar induzindo estas células à lise ou apoptose, tanto através da liberação de grânulos citotóxicos (contendo perforinas e granzimas) no interior da célula, quanto por interações moleculares na superfície celular. A ação através de perforinas e granzimas se dá com a formação de poros (perforinas) na membrana plasmática de células infectadas, seguida pela ativação de vias dependentes ou independentes de caspase (ativadas por granzimas), que culminam na ativação da apoptose. Esta ativação quando ocorre por interações moleculares na superfície celular, é resultado da interação de FasL (ligante de Fas), presente na célula T CD8⁺, com a proteína Fas (na superfície da célula alvo), sinalizando para a célula alvo entrar em apoptose (CHAPLIN, 2010; TRAPANI; SMYTH, 2002; VAN DOMMELEN et al., 2006).

Em infecções por HSV-1, foi demonstrado que células T CD8⁺ agem por ação citotóxica resultando, sobretudo, na inibição da replicação e dispersão viral, impedindo que haja a reativação do estado latente (KNICKELBEIN et al., 2008; MUELLER et al., 2002). Do mesmo modo, células T CD8⁺ agem produzindo citocinas antivirais tais como TNF α e, especialmente, IFN γ . Esta última, apesar de não ser produzida exclusivamente por células T CD8⁺, exerce papel crucial na atividade antiviral destas células e, por esta razão, vem sendo extensivamente investigada. Animais knockout para IFN- γ , por exemplo, apresentam uma mortalidade significativa em resposta ao HSV-1, sendo a ativação desta citocina relacionada à eliminação do vírus, bem como, ao controle do estado latente (CANTIN; TANAMACHI; OPENSHAW, 1999; CHEW; TAYLOR; MOSSMAN, 2009; GEIGER et al., 1997; HE et al., 1999). Além disso, em modelo murino, o IFN- γ protege o animal de uma encefalite herpética fatal (LEKSTROM-HIMES et al., 2000) e evita que o HSV-1 seja reativado (LIU et al., 2000).

As células T helper (Th), por sua vez, são uma população específica de linfócitos da imunidade adaptativa, sendo em grande parte responsáveis pela ativação e direcionamento destas respostas. Quando estimuladas por APCs, células Th *naive* (Th0, nunca expostas a antígenos) podem se diferenciar em vários tipos de

células efectoras: células Th1 (pró-inflamatórias), células Th2 (anti-inflamatórias), células regulatórias (Treg), e células Th17 (CHAPLIN, 2010).

Células Th1 regulam a imunidade celular e as respostas pró-inflamatórias contra parasitas intracelulares através da expressão de IFN- γ , um potente imunoregulador, que estimula a diferenciação celular de células Th1. Estas células secretam também IL-2 e TNF- α , as quais são importantes para mediar respostas de hipersensibilidade tardias e para ativar macrófagos. A diferenciação em células tipo Th1 é induzida, sobretudo, com a expressão de IL-12 por macrófagos, DCs e células NK da imunidade inata (CHAPLIN, 2010; TRINCHIERI, 2003; ZHU; YAMANE; PAUL, 2010). Em indivíduos infectados por HSV-1, a expressão de IL-12 é detectada no início da infecção e deve ter uma função chave no desencadeamento da resposta Th1 e na produção de IFN- γ (HE et al., 1999; KANANGAT et al., 1996).

Por outro lado, células Th2 são importantes para a imunidade humoral, na proliferação de células B, na regulação de respostas alérgicas, e na proteção contra infecções por macroparasitas (ex. helmintos). Células Th2 produzem um conjunto distinto de citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-4, IL-5, IL-10, e IL-13, as quais estimulam a diferenciação do fenótipo Th2, promovem a ativação alternativa de macrófagos e maturação de eosinófilos e, além disso, controlam diminuindo a expressão de citocinas do tipo Th1. A diferenciação de células Th2 é estimulada pela expressão de IL-4 por células NK, basófilos ou mastócitos (CHAPLIN, 2010). O papel de citocinas tipo Th2 em infecções por HSV-1 ainda não está bem estabelecido, uma vez que, a expressão de citocinas como IL-4 e IL-10 ainda é controversa. Isto se deve, provavelmente, ao diferentes modelos animais e estirpes virais utilizados nos estudos (BROBERG; HUKKANEN, 2005; HUKKANEN et al., 2002).

Já células Treg, atuam limitando repostas efectoras de outras populações de células e, assim, minimizando o dano tecidual. Elas são importantes para suprimir a ativação, proliferação, e atividade efetora de várias células imunes dentre elas, células T, células NK, células B e APCs. Elas agem reduzindo tanto respostas Th1 quanto Th2 através da secreção de IL-10 e TGF- β (fator de crescimento transformante β) (BELKAID; TARBELL, 2009; MIYARA; SAKAGUCHI, 2007). Em indivíduos infectados por HSV-1, estudos indicam que elas atuem controlando a imunopatologia da infecção, bem como, a proliferação e função efetora de células T CD8⁺ e CD4⁺ (BELKAID; TARBELL, 2009; SUVAS et al., 2004).

As células Th17, por sua vez, são outra classe de células T CD4+ caracterizadas pela produção de IL-17, IL-21 e IL-22. Elas são ativadas por IL-6, TGF- β e IL-1 β , sendo IL-23 importante para sua manutenção. Estas células são importantes para o recrutamento de neutrófilos e na defesa do hospedeiro contra bactérias extracelulares e fungos, embora, elas possam contribuir na imunopatologia durante a infecção. Além disso, elas têm sido associadas a várias doenças inflamatórias tais como, artrite reumatoide, asma e lúpus (PARK et al., 2005; VAN DE VEERDONK et al., 2009). Em estudos de ceratite estromal herpética, a ativação de células Th17, bem como, a expressão de IL-17 demonstra contribuir com a patogênese da doença, uma vez que há um aumento na inflamação e no influxo de neutrófilos, causando danos na córnea e, eventualmente, cegueira (SURYAWANSHI et al., 2011).

1.6 O Gânglio Trigêmeo no controle da infecção

Estudos prévios do nosso grupo demonstraram através de uma cinética de expressão de genes do vírus (VP16) e de algumas citocinas do hospedeiro (IFN- γ , IP-10, MCP-1 e MIP-1 α), que no GT de animais C57BL/6 infectados com 1×10^6 pfu de vírus ocorrem picos de expressão destes genes, no 5º dia após a infecção. Estes picos, em seguida, são acompanhados de uma redução na expressão destes genes que voltam a ser expressos em níveis basais (LIMA et al., 2010). Adicionalmente, verificamos que a resposta imune ocorre de maneira localizada, no GT, uma vez que as análises realizadas no cérebro demonstraram não haver partículas virais neste tecido (tampouco resposta diferencial dos TLRs), indicando que a resposta no GT controla a infecção e impede a ocorrência de uma encefalite. Além disso, nossos estudos demonstraram que a infecção por HSV-1 ativa a resposta imune do hospedeiro através dos receptores TLR2 e TLR9 e que esta ativação, bem como a de MyD88, são essenciais para o controle da infecção (LIMA et al., 2010; MANSUR et al., 2005). Neste contexto, evidenciou-se que a ativação do TLR2 não é essencial para a sobrevivência dos animais, uma vez que camundongos nocautes para TLR2 apresentaram taxa de mortalidade de apenas 10%, muito similar à observada para os camundongos WT. Por outro lado, demonstrou-se que a ativação do TLR9 é necessária e importante para o controle da infecção já que 60% dos animais nocautes para TLR9 morreram após a infecção. Contudo, revelou-se que a ativação

conjunta de TLR2 e TLR9 demonstrou ser, ainda assim, mais relevante para o controle da infecção e estabelecimento de uma resposta imune adequada, uma vez que na ausência de ambos receptores os animais TLR2/9^{-/-} sucumbiram à infecção, com sinais de encefalite (LIMA et al., 2010). Desta forma, os dados demonstrados por Lima e colaboradores (2010) indicaram que há uma inter-relação entre os TLRs, fato que foi posteriormente evidenciado por análises da expressão destes receptores, por Zolini e colaboradores (2014). Estas análises indicaram que, em um contexto de infecção por HSV-1, a expressão dos TLRs ocorre de maneira interdependente, em que a ausência de um TLR afeta na expressão de um ou mais destes receptores (ZOLINI et al., 2014). Além disso, estes estudos evidenciaram um aumento na população de macrófagos produtores de iNOS e de linfócitos CD8⁺ produtores de IFN- γ , no GT de camundongos WT infectados (LIMA et al., 2010; ZOLINI et al., 2014). Por outro lado, nos animais TLR2/9^{-/-}, houve uma elevada expressão de CXCL10/IP10 e CCL2/MCP-1 e níveis reduzidos de IFN- γ , IL-1 β e iNOS. Níveis reduzidos de IL-12 e TNF- α também foram observados em macrófagos peritoneais de camundongos TLR2/9^{-/-} (LIMA et al., 2010; ZOLINI et al., 2014). Assim, nos animais TLR2/9^{-/-}, o excesso das quimiocinas CXCL10/IP10 e CCL2/MCP-1, bem como, os reduzidos níveis de IFN- γ , IL-1 β e iNOS podem, desta forma, contribuir para uma resposta imune ineficaz contra o patógeno que resulta em uma alta taxa de mortalidade destes camundongos.

Diante do exposto, estes dados nos permitiram levantar a hipótese de que a infecção por HSV-1 é controlada no GT por respostas imunes dependentes de TLR2 e TLR9, que evitam o estabelecimento de uma encefalite herpética. Para tanto, a ação conjunta destes receptores seria, assim, essencial para uma resposta imune eficiente no combate à infecção por HSV-1.

Desta forma, propusemos um modelo que explicaria o que ocorre no GT de animais WT (Figura 8A) e TLR2/9^{-/-} (Figura 8B) diante de infecções por HSV-1, no contexto estudado. Neste sentido, na infecção em animais WT iniciada por via intranasal, o vírus se dirige pelos nervos sensoriais para o GT e, neste tecido, células locais secretam quimiocinas, que recrutam macrófagos e DCs para o local da infecção. Estas células, através do TLR2 e TLR9 reconhecem os agonistas (PAMPs) do vírus, levando a apresentação de antígeno direcionada para Th1, e assim, havendo a produção de IFN- γ que faz com que as células do sistema imune ativem sua atividade efetora (MOs produzindo mais NO, células T produzindo mais IFN- γ e

granzimas) e assim controlando a infecção. Este controle, desta forma, impede que as partículas virais se dirijam para o cérebro e faz com que as quimiocinas parem de ser secretadas.

Já na infecção de animais TLR2/9^{-/-}, o vírus se dirige pelos nervos sensoriais para o GT e lá células locais secretam quimiocinas, que recrutam células do sistema imune (MOs e DCs) para o local da infecção. No entanto, estas células não são eficientes imunologicamente, uma vez que não expressam TLR2 e TLR9. Desta forma, não há apresentação de antígenos eficiente aos linfócitos, não havendo, portanto, produção suficiente de IFN- γ nem ativação da função efetora destas células. Por esta razão, nestes animais não há o controle da infecção. Consequentemente, as quimiocinas continuam a serem secretadas, provavelmente, na tentativa de recrutar mais células para o local da infecção. Isto pode causar mais inflamação que, no entanto, não é imunologicamente eficiente, podendo inclusive ser um fator deletério para o hospedeiro, ajudando o vírus a se dirigir para o cérebro, causando encefalite e morte destes animais.

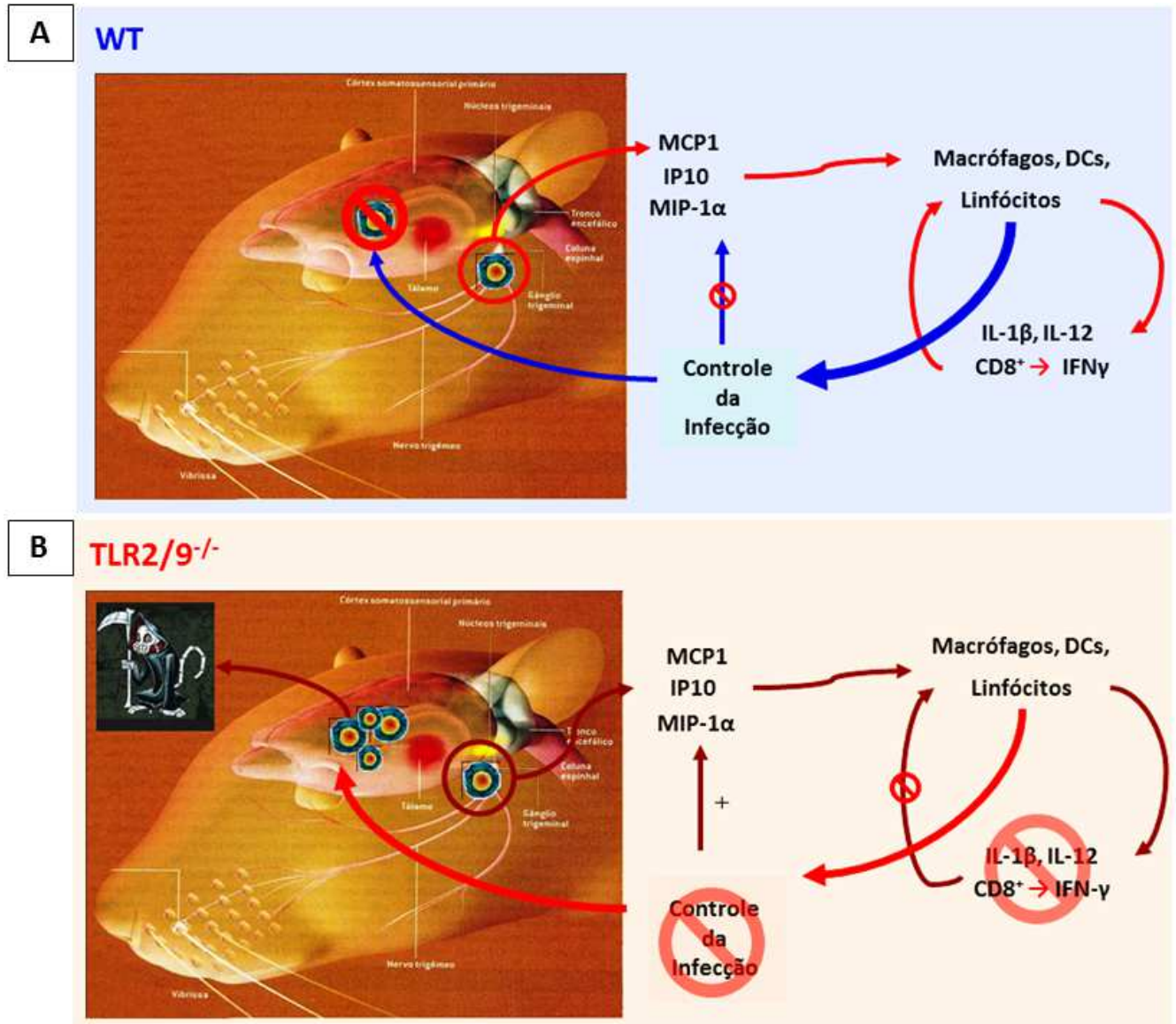


Figura 8 - Modelo Proposto. (A) Após a infecção intranasal de camundongos C57BL/6 (WT) com HSV-1, o vírus alcança os gânglios trigêmeos, onde ocorre o controle da infecção. Inicialmente, células dos gânglios produzem quimiocinas, que atraem células do sistema imune até o tecido. O infiltrado inflamatório e os linfonodos regionais produzem citocinas que ativam as células, aumentando a produção de iNOS, promovendo um controle eficiente da infecção e evitando que o vírus alcance o cérebro. Com o controle da multiplicação viral, a produção das quimiocinas é inibida. (B) Na infecção de animais TLR2/9^{-/-}, o vírus alcança os gânglios trigêmeos e lá as células secretam quimiocinas, que recrutam as células do sistema imune para o local da infecção, no entanto, estas células por não serem imunologicamente eficientes, não conseguem fazer uma apresentação eficiente aos linfócitos, não tendo, portanto uma produção de IFN- γ e não ativando a função efetora das células imunes. Por esta razão, não há o controle da infecção. Adicionalmente, estas quimiocinas continuam a ser secretadas, provavelmente, na tentativa de recrutar mais células para o local. Isto pode levar a uma inflamação que, no entanto, não é imunologicamente eficiente, ajudando o vírus a se dirigir para o cérebro, causando encefalite e morte.

1.7 Justificativa

A elevada prevalência de HSV-1 na população mundial, bem como, sua habilidade em causar, mesmo que esporadicamente, graves danos, como cegueira e encefalite, principalmente, em indivíduos imunossuprimidos e neonatos, tornam necessários estudos que permitam uma melhor compreensão da dinâmica de reconhecimento do HSV-1 pelo hospedeiro, e a consequente resposta por ele desencadeada.

Resultados preliminares do nosso grupo evidenciaram o importante papel da resposta imune no gânglio trigêmeo (GT) para o controle da infecção por HSV-1 em camundongos C57BL/6, principalmente através de MyD88 e dos receptores TLR2 e TLR9. Estes trabalhos demonstraram ainda que no GT destes animais a infecção por HSV-1 leva à ativação de células, como macrófagos e linfócitos T CD8⁺, que passam a produzir níveis elevados de iNOS e IFN- γ , respectivamente. Por outro lado, em animais deficientes para os receptores TLR2 e TLR9 (TLR2/9^{-/-}) observou-se que a resposta imune mediada por iNOS e IFN- γ , bem como, por outras importantes moléculas como IL-1 β , TNF- α e IL-12, são inferiores às observadas para os animais selvagens ou, no caso das quimiocinas IP-10 e MCP-1, são exacerbadas. Em conjunto estes resultados sugerem que, no GT, a ativação e a ação conjunta dos receptores TLR2 e TLR9 são cruciais para o estabelecimento de uma resposta imune efetiva contra o HSV-1 uma vez que camundongos TLR2/9^{-/-} sucumbem à infecção.

Desta forma, com o intuito de ampliar o nosso conhecimento a cerca da resposta imune desencadeada pelo HSV-1, este trabalho teve como objetivo explorar outros aspectos da resposta imune. Para tanto, procurou-se identificar os órgãos e células responsáveis pela produção precoce de IFN do tipo I, bem como, de iNOS, IL-1 β e granzima B em camundongos WT, e comparar com a resposta em animais TLR2/9^{-/-} para avaliar se a expressão e produção destas moléculas são dependentes da ação conjunta dos receptores TLR2 e TLR9 e, além disso, verificar se há outros órgãos e moléculas importantes para a mediação da resposta imune contra o HSV-1.

Uma melhor compreensão a respeito da resposta imune desencadeada pelo HSV-1 pode contribuir não só com a simples identificação dos principais componentes e tecidos envolvidos nesta resposta, mas também com o desenvolvimento de ferramentas terapêuticas. Assim, a realização de novos estudos podem esclarecer pontos importantes da resposta imune que permitam desenvolver estratégias para evitar e/ou controlar os casos graves de infecções por este herpesvirus. Além disso, podem também contribuir com o desenvolvimento de novas classes de adjuvantes ou inibidores específicos capazes de estimular imunidade protetora desejada ou prevenir respostas imunes descontroladas, respectivamente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a resposta imune contra HSV-1, identificando os órgãos e células responsáveis pela produção de iNOS, IL-1 β e granzima B em camundongos WT, juntamente com a produção precoce de IFN tipo I e compará-los à resposta em camundongos TLR2/9^{-/-}.

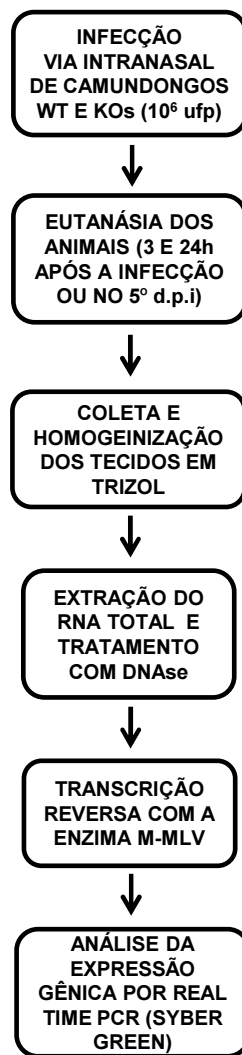
2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a porcentagem de células do sistema imune presentes no GT e baço, em animais infectados e não infectados;
- Avaliar a expressão de IL-1 β por macrófagos peritoneais, em animais infectados e não infectados;
- Identificar a principal célula produtora de IL-1 β no GT e baço, em animais infectados e não infectados;
- Avaliar a cinética de expressão dos genes de IFN do tipo I por células do pulmão, em animais infectados e não infectados;
- Avaliar a expressão de IP-10 no pulmão e traqueia, em animais infectados e não infectados;
- Avaliar a expressão de MCP-1 na traqueia, em animais infectados e não infectados;
- Avaliar a produção de MCP-1 no GT, linfonodo cervical, pulmão e baço, em animais infectados e não infectados;
- Avaliar a expressão de granzima B e identificar a principal célula produtora desta molécula no GT e baço, em animais infectados e não infectados;
- Avaliar a expressão dos genes de IL-10 e IL-5 no GT, em animais infectados e não infectados;
- Identificar as principais células produtoras de iNOS e perforina no GT e baço, em animais infectados e não infectados.

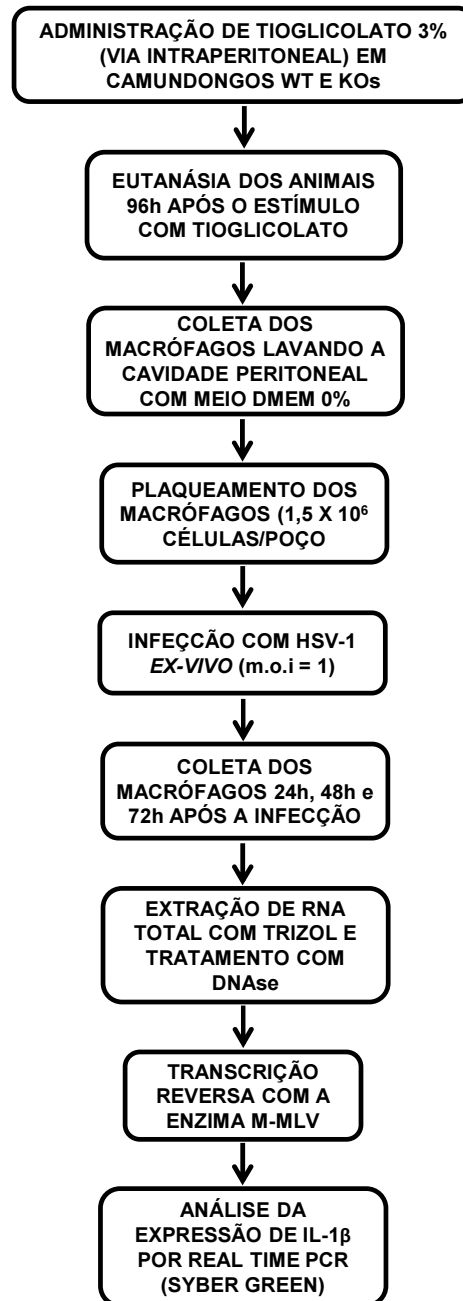
3 METODOLOGIA

3.1 Desenho Experimental

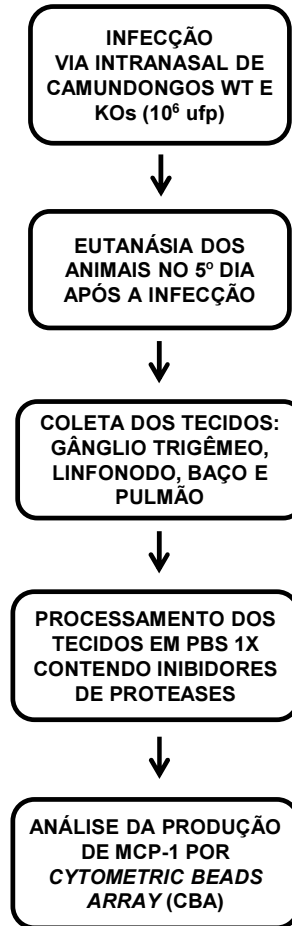
3.1.1 Análise da expressão gênica de moléculas envolvidas na resposta imunológica em infecção por HSV-1



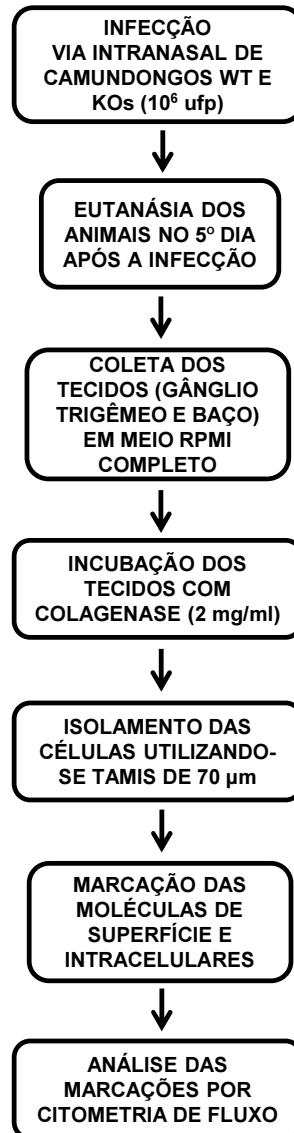
3.1.2 *Análise da expressão de IL-1 β por macrófagos peritoneais infectados com HSV-1*



3.1.3 Análise da produção de citocinas envolvidas na resposta imunológica em infecção por HSV-1



3.1.4 Análise das populações de células e da produção de moléculas envolvidas na resposta imunológica em infecção por HSV-1



3.2 Cultivo Celular

Para a multiplicação e titulação do vírus, foram utilizadas células Vero (células renais de macaco verde africano) provenientes da ATCC. Estas células foram cultivadas em uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma, EUA) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, EUA) e ciprofloxacino (2 mg/ml).

3.3 Vírus

Para as infecções dos animais, foi utilizado o isolado HSV-1 EK, denominado neste trabalho como HSV-1. Esta amostra é um isolado clínico do vírus, proveniente de herpes labial em adulto saudável, que foi isolado em células Vero (ATCC) no Laboratório de Vírus da UFMG (NOGUEIRA et al., 1998, 2001).

3.3.1 Produção do Pool Trabalho e Purificação Viral

Para a produção de um pool trabalho, células Vero foram infectadas com a amostra semente de HSV-1 na m.o.i. de 0,1 (m.o.i. = multiplicidade de infecção). O sobrenadante das células foi coletado sob refrigeração quando os efeitos citopáticos atingiam de 75 a 100% das células.

O protocolo utilizado para a purificação do vírus foi adaptado do que foi previamente estabelecido no Laboratório de Vírus, UFMG (NOGUEIRA et al., 2001). O sobrenadante coletado foi precipitado com uma solução saturada de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) em banho de gelo, com o auxílio de um gotejador, até esta solução atingir 60% do volume final. A solução foi centrifugada a 10415 g por 30 minutos a 4°C. O precipitado foi homogeneizado em 5 ml de Tris 10mM, pH 8,0. Para purificação do vírus, foi preparado um colchão de sacarose em tubo de ultracentrífuga com 10 ml de solução de sacarose 36% acrescido dos 5 ml da suspensão final de vírus. A amostra foi centrifugada a 35248 g por 2 horas a 4°C. O precipitado foi homogeneizado em 1 ml de Tris 10 mM pH 8,0 e, em seguida, aliquotado (alíquotas de 5 µl/tubo). Os tubos contendo as partículas virais purificadas foram estocados a -70°C até sua posterior utilização.

3.3.2 Titulação por contagem de placas

Para a titulação do vírus purificado, 2×10^6 células Vero (por poço) foram implantadas em placas de seis poços com meio DMEM com 5% de SFB e incubadas por 24 horas a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂. Diluições seriadas do vírus (em meio DMEM sem SFB) em base exponencial de 10 foram adsorvidas por uma hora e homogeneizadas a cada quinze minutos. Um poço foi utilizado para controle e, por isso, recebeu apenas meio DMEM sem SFB. Após a adsorção foram adicionados 3 ml de DMEM 2X com 2% de SFB contendo 1,5% de Carboxi-metil-celulose (CMC) (Gibco, EUA) e incubados novamente a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂. Após 72 horas a monocamada foi fixada com formaldeído a 3,7% em PBS 1X e corada com cristal violeta a 1%. 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 (p.f.u./ml).

3.4 Animais

Foram utilizados camundongos machos, entre 6 e 9 semanas, das linhagens C57BL/6 (selvagens, WT) e C57BL/6 duplo knockouts para os receptores TLR2 e TLR9 (knockouts, TLR2/9^{-/-}), fornecidos pelo biotério do Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR/Fiocruz). Os camundongos TLR2/9^{-/-} nos foram cedidos por Alan Sher e André Báfica (NIH, EUA). Estes animais foram previamente obtidos através do cruzamento de camundongos TLR2^{-/-} e TLR9^{-/-}, cedidos por Shizuo Akira (Department of Host Defense, Research Institute for Microbial Disease, Osaka University, Osaka, Japan). Para a realização dos experimentos foram utilizados, no mínimo, 6 animais por grupo.

Os animais foram mantidos no biotério do CPqRR com livre acesso à ração e água e sob ciclo de claro e escuro. Os protocolos de experimentação foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fiocruz (LW-6/11 e LW-20/15).

3.4.1 Anestesia

Para a realização da infecção e eutanásia dos camundongos, os animais foram previamente anestesiados com solução de cloridrato de quetamina (100 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg), por via intraperitoneal.

3.4.2 Infecção Intranasal

Os animais foram inoculados por via intranasal com 1×10^6 p.f.u. do vírus, em um volume final de 10 μ L. Os camundongos controles foram inoculados por via intranasal com 10 μ L PBS 1X. Esta rota de infecção foi uma alternativa à infecção labial já que este método leva a formação de lesões no epitélio oral, resultando em canibalismo entre os animais. Assim, uma vez que o gânglio trigêmeo inerva extensas áreas da face (através dos ramos dos nervos oftálmico, maxilar e mandibular), incluindo a região oral e nasal, este modelo de infecção mantém a rota de infecção do HSV-1 e não causa lesões teciduais.

3.4.3 Eutanásia e coleta dos órgãos

No trabalho de Lima e colaboradores (2010) realizou-se uma cinética de multiplicação viral e de expressão de citocinas do hospedeiro, tendo sido descoberto que com 1×10^6 p.f.u. do HSV-1, no 5º dia após a infecção há um pico de expressão destas citocinas, bem como, de replicação do vírus.

Desta forma, neste trabalho, a eutanásia dos animais ocorreu no 5º dia após a infecção (dpi) (exceto para a análise da expressão dos IFNs do tipo no pulmão, realizada 3 e 24 h após a infecção) e foi realizada por deslocamento cervical após os animais serem anestesiados. Os órgãos alvos do estudo (gânglio trigêmeo, baço, pulmão e traqueia) foram retirados de maneira asséptica, processados imediatamente em solução de TRIzol Reagent (Invitrogen) com o auxílio de um homogeneizador de tecidos e, em seguida, armazenados a -70°C para posterior extração de RNA.

3.5 Cultivo primário de macrófagos peritoneais

O cultivo primário de macrófagos peritoneais foi utilizado tanto para verificar o perfil expressão de IL-1 β por macrófagos peritoneais derivados de animais WT e TLR2/9^{-/-} quanto para produzir padrões de citocinas e quimiocinas para a PCR em Tempo Real.

Para verificar o perfil de expressão de IL-1 β , camundongos WT e TLR2/9^{-/-} foram inoculados por via intraperitoneal com 2 ml de tioglicolato a 3%. Após 96 horas, os animais foram eutanasiados e os macrófagos intraperitoneais coletados da cavidade peritoneal, injetando-se meio DMEM sem SFB. O lavado peritoneal foi, posteriormente, centrifugado a 1200 rpm por 10 minutos a 4°C em centrífuga Eppendorf 5804 R. As células foram então ressuspensas com um volume de 5 ml de meio DMEM com 5% de SFB e, em seguida, o número de células viáveis foi contado em câmara de Neubauer com a adição de Azul de Tripán 2X.

Após a contagem das células, os macrófagos foram plaqueados em uma densidade de $1,5 \times 10^6$ células por poço (placas de 6 poços) e incubados por 3 horas em estufa a 37°C a uma atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida, as células foram lavadas com PBS 1X, para que permanecessem somente as células aderidas à placa. A um grupo de poços foi adicionado 400 μ L de meio DMEM sem SFB contendo HSV-1 (m.o.i. = 1). Para a adsorção do vírus, estes poços foram mantidos por 30 minutos na estufa a 37°C a uma atmosfera de 5% de CO₂, com intervalos de homogeneização a cada 10 minutos. Após os 30 minutos de adsorção estes poços receberam um volume adicional de DMEM com 1% de SFB contendo 20U de IFN- γ murino/ml (quantidade subótima para “primar” os macrófagos). Outro grupo de poços, utilizados como controles, receberam apenas meio DMEM com 5% de SFB e 20U de IFN- γ murino/ml. Estes tratamentos foram acompanhados por um período de 24, 48 e 72 h após a infecção para verificar o perfil de expressão de IL-1 β por estas células. Os sobrenadantes dos poços foram desprezados, e a camada de células lavada com PBS 1X (as células dos poços utilizados como controle foram coletadas após 72 h). Em seguida, foi adicionado TRIzol Reagent (Invitrogen) a cada poço e com um auxílio de um *cell scraper*, as células foram raspadas do fundo da placa,

homogeneizadas e armazenadas em microtubos a -70°C para posterior extração de RNA.

Para a produção de padrões de citocinas e quimiocinas para a PCR em Tempo Real, o procedimento adotado seguiu o delineamento descrito anteriormente, no entanto, com algumas alterações. Para este propósito foram utilizados apenas camundongos WT. As células receberam três estímulos distintos, sendo eles: (a) meio DMEM sem SFB contendo HSV-1 na m.o.i. de 1; (b) meio DMEM com 5% de SFB e 400 ng/ml de LPS; e (c) meio DMEM com 5% de SFB e *E. coli* inativada. Após 24 h de estimulação, as células foram coletas e armazenadas conforme descrito anteriormente.

3.6 Extração de RNA total de tecidos e macrófagos peritoneais

O RNA total dos tecidos (gânglio trigêmeo, baço, pulmão e traqueia), bem como, dos macrófagos peritoneais foi extraído utilizando TRIzol Reagent (Invitrogen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Após a etapa de homogeneização (descrita anteriormente), as amostras foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente e, em seguida, adicionado 200 µl de clorofórmio. As misturas foram homogeneizadas e incubadas novamente à temperatura ambiente, por 3 minutos. A separação das fases foi feita por centrifugação a 12000g por 15 minutos, a 4°C, em centrífuga Eppendorf 5415R. A fase aquosa (superior, transparente), onde o RNA está presente, foi coletada e transferida para um novo microtubo. A precipitação do RNA foi feita com adição de 500 µl de isopropanol, seguida de centrifugação a 12000g por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi então descartado, e o precipitado contendo o RNA foi lavado com 1 ml de etanol 75%. Após uma nova centrifugação de 7500 g a 4°C por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento de RNA dissolvido em água RNase-free (Ultra Pure Distilled Water - Invitrogen). Após a extração, os RNAs foram dosados em espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000 – Thermo Scientific, EUA), tratados com DNase e submetidos a uma reação de transcrição reversa (RT) para obtenção do cDNA (DNA complementar). O restante do RNA total foi armazenado a -70°C.

3.7 Eletroforese em Gel de Agarose

Para checar a qualidade e integridade dos RNAs extraídos, estes foram submetidos a eletroforese em gel de agarose. Para tanto, foi preparado gel de agarose RNase-free 1,0% (p/v). As amostras foram preparadas da seguinte forma: para avaliar 3 µL de RNA total, adicionou-se 5 µL de formamida deionizada pura e 2 µL de tampão de amostra 5x. Após o preparo das amostras, estas foram aquecidas em banho de água ou placa térmica a 65°C por 5-15 min e, posteriormente, colocadas no gelo por 5 minutos. Em seguida, os RNAs foram aplicados no gel e submetidos a uma corrente de no máximo 8V/cm (relativo ao tamanho do gel). Para a visualização das bandas, foi adicionado brometo de etídeo (0,5 µg/µl) às amostras. Ao término da corrida as bandas de RNA foram visualizadas através do fotodocumentador Image Quant LAS 4000.

3.8 Tratamento com DNase

O RNA total extraído foi previamente tratado com DNase RNase-free (Promega, EUA) com o intuito de evitar possíveis contaminações com DNA genômico. O protocolo utilizado seguiu as orientações do fabricante (Promega). A quantidade de RNA tratado com DNase e submetido a RT foi de 2 µg. Para o tratamento do RNA foi adicionado 1 µl de *10x Reaction Buffer* e 2 unidades de *RNase-free DNase* (2 µl), para um volume final de 10µl. Esta reação foi incubada a 37°C por 30 minutos e, posteriormente, inativada com a adição da *DNase Stop Solution* (1 µl) e incubação de 10 minutos a 65°C .

3.9 Reação de transcrição reversa (RT)

A reação de transcrição reversa (RT) foi realizada para obtenção do DNA complementar (cDNA) dos genes estudados. Para a realização da mesma utilizou-se a enzima *M-MLV RT* (Promega, USA) de acordo com as orientações do fabricante. Para tanto, os 2 µg de RNA tratados com DNase foram incubados com 1µg de oligo-dT por 5 minutos a 70°C e, em seguida, resfriados imediatamente em banho de gelo. Posteriormente, foram adicionados 5 µl de *M-MLV 5X Reaction buffer*, 1,25 µl de dNTP 10mM e 200 unidades da enzima *M-MLV RT* (1 µl). Em seguida, a reação foi

incubada a 42°C por 60 minutos. Ao término da reação, os cDNAs foram armazenados a -20°C para posteriores análises.

3.10 PCR em tempo real (qPCR)

Para verificar a expressão dos mRNAs das citocinas de interesse nos órgãos em estudo foram realizadas reações de PCR em tempo real (qPCR). Para cada reação de qPCR foram utilizados 2,5 µL de cDNA (obtido da RT); 0,2 µL de cada iniciador a 10 mM (Tabela 1); 5 µL de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e água para um volume final de 10 µl, para placas de 384 poços. As reações foram submetidas a uma ciclagem padrão (*default*) no aparelho *Applied Biosystems ViiA™ 7 Real-Time PCR System* (Thermo Fischer, EUA). A ciclagem padrão utilizada foi a seguinte: 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Após a reação, a especificidade dos amplicons foi observada, conferindo-se a temperatura de dissociação (T_m) dada pela curva de dissociação, específica para cada transcrito-alvo. Os iniciadores utilizados nas reações de qPCR, descritos no Tabela 1, foram desenhados ou obtidos de artigos. As sequências selecionadas foram analisadas no BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), quanto à similaridade com outras sequências depositadas no banco de dados; no Clustal W, para avaliar o alinhamento da sequência genômica e do mRNA e verificar o melhor posicionamento dos oligonucleotídeos; e no Oligo Analyzer, para verificar a T_m dos primers, conteúdo de GC e a formação de dímeros.

Tabela 1. Iniciadores utilizados na PCR em Tempo Real.

GENE	SEQUÊNCIA	AMPLICON	REFERÊNCIA
HPRT	For: 5'-GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GTT G-3'	163 pb	Lima <i>et al.</i> , 2010
	Rev: 5'-GAT TCA ACT TGC GCT CAT CTT AGG C-3'		
GRANZIMA B	For: 5'-ACT TTC GAT CAA GGA TCA GCA-3'	142 pb	
	Rev: 5'-GGC CCC CAA AGT GAC ATT TAT T-3'		
IL-10	For: 5'-GGT TGC CAA GCC TTA TCG GA-3'	191 pb	Giulietti <i>et al.</i> , 2001
	Rev: 5'-ACC TGC TCC ACT GCC TTG CT-3'		
IL-5	For: 5'-ACA GTG GTG AAA GAG ACC TT-3'	114 pb	Giulietti <i>et al.</i> , 2001
	Rev: 5'-TCC AAT GCA TAG CTG GTG ATT T-3'		
IFN- β	For: 5'-CTG GAG CAG CTG AAT GGA AA-3'	213 pb	Lima <i>et al.</i> , 2010
	Rev: 5'-TGT CTG CTG GTG GAG TTC AT-3'		
IFN- α 4	For: 5'-ACT CAT TCT GCA ATG ACC TCC-3'	70 pb	
	Rev: 5'-AGA GGA GGT TCC TGC ATC ACA-3'		
MCP-1	For: 5'-CTT CTG GGC CTG CTG TTC A-3'	127 pb	Giulietti <i>et al.</i> , 2001
	Rev: 5'-CCA GCC TAC TCA TTG GGA TCA-3'		
IP-10	For: 5'-GCC GTC ATT TTC TGC CTC AT-3'	127 pb	Giulietti <i>et al.</i> , 2001
	Rev: 5'-GCT TCC CTA TGG CCC TCA TT-3'		
IL-1 β	For: 5'-CGC AGC AGC ACA TCA ACA AGA GC-3'	111 pb	Lima <i>et al.</i> , 2010
	Rev: 5'-TGT CCT CAT CCT GGA AGG TCC ACG-3'		

Para as análise das expressões gênicas por qPCR utilizamos o Método da Curva Padrão Relativa. Este é um tipo de quantificação relativa, utilizado para avaliar mudanças na expressão gênica de grupos experimentais distintos. Seus resultados são expressos em ordem de grandeza e não em valores absolutos. Este método requer a construção de curvas padrão para todos os genes, as quais devem estar presentes em todas as placas. A curva padrão consiste em diluições seriadas dos amplicons dos genes alvo, bem como, do gene de referência. Em nossas análises utilizamos o HPRT (hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase) como gene de referência, uma vez que apresentou expressão estável nas diferentes situações testadas. As curvas padrão foram feitas em triplicatas enquanto que as amostras foram feitas em duplicatas.

Os amplicons para as curvas padrão foram obtidos a partir de cDNAs de macrófagos peritoneais (descrito no item 3.5). Para tanto, estes cDNAs foram submetidos a reações de qPCR utilizando-se os pares de primers descritos na Tabela 1. Ao final das reações os produtos da PCR foram purificados utilizando o kit *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare, USA), de acordo com as orientações do fabricante. Em seguida, para confirmar o

tamanho dos amplicons esperados, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (descrito a seguir).

Para a análise dos resultados foram atribuídos valores arbitrários para os pontos das curvas e, assim, obtivemos os valores brutos da quantidade expressa de cada gene. Em seguida, os valores da expressão dos genes alvo foram normalizados em relação aos do gene de referência. Com os genes alvo normalizados, a etapa final foi verificar a relação de expressão entre amostras infectadas e não infectadas (calibrador). Neste caso, dividimos o valor do gene alvo normalizado pela média dos calibradores. Estes resultados foram então plotados e expressos como unidades arbitrárias. Para as análises foram consideradas somente curvas com R^2 superior a 0,95.

3.11 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

Para confirmar o tamanho dos amplicons esperados fizemos eletroforese em gel de poliacrilamida. O gel foi preparado adicionando-se 10 ml de acrilamida 6%, 125 μ l de APS e 12,5 μ l de TEMED. Após homogeneização, esta solução foi colocada no suporte para gel, devidamente montado. Após a polimerização do gel, os produtos de PCR foram aplicados. A corrida foi efetuada a 120V, por aproximadamente 60 minutos. O tampão utilizado foi o TBE 1X.

Posteriormente, para a visualização dos fragmentos de DNA, o gel foi corado com solução prata. Para tanto, o gel foi incubado por 10 minutos em uma solução fixadora, sob agitação. Em seguida, foi adicionado 1ml de solução de prata 10%, mantendo-se sob agitação. Após o descarte desta solução em seu devido local, o gel foi lavado com água destilada. Logo após, foram adicionados 150 ml da solução reveladora e 450 μ l de formaldeído para a revelação das bandas. Para interromper a revelação, a solução reveladora foi desprezada e, em seguida, adicionada a solução fixadora. O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação com o padrão *Ladder 100* (Invitrogen, EUA).

3.12 *Cytometric Beads Array* (CBA)

Ensaio citofluorométrico com microesferas fluorescentes (*Cytometric Beads Array* – CBA, BDPharmingen, EUA) foram realizados para dosar os níveis de MCP-1 no GT, linfonodo cervical, baço e pulmão de animais C57BL/6 e TLR2/9^{-/-} infectados e não infectados. Nestes ensaios emprega-se uma mistura de microesferas recobertas com anticorpos específicos, com distintas intensidades de fluorescência, que combinada à citometria de fluxo permitem a detecção das citocinas de interesse.

Assim, para a realização destes ensaios, os tecidos de interesse foram extraídos e imediatamente homogeneizados em solução de PBS 1X contendo inibidores de protease (cOmplete, Mini, EDTA-free – La Roche). Posteriormente, para separação dos debris celulares, os homogenatos foram centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C em centrífuga Eppendorf 5415R. Em seguida, os sobrenadantes foram coletados e procedeu-se com a dosagem dos níveis de MCP-1 utilizando o *Mouse Inflammation Kit* (BD, EUA), de acordo com as orientações do fabricante. A leitura das amostras foi feita no equipamento BD FACScan.

3.13 Isolamento de células

Para as análises das populações de células presentes no GT e baço de animais WT e TLR2/9^{-/-}, bem como, da produção de moléculas por estes tipos celulares, realizamos ensaios de citometria de fluxo. Para tanto, foi necessário realizar o isolamento de células do GT e baço de animais C57BL/6 e TLR2/9^{-/-}, infectados e não infectados. Deste modo, os órgãos foram coletados e imediatamente incubados com colagenase 2 mg/ml (Merck-Chemicals, EUA) por 30 minutos a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida, procedeu-se com o isolamento das suspensões de células as quais foram preparadas macerando-se os tecidos através de tamis de 70µm (*nylon cell strainer* – BD Biosciences, EUA) com o auxílio de um êmbolo de seringa. As células foram então lavadas com meio RPMI suplementado com 10% SFB (RPMI completo) e, em seguida, centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos a 4°C em centrífuga Eppendorf 5804 R. Os sobrenadantes foram desprezados. No caso dos esplenócitos, os pellets foram adicionalmente tratados com tampão de lise ACK por 2 minutos em gelo e, logo, lavados com meio RPMI

completo e centrifugados. As células foram então ressuspensas em meio RPMI completo para posterior análise por citometria de fluxo.

3.14 Citometria de Fluxo

Suspensões de células do GT e baço foram plaqueadas em placas de 96 poços com fundo em U na proporção de 1×10^6 células/poço e, em seguida, incubadas a 37°C por 8 horas em uma atmosfera de 5% de CO₂. Posteriormente, adicionou-se 0,2 µL/poço de GolgiPlug Protein Transport Inhibitor (BD Biosciences, EUA) e as placas voltaram a ser incubadas, desta vez, por 10 horas. Após o período de incubação os poços foram lavados com tampão FACS (PBS 1X suplementado com 2% SFB) e as amostras foram marcadas com Live/Dead (Invitrogen, EUA) na proporção de 0,1 µL/poço, por 10 minutos a 4°C para exclusão de células mortas. Em seguida, as células foram lavadas novamente e, desta vez, marcadas com diluições apropriadas de anticorpos para moléculas de superfície (volume total de 50 µL/poço), por 30 minutos a 4°C. Após a marcação, as células foram fixadas e permeabilizadas com Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, EUA), de acordo com as orientações do fabricante. Em seguida, as células foram lavadas novamente e incubadas com anticorpos para moléculas intracelulares (volume total de 50 µL/poço), por 30 minutos a 4°C. Por fim, as células foram lavadas novamente e ressuspensas em 200 µL tampão FACS para análise no citômetro de fluxo. Os dados foram coletados usando LSR II (BD Immucytometry Systems, USA) com Diva (BD Biosciences, USA). Foram adquiridos ao menos 100.000 eventos. O painel de anticorpos utilizados para avaliar as subpopulações de células está descrito na Tabela 2. Os dados foram analisados com o software FlowJo (Tree Star). A expressão dos marcadores mielóides foi analisada após o “gate” em células CD45⁺CD3⁻ vivas.

Tabela 2. Anticorpos monoclonais e fluoróforos utilizados para as análises das subpopulações de células presentes no gânglio trigêmeo e baço de animais C57BL/6 e TLR2/9^{-/-}, infectados e não infectados.

Anticorpo	Volume/Poço (µL)	Fabricante
anti-CD11c PE-Cyanine7 clone N418	1,25	eBioscience
anti-F4/80 eFluor 450 clone BM8	0,25	eBioscience
anti-CD11b Brilliant Violet 570 clone M1/70	0,25	BioLegend
anti-I-4/I-E biotin clone 2G9	0,125	BD Pharmingen
Streptavidin Qdot 605	0,03	Invitrogen
anti-CD45.2 Alexa Fluor 700 clone 104	0,3	eBioscience
anti-NK1.1 APC-eFluor 780 clone PK136	0,625	eBioscience
anti-CD4 Qdot 605 clone RM4-5	0,035	Invitrogen
anti-CD8a PE clone 53-6.7	0,375	BD Pharmingen
anti-CD3e PerCP clone 145-2C11	2	BD Pharmingen
anti-IL-1β pro-form APC clone NJTEN3	0,25	eBioscience
anti-Granzyme B PE-Cy7 clone 16G6	0,3	eBioscience
anti-Perforin FITC clone eBioOMAK-D	0,1	eBioscience
anti-iNOS/NOS Type II FITC clone 6/iNOS/NOS Type II	1,25	BD Transduction Laboratories

3.15 Análises Estatísticas

As análises estatísticas realizadas utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism 5 (*GraphPad Software*, EUA). Os grupos de amostras foram avaliados por meio de testes não-paramétricos e paramétricos dependendo do teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. O teste estatístico de Mann-Whitney foi empregado nas análises de dados não-paramétricos. Para dados paramétricos utilizamos o teste T não-pareado. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Análise da população de células presentes no gânglio trigêmeo e baço de animais C57BL/6 e TLR2/9^{-/-} infectados por HSV-1

Trabalhos anteriores do nosso grupo evidenciaram um aumento na população de macrófagos presentes no GT de animais C57BL/6 após infecção por HSV-1 (LIMA et al., 2010; ZOLINI et al., 2014). Populações de células CD4⁺, CD8⁺, NK e DC também foram avaliadas, no entanto, não houve diferença na porcentagem destas células entre camundongos C57BL/6 controles e infectados (LIMA et al., 2010). Em razão das análises destes trabalhos terem sido realizadas apenas em animais C57BL/6, decidimos investigar também o perfil da população de células nos animais TLR2/9^{-/-}. Para tanto, camundongos WT e TLR2/9^{-/-} foram infectados com 1×10^6 p.f.u. de vírus. No 5º dia após a infecção, os animais foram eutanasiados e os tecidos coletados para análise em citometria de fluxo. Este experimento foi realizado tanto com o GT quanto com o baço com o intuito de avaliar a população de células tanto em nível local quanto em nível sistêmico, respectivamente.

De maneira geral, as populações de leucócitos (CD45⁺) e células mielóides (CD45⁺CD3⁻CD11b⁺) aumentaram no GT dos camundongos WT e knockouts após a infecção por HSV-1 (Figura 9a e 9b).

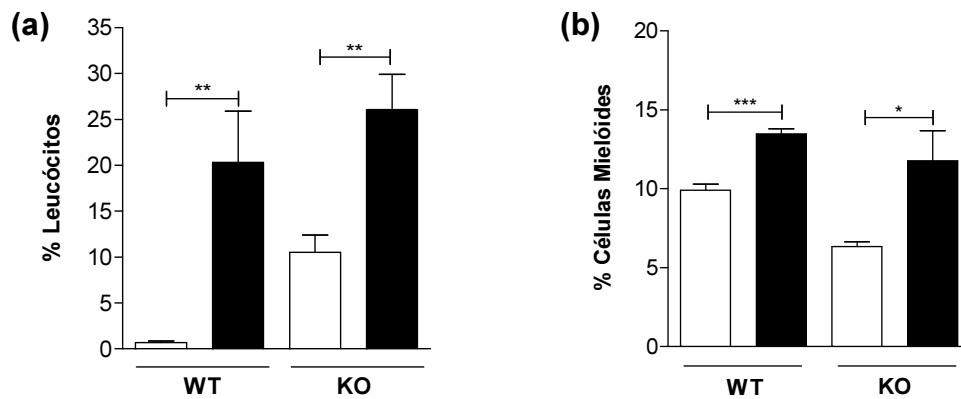


Figura 9. Perfil da população de leucócitos e células mielóides presentes no gânglio trigêmeo de camundongos C57BL/6 e TLR2/9^{-/-} infectados com HSV-1. O perfil de células presentes no GT de camundongos C57BL/6 (WT) e TLR2/9^{-/-} (KO) foi obtido por citometria de fluxo. Seis animais por grupo foram infectados por via intranasal com 10⁶ u.f.p. de HSV-1. Os animais controle inalaram apenas PBS. No 5º dia após a infecção, os animais foram eutanasiados e a suspensão de células do GT preparada. (a) Frequência de leucócitos (CD45⁺) vivos analisada dentro da população de células do GT. (b) Frequência de células mielóides (CD45⁺CD3⁺CD11b⁺) analisada dentro da população de leucócitos vivos do GT. Foram adquiridos no mínimo 100000 eventos para as análises. * p<0.05; ** p<0.01 e *** p<0.001. Barras brancas: animais não infectados. Barras pretas: animais infectados. WT: camundongos C57BL/6. KO: camundongos TLR2/9^{-/-}.

No baço, o perfil de células mielóides também aumentou nos grupos infectados, no entanto, os leucócitos globais diminuíram em ambos os grupos após a infecção (Figura 10a e 10b).

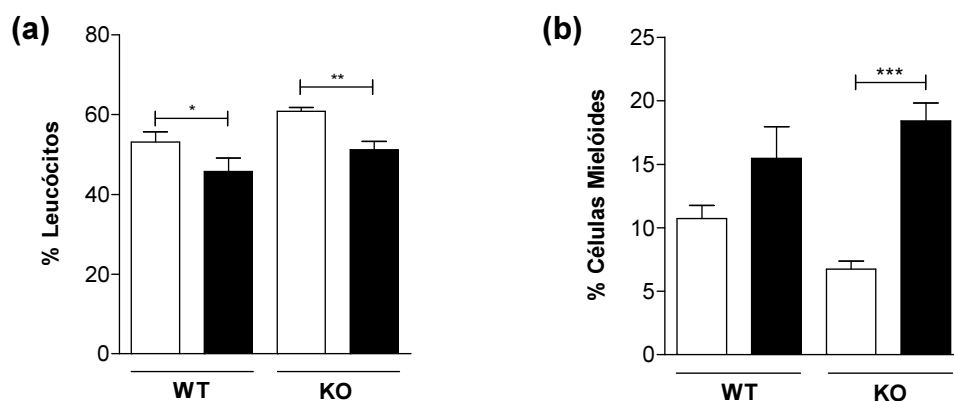


Figura 10. Perfil da população de leucócitos e células mielóides presentes no baço de camundongos C57BL/6 e TLR2/9^{-/-} infectados com HSV-1. O perfil de células presentes no baço de camundongos C57BL/6 (WT) e TLR2/9^{-/-} (KO) foi obtido por citometria de fluxo. Seis animais por grupo foram infectados por via intranasal com 10⁶ u.f.p. de HSV-1. Os animais controle inalaram apenas PBS. No 5º dia após a infecção, os animais foram eutanasiados e a suspensão de células do baço preparada. (a) Frequência de leucócitos (CD45⁺) vivos analisada dentro da população de células do baço. (b) Frequência de células mielóides (CD45⁺CD3⁺CD11b⁺) analisada dentro da população de leucócitos vivos do baço. Foram adquiridos no mínimo 100000 eventos para as análises. * p<0.05; ** p<0.01 e *** p<0.001. Barras brancas: animais não infectados. Barras pretas: animais infectados. WT: camundongos C57BL/6. KO: camundongos TLR2/9^{-/-}.

A análise das diferentes populações de células presentes no GT mostrou que as porcentagens de células $CD4^+$ e $CD8^+$ são similares tanto nos camundongos WT controles quanto nos infectados (Figura 11). No grupo de camundongos $TLR2/9^{-/-}$, no entanto, verificou-se que houve um aumento considerável destas células após a infecção, sendo superior ao observado em animais WT infectados (Figura 11). Diferentemente, a porcentagem de células NK T no GT de animais $TLR2/9^{-/-}$ caiu drasticamente após a infecção enquanto que nos camundongos WT a população destas células não alterou após a infecção (Figura 11). Já o perfil das células NK presentes no GT de animais WT e knockouts foi similar entre os grupos de animais controle e infectado (Figura 11). Contudo, dentre todos os tipos celulares avaliados, os únicos que apresentaram aumento significativo em suas populações de células no GT de animais WT infectados foram as DCs e os MOs (Figura 11). Diferentemente, os animais knockouts não exibiram diferença estatística no número de células DCs e MOs, presentes no GT dos animais controle e infectados (Figura 11).

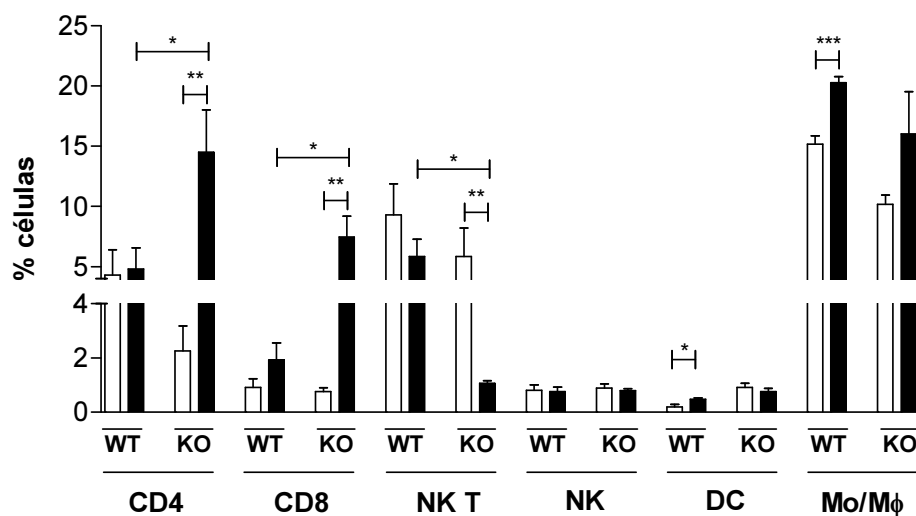


Figura 11. Perfil da população de células do sistema imune presentes no gânglio trigêmeo de camundongos C57BL/6 e $TLR2/9^{-/-}$ infectados com HSV-1. O perfil das células presentes no GT de camundongos C57BL/6 (WT) e $TLR2/9^{-/-}$ (KO) foi obtido por citometria de fluxo. Seis animais por grupo foram infectados por via intranasal com 10^6 u.f.p. de HSV-1. Os animais controle inalaram apenas PBS. No 5º dia após a infecção, os animais foram eutanasiados e a suspensão de células do GT preparada. As frequências de células T $CD4^+$ ($CD45^+CD3^+CD4^+$); T $CD8^+$ ($CD45^+CD3^+CD8^+$), NK T ($CD45^+CD3^+NK1.1^+$), NK ($CD45^+CD3^+NK1.1^+$), dendríticas (DC, $CD45^+MHC$ classe II^{high} $CD11c^+$) e monócitos/macrófagos (Mφ, $CD45^+F4/80^+$) foram analisadas dentro da população de leucócitos vivos do GT. Foram adquiridos no mínimo 100.000 eventos para as análises. * $p<0.05$; ** $p<0.01$ e *** $p<0.001$. Barras brancas: animais não infectados. Barras pretas: animais infectados. WT: camundongos C57BL/6. KO: camundongos $TLR2/9^{-/-}$.

Em nível sistêmico (baço), no entanto, o perfil populacional de células mostrou-se distinto do GT (Figura 12). O número de células $CD4^+$, por exemplo, diminuiu após a infecção tanto nos camundongos WT quanto nos knockouts (Figura 12). Esta redução também ocorreu para a população de células $CD8^+$, no entanto, ela foi observada apenas nos animais $TLR2/9^{-/-}$ (Figura 12). Já as células NK T, tanto nos animais WT quanto nos knockouts exibiu perfil similar mesmo após a infecção, contudo, a porcentagem de células presentes no baço dos animais WT infectados foi superior ao observado nos $TLR2/9^{-/-}$ (Figura 12). As células NK também não apresentaram diferença em sua população nos camundongos WT após a infecção, ao contrário dos animais knockouts, os quais diante da infecção exibiram um aumento no número destas células (Figura 12). As DCs, por outro lado, tiveram sua população significativamente reduzida em ambos os animais após a infecção, no entanto, sua quantidade foi expressivamente menor nos camundongos WT infectados (Figura 12). Assim como no GT, a porcentagem de MOs aumentou nos animais WT infectados, no entanto, este aumento foi também observado nos camundongos knockouts (Figura 12).

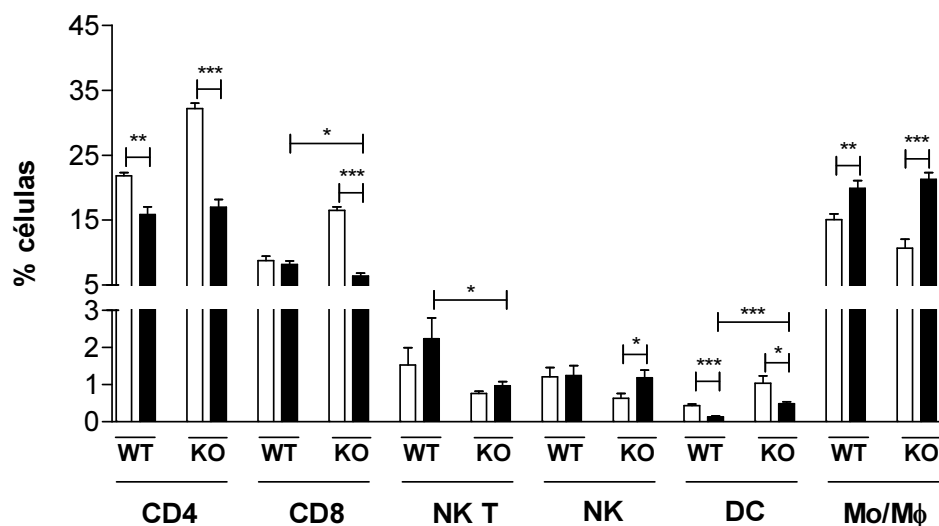


Figura 12. Perfil da população de células do sistema imune presentes no baço de camundongos C57BL/6 e $TLR2/9^{-/-}$ infectados com HSV-1. O perfil das células presentes no baço de camundongos C57BL/6 (WT) e $TLR2/9^{-/-}$ (KO) foi obtido por citometria de fluxo. Seis animais por grupo foram infectados por via intranasal com 10^6 u.f.p. de HSV-1. Os animais controle inalaram apenas PBS. No 5º dia após a infecção, os animais foram eutanasiados e a suspensão de células do baço preparada. As frequências de células T $CD4^+$ ($CD45^+CD3^+CD4^+$); T $CD8^+$ ($CD45^+CD3^+CD8^+$), NK T ($CD45^+CD3^+NK1.1^+$), NK ($CD45^+CD3^+NK1.1^+$), dendríticas (DC, $CD45^+MHC$ classe II^{high} $CD11c^+$) e monócitos/macrófagos ($M\phi$, $CD45^+F4/80^+$) foram analisadas dentro da população de leucócitos vivos do baço. Foram adquiridos no mínimo 100.000 eventos para as análises. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$. Barras brancas: animais não infectados. Barras pretas: animais infectados. WT: camundongos C57BL/6. KO: camundongos $TLR2/9^{-/-}$.

4.2 Análise da expressão e produção de IL-1 β em animais C57BL/6 e TLR2/9^{-/-} infectados por HSV-1

Níveis elevados de expressão de IL-1 β no GT de animais WT infectados e reduzidos níveis desta citocina nos animais TLR2/9^{-/-} foram anteriormente observados por Lima e colaboradores (LIMA et al., 2010). Por se tratar de uma citocina com papel relevante para o estabelecimento do processo inflamatório, decidimos primeiramente avaliar sua expressão em macrófagos peritoneais. Desta forma, fizemos uma cinética da expressão de IL-1 β utilizando-se macrófagos peritoneais provenientes de animais WT e TLR2/9^{-/-} que foram posteriormente infectados in vitro com HSV-1 (m.o.i. = 1). A expressão de IL-1 β foi acompanhada por 24, 48 e 72 h.

Através da cinética de expressão de IL-1 β verificou-se que os camundongos WT e knockouts não apresentaram níveis detectáveis dos transcritos desta citocina antes da infecção por HSV-1 (Figura 13). No entanto, após a infecção, os MOs de animais WT expressaram esta citocina, atingindo elevados níveis de expressão 48h e 72 h após a infecção (Figura 13). Os MOs provenientes de camundongos TLR2/9^{-/-} também apresentaram um pequeno aumento nos níveis de mRNAs desta citocina, atingindo maior expressão 48h após a infecção. No entanto, o aumento observado nos camundongos WT foi, ainda assim, superior ao detectado nos animais knockouts (Figura 13).

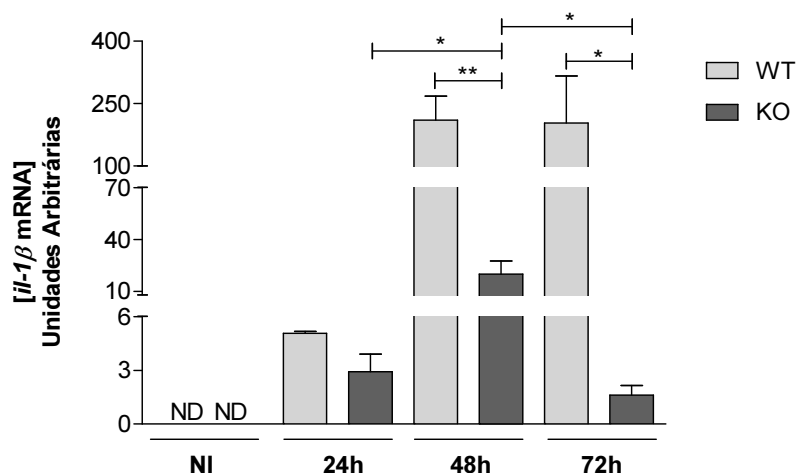


Figura 13. Cinética de expressão de IL-1 β em macrófagos peritoneais derivados de camundongos C57BL/6 e TLR2/9^{-/-} infectados com HSV-1. Macrófagos peritoneais derivados de camundongos C57BL/6 (WT) e TLR2/9^{-/-} foram infectados in vitro (5 poços/grupo) com HSV-1 (m.o.i. = 1). Os níveis de IL-1 β foram mensurados por qPCR 24, 48 e 72 h após a infecção. As células do grupo controle (não infectado) foram coletadas com 72 h. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias e refletem a proporção de mRNA do gene alvo em relação ao mRNA do gene endógeno (HPRT). Os dados são representativos de dois experimentos independentes com resultados similares. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$. ND = não detectado. NI: não infectado.

Estes dados evidenciaram, portanto, que a ausência dos receptores TLR2 e TLR9 tem um efeito negativo muito forte sobre os níveis de mRNA de IL-1 β . Desta forma, posteriormente avaliamos, por citometria de fluxo, a produção desta citocina e identificamos a principal célula responsável por sua produção nas condições experimentais estudadas. Para tanto, animais WT e TLR2/9^{-/-} foram infectados por via intranasal com 1×10^6 u.f.p. de vírus e no 5º dia após a infecção os animais foram eutanasiados e suspensões de células provenientes do GT e baço foram preparadas para análise em citômetro de fluxo.

Os ensaios de citometria evidenciaram que em camundongos WT a principal resposta de IL-1 β contra a infecção por HSV-1 ocorreu a nível local e não sistêmico (Figura 14). As análises no GT de animais WT infectados mostraram uma grande porcentagem de células mielóides produtoras de IL-1 β neste tecido (Figura 14a). No baço, por outro lado, a produção desta citocina não foi detectada (Figura 14b). Já nos animais knockouts a produção desta citocina não foi detectada em ambos tecidos, após a infecção (Figura 14a e 14b).

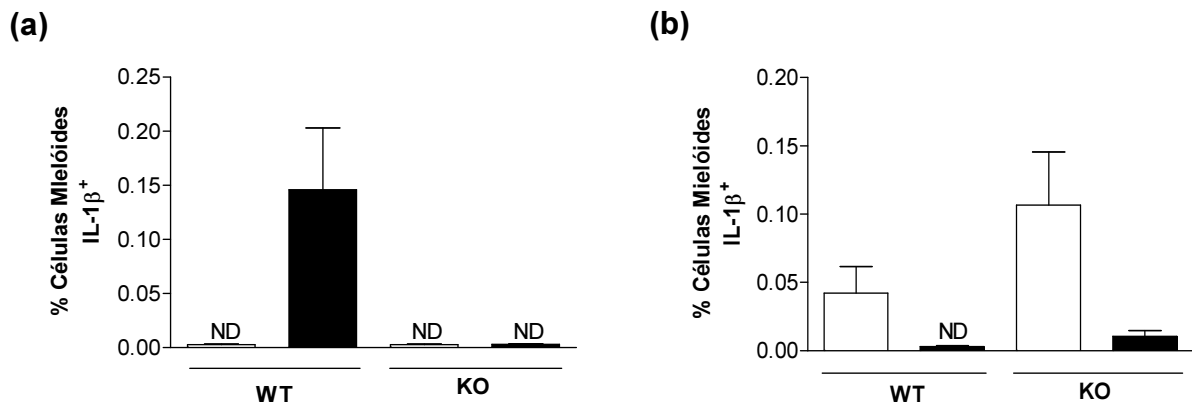
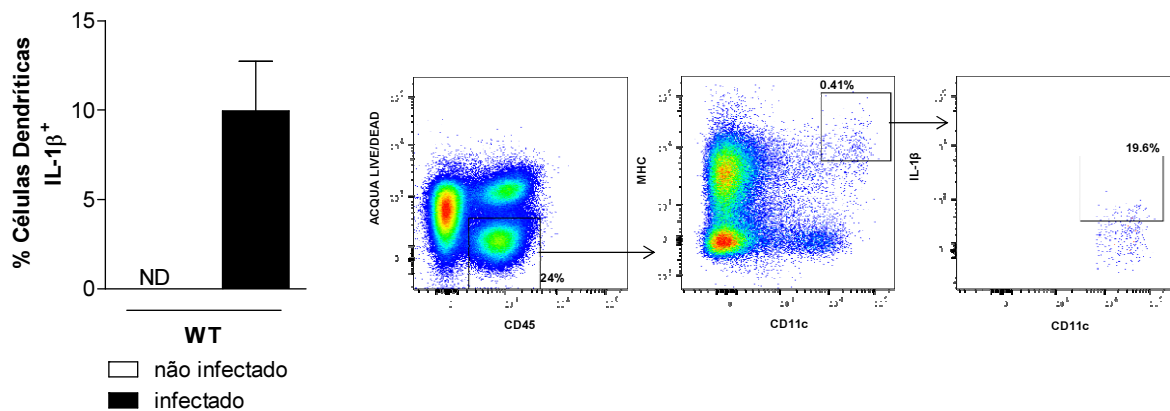


Figura 14. Produção de IL-1 β por células mielóides no gânglio trigêmeo e no baço de camundongos C57BL/6 e TLR2/9^{-/-} infectados com HSV-1. Para análise das frequências das populações de células mielóides produtoras de IL-1 β no GT e baço de animais C57BL/6 e TLR2/9^{-/-}, grupos de seis animais foram infectados por via intranasal com 10⁶ u.f.p. de HSV-1. Os animais controle inalaram apenas PBS. No 5º dia após a infecção, os animais foram eutanasiados e a suspensão de células do GT e do baço foram preparadas para análise por citometria de fluxo. (a) Frequência de células mielóides (CD45⁺CD3⁻CD11b⁺) produtoras de IL-1 β no GT. (b) Frequência de células mielóides (CD45⁺CD3⁻CD11b⁺) produtoras de IL-1 β no baço. A frequência de células mielóides foi calculada dentro da população de leucócitos vivos. Foram adquiridos no mínimo 100.000 eventos para as análises. Barras brancas: animais não infectados. Barras pretas: animais infectados. WT: camundongos C57BL/6. KO: camundongos TLR2/9^{-/-}.

As análises por citometria de fluxo possibilitaram também identificar, dentre a população de células estudadas, as DCs como as principais células produtoras de IL-1 β no GT de animais WT durante a infecção por HSV-1 (Figura 15a). Esta população de células, no entanto, não produziu no baço IL-1 β diferencialmente (Figura 15b).

(a)



(b)

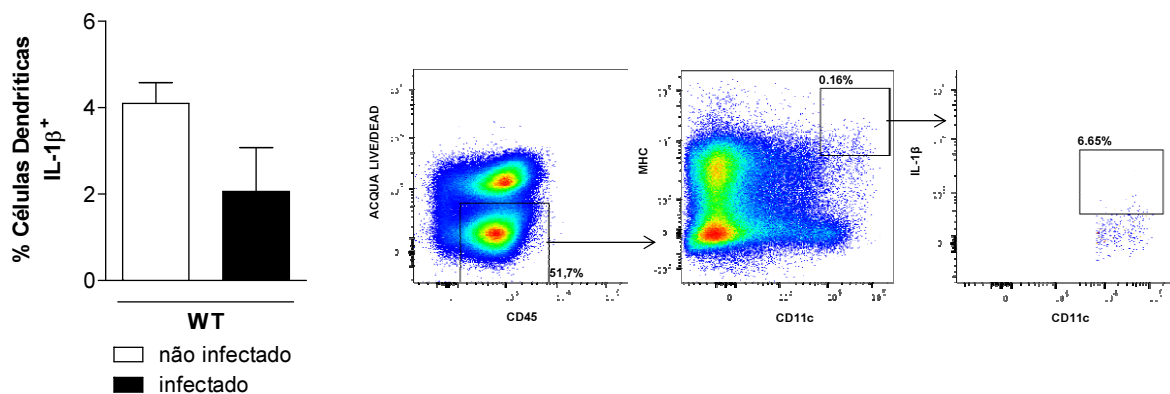


Figura 15. Produção de IL-1 β por células dendríticas no gânglio trigêmeo e no baço de camundongos C57BL/6 infectados com HSV-1. Para análise das frequências das populações de células dendríticas produtoras de IL-1 β no GT e baço de animais C57BL/6, grupos de seis animais foram infectados por via intranasal com 10⁶ u.f.p. de HSV-1. Os animais controle inalaram apenas PBS. No 5º dia após a infecção, os animais foram eutanasiados e a suspensão de células do GT e do baço preparadas para análise por citometria de fluxo. (a) À esquerda, frequência de células dendríticas (CD45⁺MHC classe II^{high}CD11c⁺) produtoras de IL-1 β no GT. À direita, dot plots representativos mostrando a estratégia de “gate” utilizada para a identificação de IL-1 β dentro de MHC classe II^{high}CD11c⁺ em leucócitos CD45⁺ vivos do GT de um único camundongo WT infectado. (b) À esquerda, frequência de células dendríticas (CD45⁺MHC classe II^{high}CD11c⁺) produtoras de IL-1 β no baço. À direita, dot plots representativos mostrando a estratégia de “gate” utilizada para a identificação de IL-1 β dentro de MHC classe II^{high}CD11c⁺ em leucócitos CD45⁺ vivos do baço de um único camundongo WT infectado. Foram adquiridos no mínimo 100.000 eventos para as análises. WT: camundongos C57BL/6.

4.3 Análise da produção de iNOS no gânglio trigêmeo e baço de animais C57BL/6 e TLR2/9^{-/-} infectados por HSV-1

O trabalho de Zolini e colaboradores (2014) demonstrou previamente que iNOS tem um importante papel na resposta imune à infecção por HSV-1 uma vez que animais knockouts para essa molécula sucumbem à infecção. Além disso, mostrou que os macrófagos expressam iNOS de maneira TLR-dependente. Desta forma, decidimos avaliar a produção de iNOS a nível local e sistêmico e identificar outros tipos celulares que produzem esta molécula. Estas análises foram realizadas por citometria de fluxo no GT e baço de camundongos WT e TLR2/9^{-/-} infectados com 1×10^6 u.f.p. de HSV-1.

Os dados destas análises mostraram que houve um aumento na porcentagem de células mielóides produtoras de iNOS no GT de camundongos WT durante a infecção por HSV-1 (Figura 16a). Este aumento, no entanto, não foi observado no GT dos animais knockouts (Figura 16a). Por outro lado, o baço tanto de camundongos WT como o de TLR2/9^{-/-} infectados apresentaram uma redução na porcentagem de células mielóides produtoras de iNOS (Figura 16b).

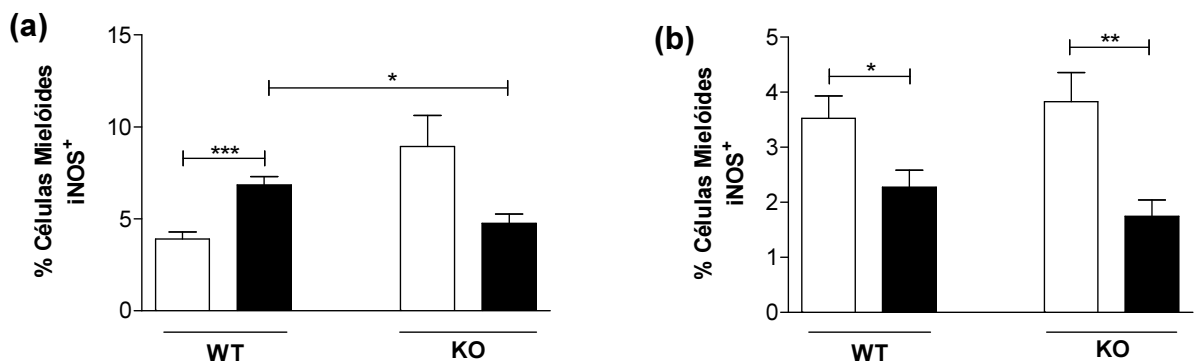


Figura 16. Produção de iNOS por células mielóides no gânglio trigêmeo e no baço de camundongos C57BL/6 e TLR2/9^{-/-} infectados com HSV-1. Para análise das frequências das populações de células mielóides produtoras de iNOS no GT e baço de animais C57BL/6 e TLR2/9^{-/-}, grupos de seis animais foram infectados por via intranasal com 10^6 u.f.p. de HSV-1. Os animais controle inalaram apenas PBS. No 5º dia após a infecção, os animais foram eutanasiados e a suspensão de células do GT e do baço foram preparadas para análise por citometria de fluxo. (a) Frequência de células mielóides (CD45⁺CD3⁺CD11b⁺) produtoras de iNOS no GT. (b) Frequência de células mielóides (CD45⁺CD3⁺CD11b⁺) produtoras de iNOS no baço. A frequência de células mielóides foi calculada dentro da população de leucócitos vivos. Foram adquiridos no mínimo 100.000 eventos para as análises. Barras brancas: animais não infectados. Barras pretas: animais infectados. WT: camundongos C57BL/6. KO: camundongos TLR2/9^{-/-}.

Dentre os tipos celulares avaliados, uma porcentagem significativa de Mo/M ϕ produtores de iNOS foi observada no GT de camundongos WT infectados comparados aos animais TLR2/9^{-/-} infectados (Figura 17a e 18a). No entanto, entre os animais knockouts, controles e infectados, não houve diferença estatística. No baço, por outro lado, a porcentagem de Mo/M ϕ iNOS⁺ foi similar entre animais WT não infectados e infectados enquanto que nos TLR2/9^{-/-} houve uma diminuição no número destas células após a infecção (Figura 17b e 18b).

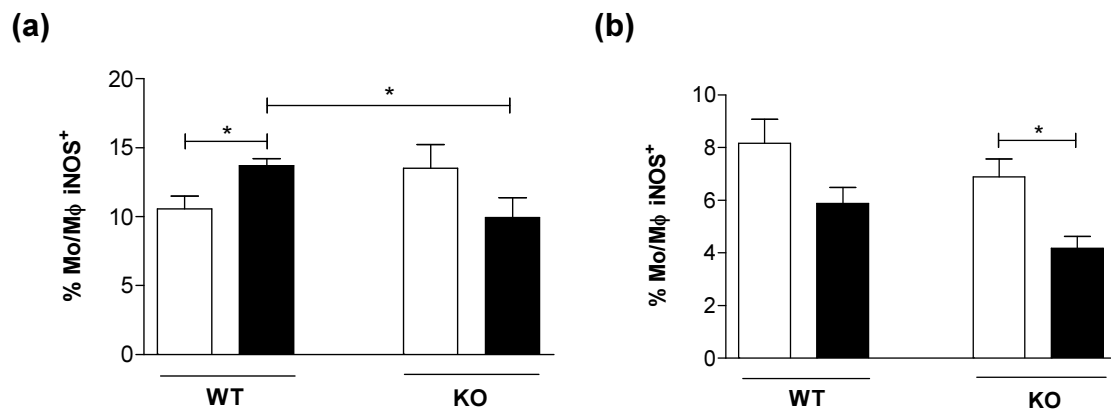


Figura 17. Produção de iNOS por monócitos/macrófagos no gânglio trigêmeo e no baço de camundongos C57BL/6 e TLR2/9^{-/-} infectados com HSV-1. Para análise das frequências das populações de monócitos/macrófagos produtoras de iNOS no GT e baço de animais C57BL/6 e TLR2/9^{-/-}, grupos de seis animais foram infectados por via intranasal com 10⁶ u.f.p. de HSV-1. Os animais controle inalaram apenas PBS. No 5º dia após a infecção, os animais foram eutanasiados e a suspensão de células do GT e do baço foram preparadas para análise por citometria de fluxo. (a) Frequência de monócitos/macrófagos (CD45⁺F4/80⁺) produtoras de iNOS no GT. (b) Frequência de monócitos/macrófagos (CD45⁺F4/80⁺) produtoras de iNOS no baço. A frequência de monócitos/macrófagos foi calculada dentro da população de leucócitos vivos. Foram adquiridos no mínimo 100.000 eventos para as análises. * p<0.05. Barras brancas: animais não infectados. Barras pretas: animais infectados. WT: camundongos C57BL/6. KO: camundongos TLR2/9^{-/-}.

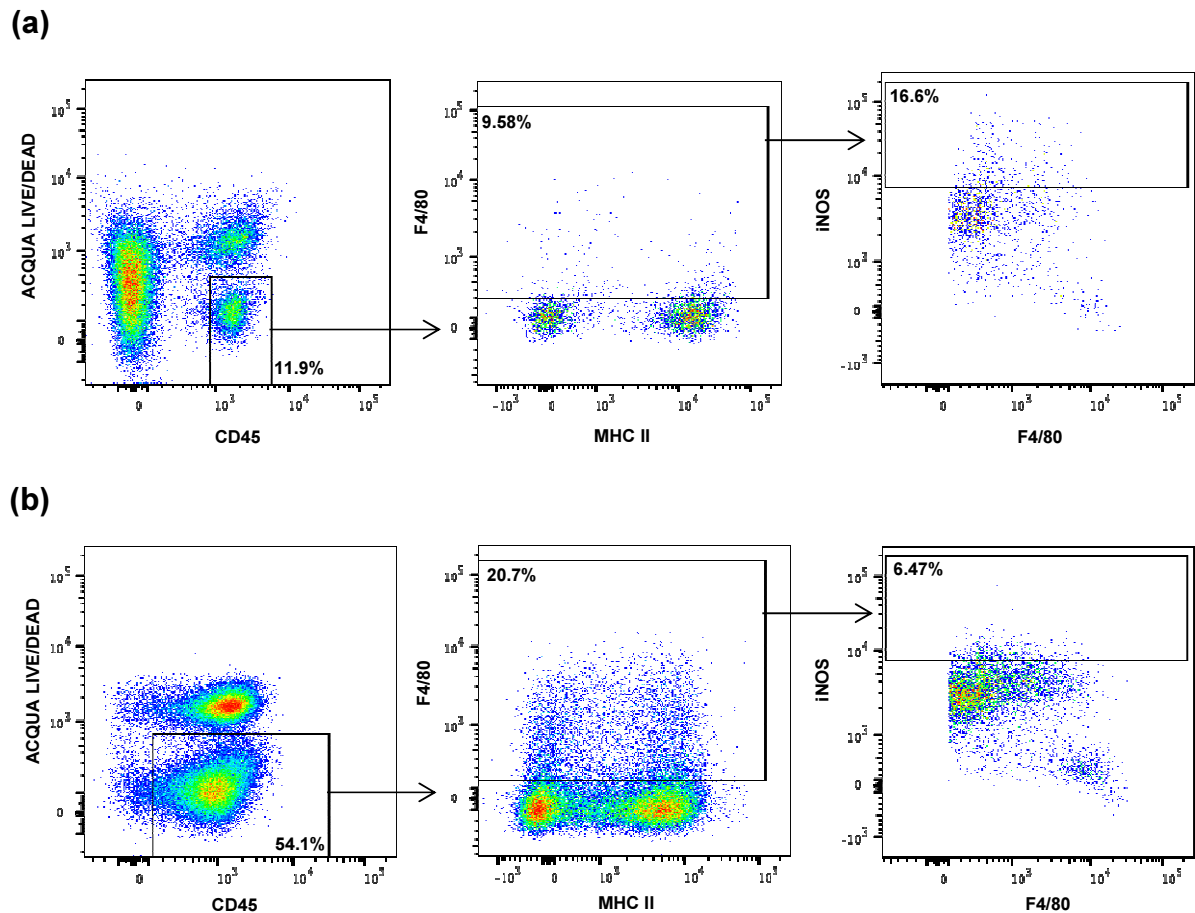


Figura 18. Produção de iNOS por monócitos/macrófagos no gânglio trigêmeo e no baço de camundongos C57BL/6 e TLR2/9^{-/-} infectados com HSV-1. (a) Dot plots representativos mostrando a estratégia de “gate” utilizada para a identificação de iNOS dentro de F4/80⁺ em leucócitos CD45⁺ vivos do GT de um único camundongo WT infectado. (b) Dot plots representativos mostrando a estratégia de “gate” utilizada para a identificação de iNOS dentro de F4/80⁺ em leucócitos CD45⁺ vivos do baço de um único camundongo WT infectado. Foram adquiridos no mínimo 100.000 eventos para as análises.

4.4 Cinética da expressão de IFNs do tipo I no pulmão de animais C57BL/6 e TLR2/9^{-/-} infectados por HSV-1

Em razão de nosso modelo de estudo utilizar a via intranasal de infecção e devido ao fato dos IFNs do tipo I serem geralmente expressos precocemente durante infecções virais, nós decidimos avaliar a expressão destas citocinas nas primeiras horas de infecção. Assim, a expressão dos transcritos de IFN- α 4 e IFN- β foram avaliados nos pulmões de animais WT e TLR2/9^{-/-}, 3 e 24 h após a infecção.

Os camundongos WT apresentaram um aumento nos níveis de mRNA de IFN- β atingindo sua maior expressão 24 h após a infecção, enquanto que neste tempo os animais knockouts exibiram uma forte redução nos níveis de mRNA desta citocina

(Figura 19a). Um padrão similar de expressão foi observado para os transcritos de IFN- α 4 nos pulmões de camundongos WT e TLR2/9^{-/-} infectados (Figura 19b).

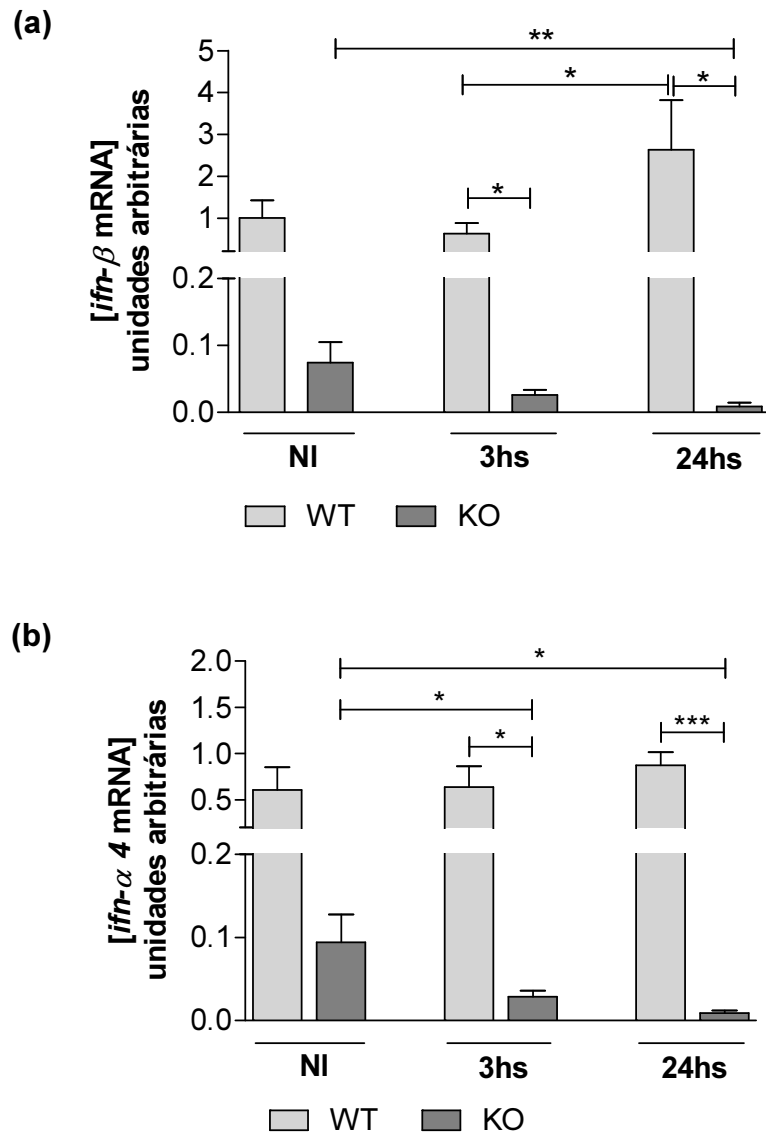


Figura 19. Expressão de IFNs do tipo I no pulmão de camundongos C57BL/6 e TLR2/9^{-/-} infectados com HSV-1. Camundongos C57BL/6 (WT) e TLR2/9^{-/-} foram infectados por via intranasal com 1×10^6 u.f.p. de HSV-1. Os animais controle inalaram apenas PBS. 3 e 24 h após a infecção os animais foram eutanasiados e os tecidos coletados para análise da expressão dos mRNAs por qPCR. (a) Nível de expressão de IFN-β. (b) Nível de expressão de IFN-α4. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias e refletem a proporção de mRNA do gene alvo em relação ao mRNA do gene endógeno (HPRT). Os dados são representativos de dois experimentos independentes com resultados similares. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$. n=7-11 animais/grupo. NI: não infectado. WT: camundongo C57BL/6. KO: camundongo TLR2/9^{-/-}.

4.5 Análise da expressão e produção de citocinas em animais C57BL/6 e TLR2/9^{-/-} infectados por HSV-1

Estudos anteriores do grupo demonstraram haver uma superexpressão dos transcritos de IP-10 e MCP-1 no GT de animais TLR2/9^{-/-} (LIMA et al., 2010). Por se tratarem de moléculas com papel relevante na mediação da resposta imune e, com o intuito de ampliar nosso conhecimento sobre a resposta mediada por elas durante a infecção por HSV-1, decidimos avaliar estas quimiocinas não só em nível de mRNA mas também de proteína. Para tanto, animais C57BL/6 e TLR2/9^{-/-} foram infectados com 1×10^6 u.f.p. de vírus e no 5º dia após a infecção os camundongos foram eutanasiados, os tecidos coletados e processados para posterior análise por Real Time PCR e ensaios de CBA (Cytometric Bead Array, BD Biosciences, EUA).

De maneira geral, a expressão de IP-10 na traqueia e no pulmão foi muito similar entre os grupos estudados (Figura 20a e 20b). Houve aumento significativo na expressão desta citocina nos animais WT e TLR2/9^{-/-} infectados, exceto no pulmão dos animais WT. No entanto, este aumento foi expressivamente maior nos animais knockouts infectados, assim como observado anteriormente no GT. Isto evidencia que esta citocina é também superexpressa nos sítios iniciais de infecção.

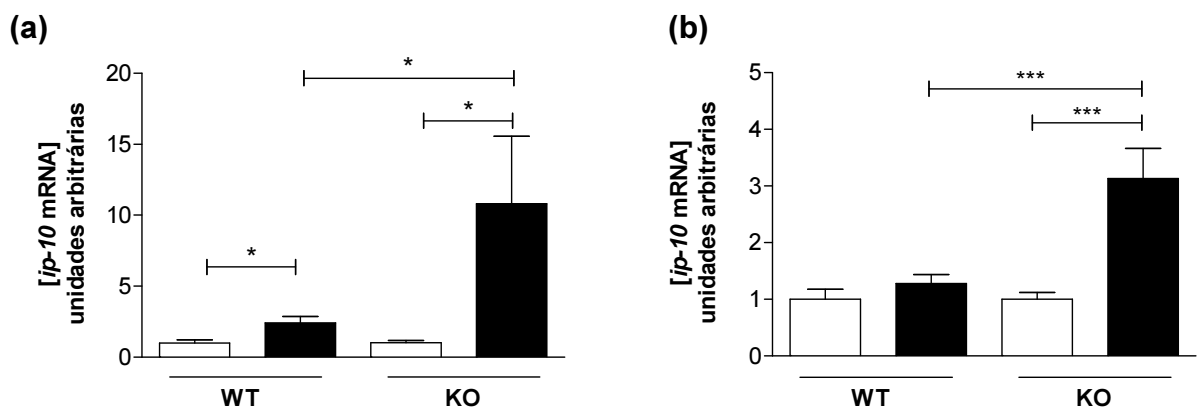


Figura 20. Expressão de IP-10 na traqueia e no pulmão de camundongos C57BL/6 e TLR2/9^{-/-} infectados com HSV-1. Camundongos C57BL/6 (WT) e TLR2/9^{-/-} foram infectados por via intranasal com 1×10^6 u.f.p. de HSV-1. Os animais controle inalaram apenas PBS. No 5º dia após a infecção os animais foram eutanasiados e os tecidos coletados para análise da expressão dos mRNAs por qPCR. (a) Nível de expressão de IP-10 na traqueia. (b) Nível de expressão de IP-10 no pulmão. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias e refletem a proporção de mRNA do gene alvo em relação ao mRNA do gene endógeno (HPRT). Os dados são representativos de dois experimentos independentes com resultados similares. * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$. $n = 11-19$ animais/grupo. Barra branca: animais não infectados. Barra preta: animais infectados. WT: camundongo C57BL/6. KO: camundongo TLR2/9^{-/-}.

Assim como IP-10, os níveis de MCP-1, tanto em nível de mRNA quanto de proteína, mostraram-se elevados no GT, baço, linfonodo cervical, traqueia e pulmão (Figura 21a-d e Figura 22). Conforme observado anteriormente para IP-10, os animais infectados apresentaram um aumento nos níveis de MCP-1 em relação aos seus respectivos controles. No entanto, os níveis dos transcritos de MCP-1 na traqueia, bem como, de sua proteína nos demais tecidos estudados, mostraram-se significativamente maiores nos animais TLR2/9^{-/-} infectados do que nos camundongos WT.

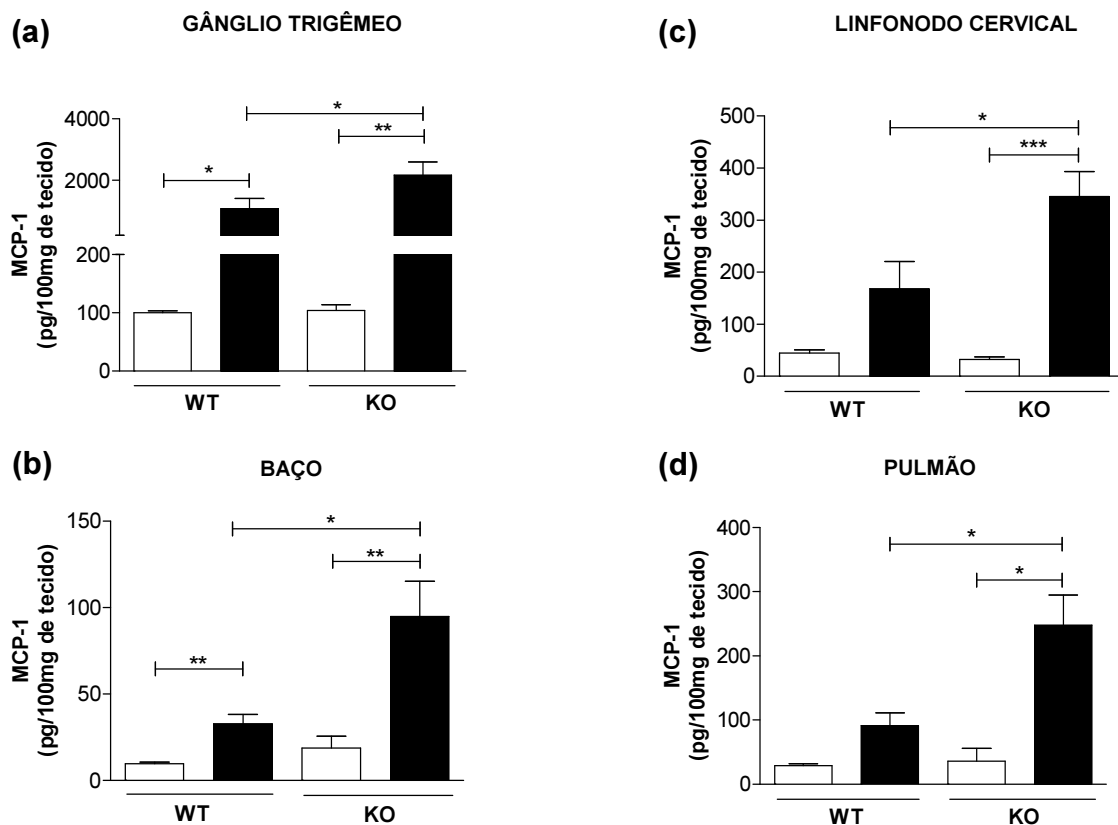


Figura 21. Níveis de produção de MCP-1 em diferentes tecidos de camundongos C57BL/6 e TLR2/9^{-/-} infectados com HSV-1. Camundongos C57BL/6 (WT) e TLR2/9^{-/-} foram infectados por via intranasal com 1×10^6 u.f.p. de HSV-1. Os animais controle inalaram apenas PBS. No 5º dia após a infecção os animais foram eutanasiados e os tecidos coletados para análises posteriores. As análises no GT (a), baço (b), linfonodo cervical (c) e pulmão (d) foram feitas por CBA (*Cytometric Beads Array*). Os dados são representativos de dois experimentos independentes com resultados similares. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$. $n = 11-19$ animais/grupo. Barra branca: animais não infectados. Barra preta: animais infectados. WT: camundongo C57BL/6. KO: camundongo TLR2/9^{-/-}.

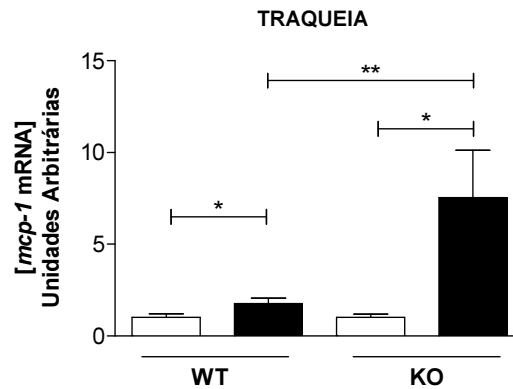


Figura 22. Níveis de expressão de MCP-1 na traqueia de camundongos C57BL/6 e TLR2/9^{-/-} infectados com HSV-1. Camundongos C57BL/6 (WT) e TLR2/9^{-/-} foram infectados por via intranasal com 1×10^6 u.f.p. de HSV-1. Os animais controle inalaram apenas PBS. No 5º dia após a infecção os animais foram eutanasiados e os tecidos coletados para análise da expressão dos mRNAs por qPCR. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias e refletem a proporção de mRNA do gene alvo em relação ao mRNA do gene endógeno (HPRT). Os dados são representativos de dois experimentos independentes com resultados similares. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. $n = 11-19$ animais/grupo. Barra branca: animais não infectados. Barra preta: animais infectados. WT: camundongo C57BL/6. KO: camundongo TLR2/9^{-/-}.

4.6 Análise da expressão e produção de granzima em animais C57BL/6 e TLR2/9^{-/-} infectados por HSV-1

A evidência de Lima e colaboradores (2010) do importante papel das células CD8⁺ no combate a infecção por HSV-1 através da elevada produção de IFN- γ em camundongos C57BL/6 infectados, levou-nos a avaliar a atividade efetora destas células através das análises dos níveis de granzima, importante molécula para estabelecimento da atividade citotóxica. Para tanto, animais C57BL/6 e TLR2/9^{-/-} foram infectados por via intranasal com 1×10^6 u.f.p. de vírus e no 5º dia após a infecção os animais foram eutanasiados e o GT e o baço coletados para análise por qPCR e citometria de fluxo.

Através das análises de PCR em tempo real foi possível verificar que, tanto no GT quanto no baço, os níveis dos transcritos de granzima aumentaram substancialmente após a infecção nos animais WT e TLR2/9^{-/-} (Figura 23a-b). Nos animais knockouts, no entanto, este aumento foi superior ao observado nos animais WT, da mesma forma como foi observado para IP-10 e MCP-1.

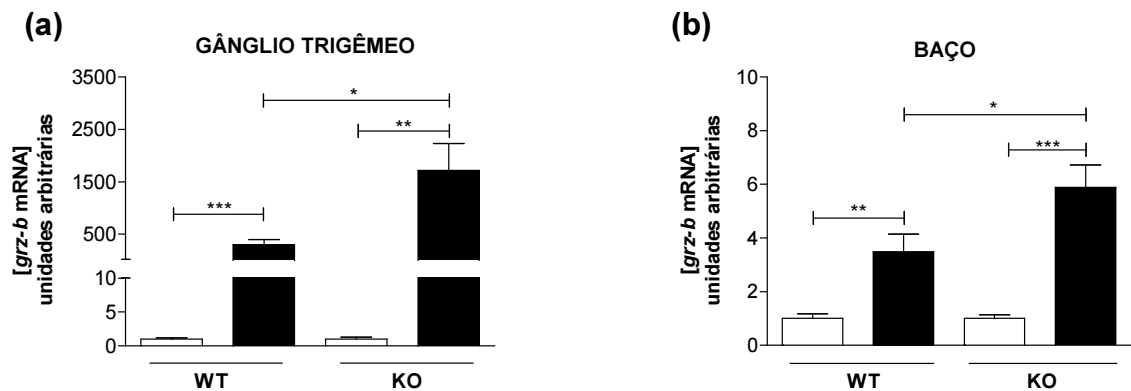


Figura 23. Expressão de granzima no gânglio trigêmeo e no baço de camundongos C57BL/6 e TLR2/9^{-/-} infectados com HSV-1. Camundongos C57BL/6 (WT) e TLR2/9^{-/-} foram infectados por via intranasal com 1×10^6 u.f.p. de HSV-1. Os animais controle inalaram apenas PBS. No 5º dia após a infecção os animais foram eutanasiados e os tecidos coletados para análise da expressão dos mRNAs de granzima B por qPCR. (a) Nível de expressão de granzima B no GT. (b) Nível de expressão de granzima B no baço. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias e refletem a proporção de mRNA do gene alvo em relação ao mRNA do gene endógeno (HPRT). Os dados são representativos de dois experimentos independentes com resultados similares. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$. $n = 9-19$ animais/grupo. Barras brancas: animais não infectados. Barras pretas: animais infectados. WT: camundongo C57BL/6. KO: camundongo TLR2/9^{-/-}.

As análises das populações de leucócitos produtoras de granzima presentes no GT e baço dos camundongos TLR2/9^{-/-} também demonstraram o mesmo aumento observado em nível de mRNA (Figura 24a-b). Este aumento na população de leucócitos GRZ⁺ do GT e baço foi expressivo após a infecção e muito superior ao observado para os animais WT, os quais, todavia, não apresentaram diferença na população de leucócitos produtora de granzima nos tecidos avaliados.

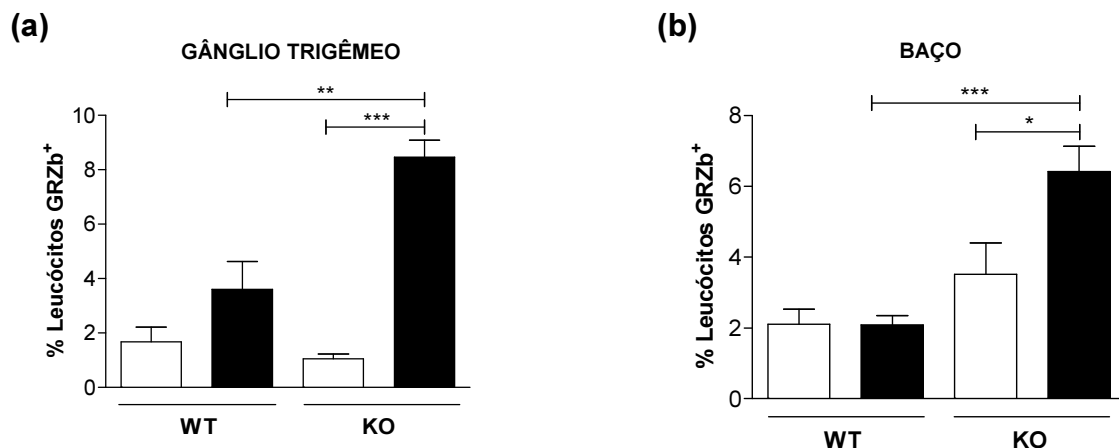


Figura 24. Análise da população de leucócitos produtores de granzima presentes no gânglio trigêmeo e baço de camundongos C57BL/6 e TLR2/9^{-/-} infectados com HSV-1. A análise da população de leucócitos produtores de granzima B presentes no GT e baço de camundongos C57BL/6 (WT) e TLR2/9^{-/-} (KO) foi realizada por citometria de fluxo. Grupos de seis animais por grupo foram infectados por via intranasal com 10⁶ u.f.p. de HSV-1. Os animais controle inalaram apenas PBS. No 5º dia após a infecção, os animais foram eutanasiados e as suspensões de células do GT e baço foram preparadas. (a) Frequência de leucócitos produtores de granzima B (CD45⁺GRZ⁺) analisada dentro da população de células do GT. (b) Frequência de leucócitos produtores de granzima B (CD45⁺GRZ⁺) analisada dentro da população de células do baço. Foram adquiridos no mínimo 100000 eventos para as análises. * p<0.05; ** p<0.01 e *** p<0.001. Barras brancas: animais não infectados. Barras pretas: animais infectados. WT: camundongos C57BL/6. KO: camundongos TLR2/9^{-/-}.

Dentre as subpopulações de células avaliadas, as principais responsáveis pela produção de granzima no GT dos animais WT infectados foram as células NK e CD8⁺ (Figura 25e-g). Células CD4⁺ do GT também produziram granzima, todavia, seus níveis não foram estatisticamente distintos entre os camundongos WT não infectados e infectados (Figura 25c). Já, no baço, a produção de granzima nos animais WT ocorreu de forma distinta apenas por células NK, apesar de ter sido produzida também por outros tipos celulares que, contudo, não apresentaram diferença estatística entre o grupo controle e infectado (Figura 25b,d,f,h). Por outro lado, nos animais knockouts infectados a produção de granzima no GT ocorreu por todos os tipos celulares avaliados (NK T, CD4⁺, NK e CD8⁺), apesar da produção por células CD4⁺ não ter exibido diferença estatística entre os grupos (Figura 25a,c,e,g). No entanto, a única população de células que produziu granzima diferencialmente nos animais TLR2/9^{-/-} infectados em relação aos camundongos WT infectados foi a de células NK T (Figura 25a). No baço, a produção de granzima nos animais knockouts infectados também foi evidenciada em todos os tipos celulares, contudo, nas células NK T esta produção não foi estatisticamente distinta entre os animais

controle e infectados (Figura 25b,d,f,h). Contudo, ao contrário do observado para o GT dos camundongos TLR2/9^{-/-}, todas as populações de células avaliadas produziram níveis superiores de granzima nos animais knockouts infectados em relação aos animais WT infectados (Figura 25a-h). Assim, as análises dos “gates” contendo as células produtoras de granzima confirmaram que as células do GT do camundongos TLR2/9^{-/-} não só apresentaram elevados níveis de mRNA como também produziram mais granzima do que animais WT, o mesmo observado para o baço. Assim, para completar estas análises decidimos também avaliar a produção de perforina nestes animais, uma vez que esta proteína na maioria das vezes é necessária para a entrada de granzima dentro das células alvo.

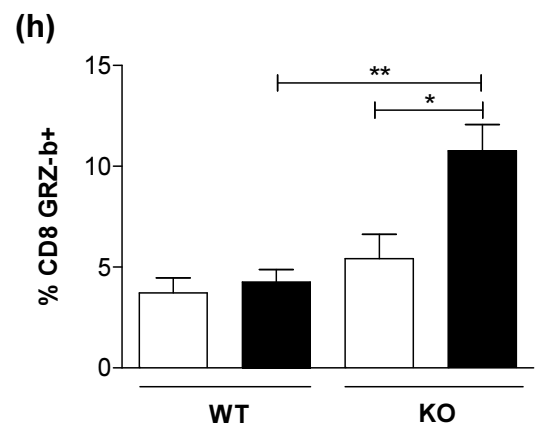
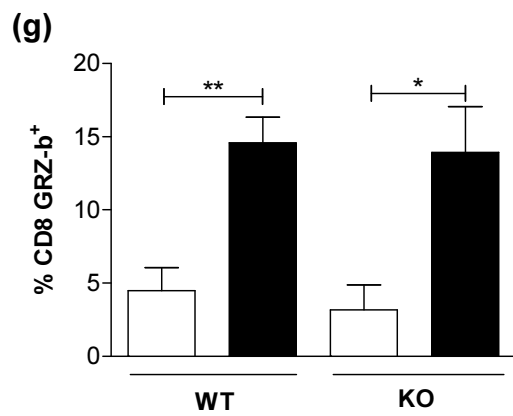
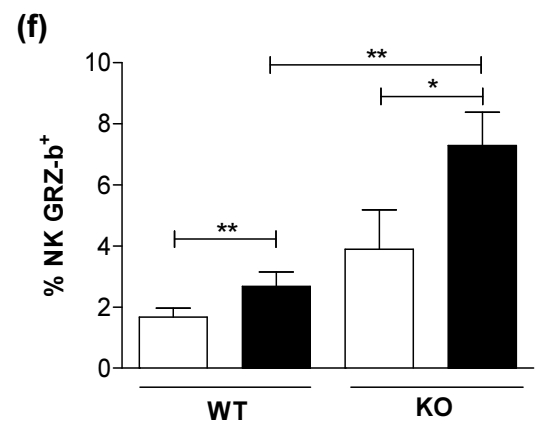
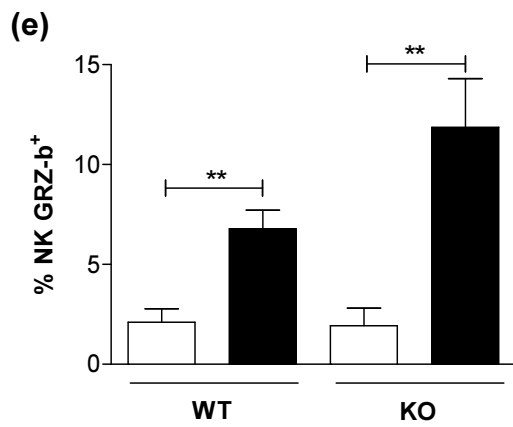
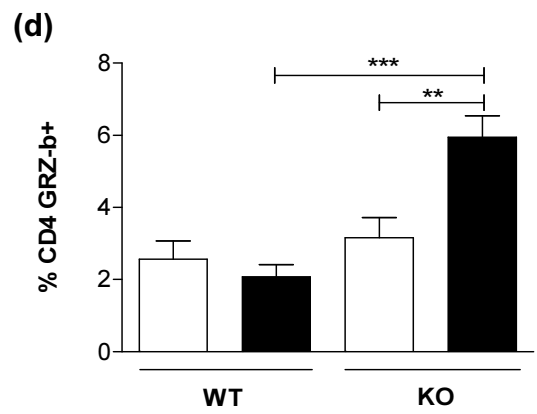
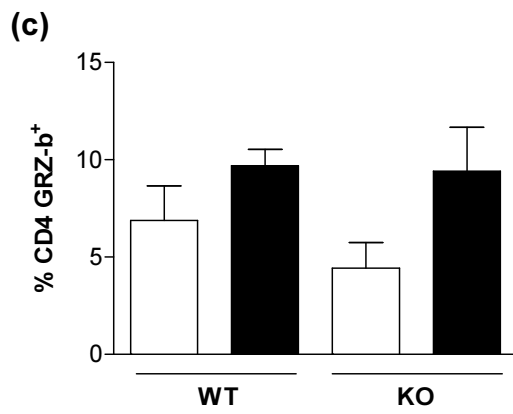
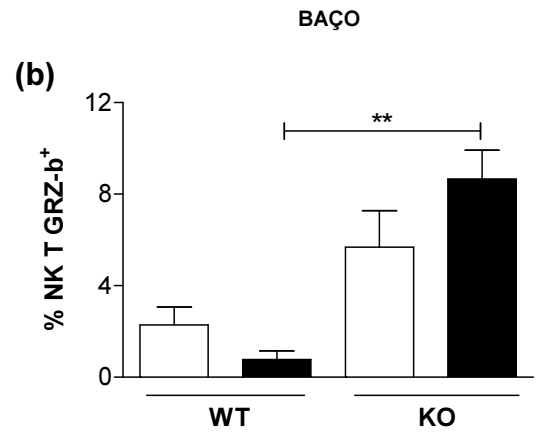
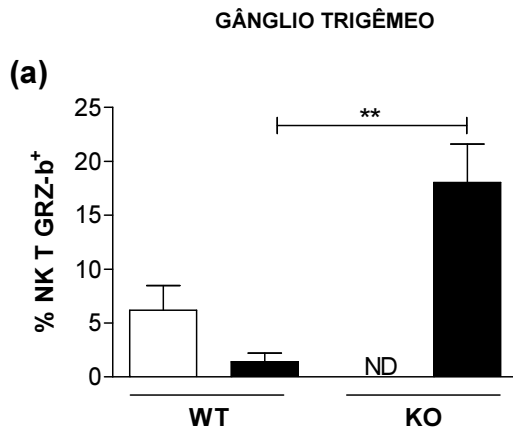


Figura 25. Produção de granzima por diferentes populações de células do gânglio trigêmeo e baço de camundongos C57BL/6 e TLR2/9^{-/-} infectados com HSV-1. Para análise das frequências das populações de células produtoras de granzima B do GT e baço de animais C57BL/6 e TLR2/9^{-/-}, grupos de seis animais foram infectados por via intranasal com 10⁶ u.f.p. de HSV-1. Os animais controle inalaram apenas PBS. No 5º dia após a infecção, os animais foram eutanasiados e a suspensão de células do GT e do baço foram preparadas para análise por citometria de fluxo. Frequência de células NK T (a), CD4⁺ (c), NK (e) e CD8⁺ (g) produtoras de granzima B presentes no GT. Frequência de células NK T (b), CD4⁺ (d), NK (f) e CD8⁺ (h) produtoras de granzima B presentes no baço. A análise da frequência das populações de células produtoras de granzima foi calculada dentro da população de leucócitos vivos. Foram adquiridos no mínimo 100.000 eventos para as análises. * p<0.05; ** p<0.01 e *** p<0.001. Barras brancas: animais não infectados. Barras pretas: animais infectados. WT: camundongos C57BL/6. KO: camundongos TLR2/9^{-/-}.

4.7 Análise da produção de perforina em animais C57BL/6 e TLR2/9^{-/-} infectados por HSV-1

Para análise da produção de perforina por diferentes populações de células do GT e baço, animais C57BL/6 e TLR2/9^{-/-} foram infectados com 1 x 10⁶ u.f.p. de HSV-1. No 5º dia após a infecção os animais foram eutanasiados e os tecidos coletados para análise por citometria de fluxo.

De forma geral, a produção de perforina pelos diferentes tipos celulares (NK T, CD4⁺, NK e CD8⁺) presentes no GT dos animais WT e TLR2/9^{-/-} não foi estatisticamente significativa entre os grupos de camundongos controles e infectados (Figura 26a,c,e,f). No entanto, no baço, as células CD8⁺ dos animais WT e TLR2/9^{-/-} infectados produziram mais perforina que as dos grupos controle (Figura 26d). Esta população de células nos animais knockouts infectados produziram mais perforina do que as dos animais WT infectados (Figura 26d).

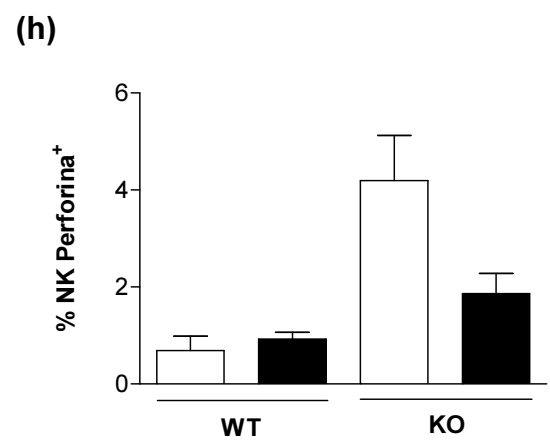
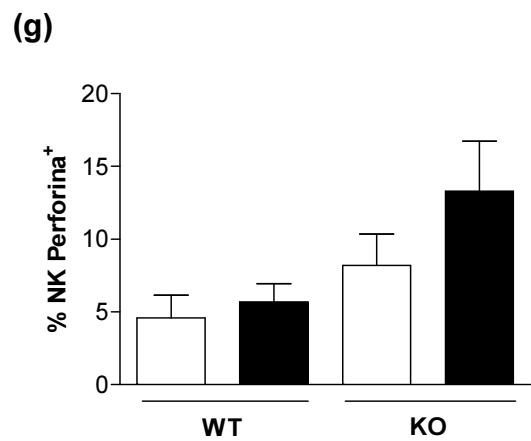
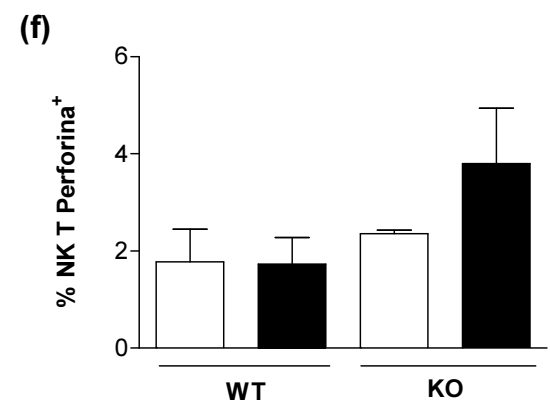
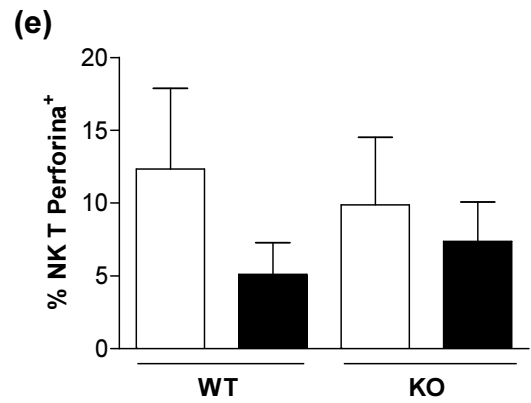
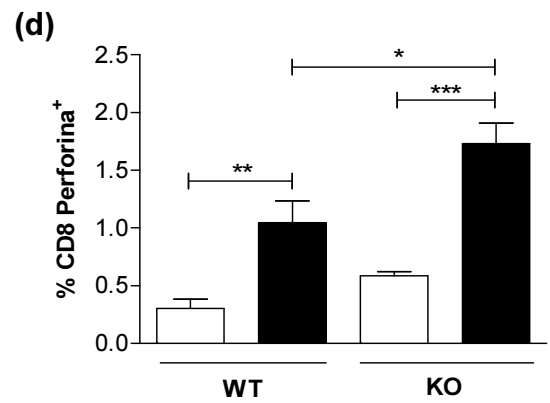
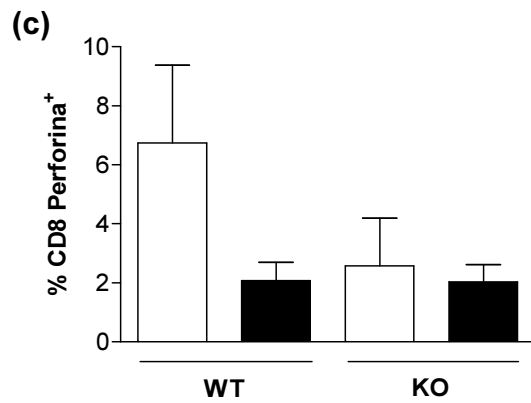
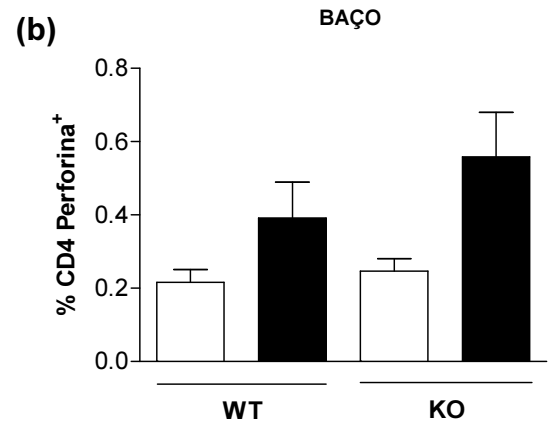
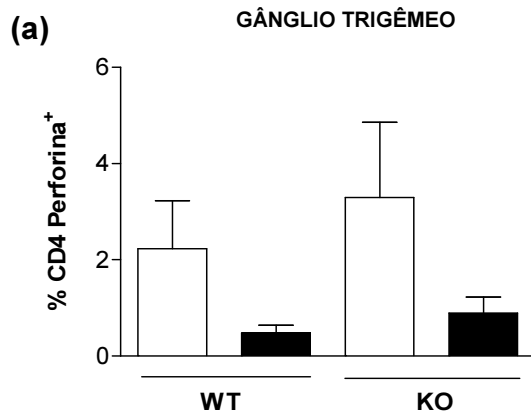


Figura 26. Produção de perforina por diferentes populações de células do gânglio trigêmeo e baço de camundongos C57BL/6 e TLR2/9^{-/-} infectados com HSV-1. Para análise das frequências das populações de células produtoras de perforina do GT e baço de animais C57BL/6 e TLR2/9^{-/-}, grupos de seis animais foram infectados por via intranasal com 10⁶ u.f.p. de HSV-1. Os animais controle inalaram apenas PBS. No 5º dia após a infecção, os animais foram eutanasiados e a suspensão de células do GT e do baço foram preparadas para análise por citometria de fluxo. Frequência de células CD4⁺ (a), CD8⁺ (c), NK T (e) e NK (g) produtoras de perforina presentes no GT. Frequência de células CD4⁺ (b), CD8⁺ (d), NK T (f) e NK (h) produtoras de perforina presentes no baço. A análise da frequência das populações de células produtoras de perforina foi calculada dentro da população de leucócitos vivos. Foram adquiridos no mínimo 100.000 eventos para as análises. * p<0.05; ** p<0.01 e *** p<0.001. Barras brancas: animais não infectados. Barras pretas: animais infectados. WT: camundongos C57BL/6. KO: camundongos TLR2/9^{-/-}.

4.8 Análise da expressão de IL-10 e IL-5 no gânglio trigêmeo de animais C57BL/6 e TLR2/9^{-/-} infectados por HSV-1

Em razão dos camundongos TLR2/9^{-/-} não serem efetivos no combate a infecção por HSV-1 e por produzirem níveis reduzidos de IL-1β e iNOS, moléculas típicas da resposta imune Th1, nós decidimos analisar os níveis de mRNA de IL-10, uma citocina regulatória da resposta imune, e IL-5, um importante componente da resposta imune Th2. Para tanto, animais C57BL/6 e TLR2/9^{-/-} foram infectados por via intranasal. No 5º dia após a infecção os animais foram eutanasiados, os GT coletados e processados para posterior análise por qPCR.

Os camundongos WT infectados apresentaram níveis mais baixos dos transcritos de IL-5 do que os animais WT controle (Figura 27a). Já os níveis de mRNA de IL-10 exibiram um aumento nos camundongos WT infectados em relação aos não infectados (Figura 27b). Os camundongos TLR2/9^{-/-}, por outro lado, demonstraram expressar mais IL-5 e IL-10 após a infecção do que os animais WT infectados, uma vez que os níveis de mRNA destas citocinas são superiores aos níveis observados para os camundongos WT infectados.

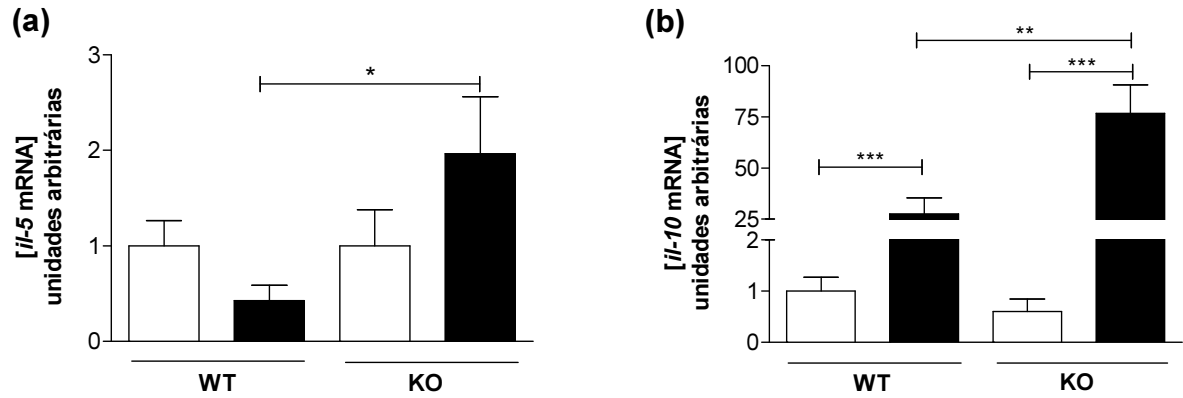


Figura 27. Expressão de IL-5 e IL-10 no gânglio trigêmeo de camundongos C57BL/6 e TLR2/9^{-/-} infectados com HSV-1. Camundongos C57BL/6 (WT) e TLR2/9^{-/-} foram infectados por via intranasal com 1×10^6 u.f.p. de HSV-1. Os animais controle inalaram apenas PBS. No 5º dia após a infecção os animais foram eutanasiados e os tecidos coletados para análise da expressão dos mRNAs de IL-5 e IL-10 por qPCR. (a) Nível de expressão de IL-5 no GT. (b) Nível de expressão de IL-10 no GT. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias e refletem a proporção de mRNA do gene alvo em relação ao mRNA do gene endógeno (HPRT). Os dados são representativos de dois experimentos independentes com resultados similares. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$. $n = 9-19$ animais/grupo. Barra branca: animais não infectados. Barra preta: animais infectados. WT: camundongo C57BL/6. KO: camundongo TLR2/9^{-/-}.

5 DISCUSSÃO

O HSV-1 por ser um agente infeccioso com ampla distribuição mundial e alta prevalência entre a população humana tem sido objeto de estudo de muitos trabalhos (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013). Além disso, tem recebido elevada atenção uma vez que, em indivíduos neonatos e imunocomprometidos, causa sérios danos oftalmológicos e neurológicos, resultando em cegueira, encefalite ou até mesmo a morte (ARDUINO; PORTER, 2008). Dentre os estudos que vêm sendo desenvolvidos, muitos buscam compreender os mecanismos envolvidos na resposta imune e, adicionalmente, procuram identificar os principais componentes responsáveis por mediar esta resposta frente à infecção por este herpesvirus (ANDERSEN et al., 2015; CASROUGE et al., 2006; CHUCAIR-ELLIOTTA et al., 2014; CONRADY et al., 2012; LEGER; HENDRICKS, 2011; MANSUR et al., 2005; SANCHO-SHIMIZU et al., 2011). Alguns destes trabalhos, por exemplo, têm destacado o papel crucial da resposta imune inata na defesa do hospedeiro durante a infecção por HSV-1, principalmente através dos TLRs (CHEW; TAYLOR; MOSSMAN, 2009; HOCHREIN et al., 2004; KRUG et al., 2004; KURT-JONES et al., 2004; LIM et al., 2014; LIMA et al., 2010; PALUDAN et al., 2011; WANG et al., 2012; ZHANG et al., 2007; ZOLINI et al., 2014). Dados do nosso grupo, bem como de outros estudos, evidenciaram o importante papel que o TLR2 e o TLR9 desempenham no reconhecimento do patógeno, bem como, na ativação da resposta imune contra a infecção por HSV-1 e, sugerem uma ação conjunta destes receptores para o estabelecimento de uma resposta efetiva (LIMA et al., 2010; SATO; LINEHAN; IWASAKI, 2006; SØRENSEN et al., 2008; ZOLINI et al., 2014). Em modelos murinos, a ação conjunta destes TLRs é necessária para a sobrevivência dos camundongos uma vez que animais TLR2/9^{-/-} sucumbem 100% à infecção, enquanto que animais TLR2^{-/-} (e animais WT) e TLR9^{-/-} têm uma taxa de mortalidade de 10% e 60%, respectivamente (LIMA et al., 2010). Segundo Lima e colaboradores (2010), a ativação destes TLRs no GT resulta no controle da infecção e, assim, impede que o vírus migre para o cérebro e cause encefalite. Este controle ocorre, sobretudo, com a ativação da molécula adaptadora MyD88 que, neste contexto, resulta na expressão de vários mediadores da resposta imune como IFN- γ e iNOS (LIMA et al., 2010; MANSUR et al., 2005; ZOLINI et al., 2014). Diante do exposto, dando continuidade aos estudos do nosso grupo, este trabalho procurou

ampliar o conhecimento que se tem a respeito da resposta imune desencadeada por HSV-1 buscando identificar células e moléculas do sistema imune resultantes de sua ativação, essenciais para obter uma resposta efetiva contra este patógeno.

Neste trabalho, nós demonstramos que as populações de monócitos/macrófagos e células dendríticas aumentam no GT dos animais WT após a infecção, diferentemente dos animais TLR2/9^{-/-} (Figura 11). Estas células são importantes componentes da imunidade inata uma vez que elas desempenham papel crucial na ativação da resposta imune mediada por células e também na produção de importantes mediadores imunológicos (IWASAKI; MEDZHITOV, 2015; MILDNER; JUNG, 2014; MURRAY; WYNN, 2011). Durante infecções primárias por HSV-1 elas agem limitando a replicação viral e mantendo o estado de latência, mas também, ativando a resposta imune adaptativa (EGAN et al., 2013). Os macrófagos são especialmente importantes para a fagocitose de células infectadas ou em processo de apoptose e, também, na liberação de citocinas pró-inflamatórias, bem como, de outros mediadores imunes como o óxido nítrico (ELLERMANN-ERIKSEN, 2005; KODUKULA et al., 1999). As células dendríticas, por outro lado, são cruciais para a apresentação de antígenos e, assim, ativar a resposta imune adaptativa, como já foi descrito anteriormente em outros trabalhos (DONAGHY et al., 2009; MOTT; GHIASI, 2008; YONEYAMA et al., 2005).

Adicionalmente, nós evidenciamos que a população de DCs presentes no GT de camundongos C57BL/6 não só aumentou numericamente após a infecção, como também foi a principal produtora de IL-1 β nestes animais, ao contrário do observado para os animais TLR2/9^{-/-} (Figura 14a e 15a). A produção de IL-1 β que, ocorreu exclusivamente no GT (Figura 14a e b), além de corroborar dados anteriores, os quais demonstraram um aumento em nível de mRNA dos transcritos desta citocina no GT destes animais (LIMA et al., 2010), mostra que este aumento também ocorre em nível de proteína. Desta forma, estes dados sugerem que, neste contexto, a produção de IL-1 β não sofre modificações e/ou interferências do vírus em seu processo de tradução. Isto é importante, uma vez que o HSV-1 é um patógeno com elevada complexidade e inúmeros mecanismos de evasão celular, através dos quais pode agir em diferentes etapas do ciclo celular, inclusive, inibindo o processo de tradução e maturação de proteínas do hospedeiro (MELCHJORSEN; MATIKAINEN; PALUDAN, 2009; SU; ZHAN; ZHENG, 2016; SUAZO et al., 2015). Neste sentido, a

produção de IL-1 β durante a infecção por HSV-1 pode ser um dos fatores chave para o controle da infecção e sobrevivência dos animais WT uma vez que, esta citocina apresenta amplas funções biológicas, dentre elas a de iniciar os processos inflamatórios após uma infecção (DINARELLO, 2009; GARLANDA; DINARELLO; MANTOVANI, 2013; SHAFTEL; GRIFFIN; O'BANION, 2008). De fato a importância de IL-1 β durante infecções por HSV-1 foi evidenciada em trabalhos anteriores. Estes trabalhos revelaram que a deficiência em IL-1 β é letal para os camundongos e que, além disso, esta citocina tem um importante papel no reparo dos danos patológicos do sistema nervoso central, em decorrência da infecção por HSV-1 (MASON et al., 2001; SERGERIE; RIVEST; BOIVIN, 2007). Desta forma, os reduzidos níveis de IL-1 β nos camundongos TLR2/9 $^{-/-}$, pode ser um dos fatores responsáveis pela alta mortalidade destes animais (LIMA et al., 2010).

O trabalho anterior de Zolini e colaboradores (2014) além de ter evidenciado a interdependência dos TLRs mostrou também que, os macrófagos são os produtores de iNOS no GT. Deste modo, buscando identificar outros tipos celulares importantes para a mediação desta resposta, nós observamos que dentre os tipos celulares avaliados, os monócitos/macrófagos foram, quantitativamente, as principais células produtoras de iNOS no GT dos animais WT (Figura 17 e 18). Esta molécula é uma enzima cuja atividade resulta na produção de óxido nítrico (NO), um radical livre que desempenha várias funções fisiológicas importantes, especialmente na defesa do hospedeiro contra infecções (BOGDAN, 2001; BOGDAN; RÖLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2000). Nas infecções por HSV-1, especificamente, alguns estudos têm destacado o importante papel desta enzima na defesa do hospedeiro. Estes trabalhos mostram que animais deficientes para esta molécula são mais susceptíveis à infecção e, além disso, evidenciam que sua produção por macrófagos é essencial para o controle da infecção, corroborando nossos resultados (ELLERMANN-ERIKSEN, 2005; GAMBA et al., 2004; KODUKULA et al., 1999; MACLEAN et al., 1998; ZOLINI et al., 2014). Assim, nossos dados evidenciam que a produção de IL-1 β e iNOS são essenciais para a mediação da resposta contra HSV-1 em nível local (no GT) e não sistêmico (no baço). Além disso, indicam que estas moléculas são dependentes de TLR2 e TLR9, uma vez que elas são produzidas em níveis muito baixos em animais TLR2/9 $^{-/-}$ (Figura 14a e 16a), o que resulta na morte

destes camundongos após a infecção, diferentemente dos animais WT (LIMA et al., 2010).

Os IFNs do tipo I (IFN- α e IFN- β) também são expressos no pulmão dos camundongos WT em níveis superiores aos observados para os animais TLR2/9^{-/-}, horas após a infecção (Figura 19). No entanto, Lima e colaboradores (2010) observou um aumento expressivo de IFN- β no GT tanto de animais WT quanto de animais TLR2/9^{-/-}, 5 dias após a infecção. Os distintos níveis de expressão nestes tecidos, possivelmente têm relação com os tipos de células presentes nestes órgãos, bem como, com o tempo no qual as expressões foram avaliadas. Desta forma, nestes contextos, estas células podem responder de diferentes maneiras à infecção por HSV-1, uma vez que a atividade antiviral dos IFNs do tipo I é ativada não só pelos TLRs mas também por distintos receptores celulares, como os receptores citosólicos RIG-I e MDA5 (CROUSE; KALINKE; OXENIUS, 2015; MCNAB et al., 2015; SORGELOOS et al., 2013; STETSON; MEDZHITOV, 2006; UEMATSU; AKIRA, 2007). Isto também explica os reduzidos níveis dos transcritos dos IFNs do tipo I no pulmão dos camundongos KOs, os quais parecem depender do TLR2 e TLR9 para serem expressos. Neste caso, a via de sinalização dos TLRs, no pulmão, parece ser essencial para a expressão destas citocinas, ao contrário do GT, que expressa estas moléculas de maneira independente de TLR2 e de TLR9. Esta relação de dependência e interdependência dos TLRs foi também observada por Hocherein et al. (2004) e Wang et al. (2012) e parece, de fato, ter relação com o tipo celular ativado. Contudo, independente da via de sinalização ativada, vale ressaltar que estas citocinas desempenham um papel essencial na resposta imune do hospedeiro nas infecções por HSV-1 através de suas atividades antivirais, restringindo a infecção viral, e também moldando a resposta imune adaptativa, como foi demonstrado anteriormente em outros estudos (EGAN et al., 2013; LOW-CALLE; PRADA-ARISMENDY; CASTELLANOS, 2014; ROSATO; LEIB, 2015; STEINER; BENNINGER, 2013; WANG et al., 2012).

Esta regulação negativa dos níveis de IL-1 β e iNOS em camundongos TLR2/9^{-/-} infectados ocorreu, simultaneamente, com a superexpressão de outras moléculas da resposta imune, como as quimiocinas MCP-1 e IP-10, além da granzima B (Figura 20-24). IP-10 e MCP-1 são citocinas quimiotáticas cruciais para o recrutamento de

leucócitos para o sítio de infecção. MCP-1 é conhecida por atrair, principalmente monócitos inflamatórios. Já IP-10, faz a mediação do recrutamento de células Th1, CD8 e NK (GRIFFITH; SOKOL; LUSTER, 2014; HOSKING; LANE, 2010; WUEST; CARR, 2008b). Neste contexto de infecção, estas quimiocinas parecem não depender de TLR2 e TLR9 para serem expressas e/ou produzidas, o que corrobora os dados evidenciados por Lima e colaboradores (2010). Por outro lado, pode ser que dependam destes receptores para que suas atividades sejam reguladas, uma vez que seus níveis encontram-se altamente elevados nos animais knockouts infectados (Figura 20-22). É evidente que, embora estas quimiocinas sejam necessárias para uma resposta imunitária adequada contra o HSV-1 (WUEST et al., 2011; WUEST; CARR, 2008b), em alguns casos, estas moléculas iniciam uma resposta inflamatória intensa que pode prejudicar significativamente o hospedeiro, como já foi descrito por Carr et al. (2003) e outros (KURT-JONES et al., 2004; MARQUES et al., 2006). Assim, nos animais WT o recrutamento de células imunologicamente eficientes (monócitos/macrófagos, linfócitos, DC), produtoras de NO, IL-1 β e IFN- γ , principalmente, resulta em uma resposta efetiva contra o vírus que restringe a multiplicação viral e, assim, controla a infecção. Contudo, nos animais knockouts, embora as células sejam também recrutadas, elas não expressam os receptores TLR2 e TLR9, tendo suas funções efetoras prejudicadas, o que leva a uma resposta imune ineficiente, gerando um forte processo inflamatório não efetivo.

Visto que estudos anteriores do grupo demonstraram, em camundongos WT, a importância das células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ durante infecção por HSV-1 (LIMA et al., 2010), nós decidimos avaliar o papel das granzimas e perforinas, bem como, identificar suas principais células produtoras. As granzimas (serino proteases) e as perforinas (proteínas formadora de poros) são, notadamente, importantes componentes da resposta imunológica visto que elas conferem atividade citotóxica às células NK e linfócitos T CD8⁺ (ANDERSEN et al., 2015; IDA et al., 2005; SALTI et al., 2011; VOSKOBOINIK et al., 2010). Quando liberadas no interior de células infectadas, causam fragmentação do DNA e perda da integridade da membrana, levando a célula à apoptose e, conseqüentemente, a eliminação do vírus (TRAPANI; SMYTH, 2002; WAGNER et al., 2004). Neste estudo, os transcritos da granzima B tanto no GT quanto no baço de animais WT foram superexpressos após a infecção,

em comparação aos animais controle (Figura 23). A elevada expressão desta molécula foi também evidenciada nos animais KO infectados sendo, inclusive, superior à observada nos animais WT. Desta forma, nas condições avaliadas, a expressão da granzima B parece ser necessária para a mediação da resposta imune tanto no GT quanto no baço dos animais WT durante a infecção por HSV-1. Contudo, nos animais KO infectados, a superexpressão de granzima B juntamente com a baixa produção de IL-1 β e iNOS mostram não serem suficientes para o controle da infecção, o que resulta na morte destes animais (LIMA et al., 2010). Dentre os tipos celulares avaliados, as células NK e T CD8⁺ foram as principais células produtoras de granzima B no GT dos animais WT infectados, enquanto que no baço apenas as células NK apresentaram uma produção estatisticamente distinta em relação aos animais não infectados (Figura 25e-g). Por outro lado, nos camundongos KO grandes quantidades de granzima B foram produzidas por células NK T, NK e CD8⁺ no GT após a infecção (Figura 25a, e, g), enquanto que no baço todos os tipos celulares avaliados produziram esta protease em maior quantidade, quando comparados aos animais WT infectados (Figura 25b, d, f, h). Desta forma, acreditamos que a granzima B nos animais WT infectados esteja mediando a atividade citotóxica, bem como, regulando a resposta imune e interferindo na reativação do vírus no GT, como já foi descrito anteriormente em outros estudos (GRUBOR-BAUK; ARTHUR; MAYRHOFER, 2008; KNICKELBEIN et al., 2008; PEREIRA; SIMON; SIMMONS, 2000; SALTI et al., 2011). Nos camundongos KO, diferentemente, parece que esta superexpressão de granzima B contribui para uma resposta imune exacerbada e patogênese da infecção, o que resulta na morte dos camundongos (HIEBERT; GRANVILLE, 2012; LIMA et al., 2010).

No entanto, ao contrário da granzima B, observamos que a regulação da perforina ocorre de forma distinta, uma vez que no GT de camundongos WT não infectados, os tipos celulares avaliados já apresentavam uma consistente produção basal desta molécula (Figura 26a, c, e, g). Isto também foi observado no GT dos animais KO. No entanto, no baço, a perforina foi produzida diferencialmente por células T CD8⁺ após a infecção, tanto em camundongos WT quanto KO (Figura 26d). Desta forma, no GT de animais WT, os níveis basais de perforina parecem serem suficientes na mediação de sua atividade citotóxica (KAWAMURA et al., 2006; MATLOUBIAN et al., 1999; TRAPANI; SMYTH, 2002). No entanto, visto que a

liberação de granzima no interior das células alvo pode ocorrer de maneira perforina-independente, elevados níveis de perforina não seriam necessários para mediar esta resposta (KOGO et al., 2006; MOTYKA et al., 2000; TRAPANI; SMYTH, 2002). Assim, é possível que no GT a atividade citotóxica seja mediada por um mecanismo que não dependa de perforina, enquanto que as células CD8⁺ produtoras de perforina observadas no baço respondem por uma via dependente de perforina, no entanto, agindo em outros tecidos que não o GT.

Outra importante constatação foi da superexpressão dos transcritos de IL-10 em resposta à infecção por HSV-1 no GT de camundongos WT e KO, nitidamente superior nos animais TLR2/9^{-/-} (Figura 27b). Esta molécula é uma citocina com importantes propriedades anti-inflamatórias que, no contexto de infecção estudado, parece não depender dos TLR2 e 9 para ser expressa ou que, talvez, dependa destes receptores para ser regulada negativamente. Além disso, é uma citocina que atua inibindo a atividade de alguns tipos celulares e, também, controlando os níveis de citocinas pró-inflamatórias. Assim, tem sido evidenciado que IL-10 é essencial para a supressão de respostas inflamatórias exacerbadas, bem como, em prevenir danos teciduais (MOORE et al., 2001; O'GARRA; VIEIRA, 2007; OUYANG et al., 2011). Em infecções por HSV-1, foi anteriormente demonstrado que IL-10 age controlando a produção de mediadores imunológicos por células da micróglia, bem como, a imunopatologia da córnea em casos de ceratite estromal (MARQUES et al., 2004; SARANGI et al., 2008; TUMPEY et al., 1994). Assim, acreditamos que expressão de IL-10 em altos níveis no GT de animais KO seja uma tentativa de controle da resposta imune exacerbada desencadeada pelos altos níveis de MCP-1, IP-10 e granzima B, enquanto que, nos animais WT sua expressão é suficiente para controlar a resposta imune ativada pelo vírus.

Curiosamente, um aumento na expressão dos transcritos de IL-5 foi também observado no GT dos animais KO infectados, sendo superior ao observado para os animais WT (Figura 27a). Esta citocina é um importante componente da resposta imune do tipo Th2, conhecida por agir principalmente em resposta à parasitas extracelulares e alérgenos, mas também, por manter a homeostase metabólica e reparar tecidos (IVANOVA; OREKHOV, 2015; ZHOU; CHONG; LITTMAN, 2009). As respostas do tipo Th2 são conhecidas por apresentarem um papel regulatório, limitando as respostas do tipo Th1, bem como, a extensão dos seus danos (WYNN,

2015). A IL-5, produzida principalmente por células T helper do tipo Th2 e mastócitos, age induzindo a diferenciação de células B em células produtoras de anticorpos, bem como, estimulando a proliferação e diferenciação de eosinófilos (KOURO; TAKATSU, 2009; MOON et al., 2004). No entanto, a produção desta citocina pode também gerar danos teciduais principalmente através da atividade excessiva dos eosinófilos (LEE et al., 2010; TANAKA et al., 2004). Além disso, neste contexto, os altos níveis de IL-5 no GT dos animais TLR2/9^{-/-} podem contribuir para uma resposta imune do tipo Th2, inadequada para o combate a microrganismos intracelulares, como são os vírus (WAN; FLAVELL, 2009).

Assim, os dados aqui apresentados nos permitem inferir que a ausência dos receptores TLR2 e TLR9 compromete fortemente a resposta imunológica no combate a infecção por HSV-1, uma vez que as células imunes não são imunologicamente efetivas no controle deste patógeno. Assim, o organismo parece compensar esta resposta, com o aumento expressivo de MCP-1 e IP-10, atraindo assim mais células para o local da infecção. A atividade destas quimiocinas resulta, então, em um aumento considerável de células no GT (principalmente células CD4⁺ e CD8⁺). Isto explicaria os elevados níveis de IL-10, IL-5 e granzima B no GT dos animais knockouts. No caso, com IL-10 tentando regular a exacerbação da resposta e IL-5 tentando compensar a resposta Th1 comprometida. No entanto, este mix de respostas Th1/Th2 nestes animais não é efetivo para o controle da infecção. Assim, esta exacerbada resposta resulta em um processo inflamatório intenso que permite o acesso das partículas virais ao cérebro resultando em encefalite e, consequentemente, morte destes animais.

6 CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados não só confirmam o importante papel dos receptores TLR2 e TLR9 na defesa do hospedeiro contra o HSV-1 como também evidenciam importantes moléculas (como IL-1 β , iNOS, Granzima B e IFNs do tipo I) e células (como macrófagos, linfócitos T CD8⁺, células dendríticas e NK) para a mediação da resposta imune contra este patógeno. Assim, neste estudo, destacamos o importante papel das células dendríticas e monócitos/macrófagos na produção de IL-1 β e iNOS, respectivamente, bem como comprovamos o papel chave da resposta imune em nível local, no GT, para o controle da infecção. Além disso, demonstramos que a resposta de IFNs do tipo I nas primeiras horas após a infecção e, o aumento nos níveis de MCP-1 e IP-10, quando não exacerbados, são importantes para a resposta contra o HSV-1. Finalmente, evidenciamos o importante papel das células NK e CD8⁺ na produção de granzima B, assim como, demonstramos que a expressão de IL-10 é importante durante a infecção pelo HSV-1.

Estes resultados nos fornecem informações importantes para a compreensão da resposta imune desencadeada pelo HSV-1 no GT de animais WT e TLR2/9^{-/-}. Por esta razão, propomos um modelo atual que explique como ocorre a resposta imunológica no GT destes animais quando infectados com HSV-1 (Figura 28).

Nos animais WT, os PAMPs do vírus são reconhecidos pelos receptores TLR2 e TLR9 das células presentes no GT. O reconhecimento do HSV-1 resulta na secreção de quimiocinas (IP-10 e MCP-1), as quais recrutam macrófagos e células dendríticas para o local da infecção. Neste momento, há também a expressão de IFN- β , importante na mediação da resposta antiviral (impedindo a replicação do vírus), de IL-1 β , citocina crucial para a resposta inflamatória (auxilia na eliminação do vírus, através da ativação do complemento e da fagocitose) e de iNOS, molécula importante para o estabelecimento da atividade citotóxica de macrófagos. Em meio a estas respostas, as células recrutadas para o sítio de infecção passam a produzir também IL-12 em maior quantidade o que estimula um aumento na expressão e produção de um potente imunoregulador, o IFN- γ . A ação conjunta destas citocinas, desta forma, estimula a ativação da atividade efetora das células e o estabelecimento de uma resposta imune direcionada para Th1 (conhecida por

mediar respostas contra microrganismos intracelulares). Neste contexto, células NK e linfócitos T CD8⁺ têm sua atividade citotóxica ativada e, assim, passam a produzir granzima B em maior quantidade. A citocina IL-10 também tem seus níveis aumentados após a infecção e, neste caso, atua inibindo a atividade de alguns tipos celulares e controlando os níveis de citocinas pró-inflamatórias, para que as respostas em combate ao vírus não saiam do controle e causem danos ao hospedeiro. Assim, no GT de animais WT, a ação de todos estes elementos em resposta ao HSV-1 resulta no controle da infecção, impede que o vírus migre para o cérebro e, por esta razão, os animais sobrevivem.

Já nos animais TLR2/9^{-/-}, os PAMPs do vírus também são reconhecidos pelas células presentes no GT, mas não através de TLR2 e TLR9. Assim, após o reconhecimento das partículas virais, estas células passam a produzir quimiocinas (IP-10 e MCP-1), recrutando macrófagos e células dendríticas para o sítio de infecção. No entanto, estas células não são imunologicamente eficientes, uma vez que não expressam os receptores TLR2 e TLR9. Por esta razão, estas células passam a produzir reduzidos níveis de IL-1 β , iNOS e IL-12. O comprometimento dos níveis de IL-12 resulta na baixa expressão e produção de IFN- γ . Desta forma, na ausência ou insuficiência de fatores que direcionem a resposta imune para Th1 (IL-12 e IFN- γ), adequada para este tipo de patógeno, as células recrutadas para o sítio de infecção passam então a expressar IL-5 (típica de respostas Th2). Isto leva ao comprometimento do processo de apresentação de antígenos bem como de ativação da atividade efetora das células. Apesar disso, alguns tipos celulares respondem ainda à infecção expressando e/ou produzindo IFN- β (provavelmente porque são produtos da ativação de outros receptores) e granzima B, no entanto, estas respostas não são suficientes para resolver a infecção. Assim, as células passam a secretar mais quimiocinas recrutando mais células para o local da infecção. Este descontrole na resposta imune leva a uma alta expressão de IL-10, mas esta não é suficiente para diminuir a resposta inflamatória. A exacerbação e ineficiência destas respostas resultam em um processo inflamatório intenso e, assim, permitem que as partículas virais tenham acesso ao cérebro, causem encefalite e posterior morte destes animais.

GÂNGLIO TRIGÊMEO

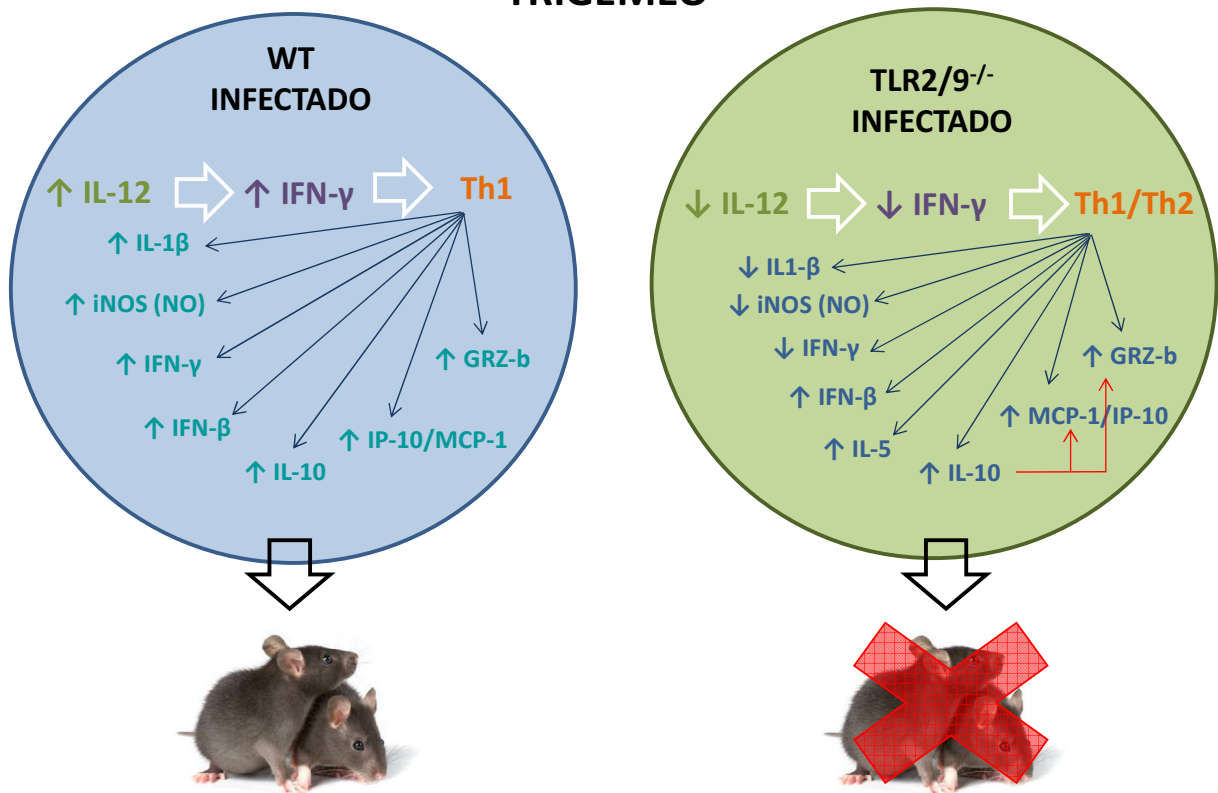


Figura 28. Modelo de resposta imunológica à infecções por HSV-1 que ocorre no gânglio trigêmeo de camundongos C57BL/6 e TLR2/9^{-/-}.

REFERÊNCIAS

- AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 7, p. 499–511, 2004.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783–801, 2006.
- ANDERSEN, L. L. et al. Functional IRF3 deficiency in a patient with herpes simplex encephalitis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 212, n. 9, p. 1371–9, 2015.
- ARDUINO, P. G.; PORTER, S. R. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 37, n. 2, p. 107–21, 2008.
- ASSELIN-PATUREL, C.; TRINCHIERI, G. Production of type I interferons: plasmacytoid dendritic cells and beyond. **Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 4, p. 461–465, 2005.
- BAINES, J. D. Herpes simplex virus capsid assembly and DNA packaging : a present and future antiviral drug target. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 12, p. 606–613, 2011.
- BEDOUI, S.; GREYER, M. The role of dendritic cells in immunity against primary herpes simplex virus infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1–9, 2014.
- BELKAID, Y.; TARBELL, K. Regulatory T Cells in the Control of Host-Microorganism Interactions. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 551–89, 2009.
- BIRON, C. A.; BROSSAY, L. NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. **Current Opinion in Immunology**, v. 13, p. 458–464, 2001.
- BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunology**, v. 2, n. 10, p. 907–16, 2001.
- BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunological Reviews**, v. 173, n. 1, p. 17–26, 2000.
- BOIVIN, N. et al. Impact of deficiency in CCR2 and CX3CR1 receptors on monocytes trafficking in herpes simplex virus encephalitis. **Journal of General Virology**, v. 93, p. 1294–1304, 2012.
- BOSNJAK, L. et al. Contact-Dependent Interference with Invariant NKT Cell Activation by Herpes Simplex Virus-Infected Cells. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 12, p. 6216–24, 2012.
- BROBERG, E. K.; HUKKANEN, V. Immune response to herpes simplex virus and γ134. 5 deleted HSV vectors. **Current Gene Therapy**, v. 5, n. 5, p. 523–530, 2005.
- BRUBAKER, S. W. et al. Innate Immune Pattern Recognition : A Cell Biological Perspective. **Annual Review of Immunology**, v. 33, p. 257–290, 2015.

CAMPADELLI-FIUME, G. et al. Viral and cellular contributions to HSV entry into the cell. **Current Opinion in Virology**, v. 2, n. 1, p. 28–36, 2012.

CANTIN, E.; TANAMACHI, B.; OPENSHAW, H. Role for Gamma Interferon in Control of Herpes Simplex Virus Type 1 Reactivation. **Journal of Virology**, v. 73, n. 4, p. 3418, 1999.

CARR, D. J. J. et al. Effect of anti-CXCL10 monoclonal antibody on Herpes simplex virus type 1 keratitis and retinal infection. **Journal of Virology**, v. 77, n. 18, p. 10037–46, 2003.

CASROUGE, A. et al. Herpes Simplex Virus Encephalitis in Human UNC-93B Deficiency. **Science**, v. 314, n. 5797, p. 308–312, 2006.

CHAPLIN, D. D. Overview of the immune response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, p. S3–S23, 2010.

CHEN, G. Y.; NUÑEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nature Publishing Group**, v. 10, n. 12, p. 826–837, 2010.

CHEW, T.; TAYLOR, K. E.; MOSSMAN, K. L. Innate and Adaptive Immune Responses to Herpes Simplex Virus. **Viruses**, v. 1, p. 979–1002, 2009.

CHUCAIR-ELLIOTTA, A. J. et al. Microglia-induced IL-6 protects against neuronal loss following HSV-1 infection of neural progenitor cells. **Glia**, v. 62, n. 9, p. 1418–1434, 2014.

CLEMENS, A. S. C.; FARHAT, C. K. Soroprevalência de anticorpos contra vírus herpes simples 1-2 no Brasil Seroprevalence of herpes simplex 1-2 antibodies in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 4, p. 726–734, 2010.

CLEMENT, C. et al. A novel role for phagocytosis-like uptake in herpes simplex virus entry. **The Journal of Cell Biology**, v. 174, n. 7, p. 1009–1021, 2006.

CONRADY, C. D. et al. Resistance to HSV-1 infection in the epithelium resides with the novel innate sensor, IFI-16. **Mucosal Immunology**, v. 5, n. 2, p. 173–183, 2012.

COWAN, F. M. et al. Seroepidemiological study of herpes simplex virus types 1 and 2 in Brazil, Estonia, India, Morocco, and Sri Lanka. **Sexually Transmitted Infections**, v. 79, p. 286–290, 2003.

CROUSE, J.; KALINKE, U.; OXENIUS, A. Regulation of antiviral T cell responses by type I interferons. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 4, p. 231–242, 2015.

DAVISON, A. J. et al. The Order Herpesvirales. **Archives of Virology**, v. 154, n. 1, p. 171–177, 2009.

DELHAYE, S. et al. Neurons produce type I interferon during viral encephalitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 20, p. 7835–40, 2006.

DINARELLO, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1

family. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 519–50, 2009.

DONAGHY, H. et al. Role for Plasmacytoid Dendritic Cells in the Immune Control of Recurrent Human Herpes Simplex Virus Infection. **Journal of Virology**, v. 83, n. 4, p. 1952–1961, 2009.

EGAN, K. P. et al. Immunological control of herpes simplex virus infections. **Journal of Neurovirology**, v. 19, n. 4, p. 328–345, 2013.

ELLERMANN-ERIKSEN, S. Macrophages and cytokines in the early defence against herpes simplex virus. **Virology Journal**, v. 2, n. 1, p. 59, 2005.

FATAHZADEH, M.; SCHWARTZ, R. A. Human herpes simplex virus infections: Epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 57, p. 737–763, 2007.

FENG, P.; EVERLY, D. N.; READ, G. S. mRNA Decay during Herpes Simplex Virus (HSV) Infections: Protein-Protein Interactions Involving the HSV Virion Host Shutoff Protein and Translation Factors eIF4H and eIF4A. **Journal of Virology**, v. 79, n. 15, p. 9651–9664, 2005.

GAMBA, G. et al. Early Inhibition of Nitric Oxide Production Increases HSV-1 Intranasal Infection. **Journal of Medical Virology**, v. 73, n. 2, p. 313–322, 2004.

GARLANDA, C.; DINARELLO, C. A.; MANTOVANI, A. The Interleukin-1 Family: Back to the Future. **Immunity**, v. 39, n. 6, p. 1003–1018, 2013.

GEIGER, K. D. et al. Interferon- γ Protects against Herpes Simplex Virus Type 1-Mediated Neuronal Death 1. **Virology**, v. 238, p. 189–197, 1997.

GRIFFITH, J. W.; SOKOL, C. L.; LUSTER, A. D. Chemokines and Chemokine Receptors: Positioning Cells for Host Defense and Immunity. **Annual Review of Immunology**, v. 32, p. 659–702, 2014.

GRUBOR-BAUK, B.; ARTHUR, J. L.; MAYRHOFER, G. Importance of NKT cells in resistance to Herpes simplex virus, fate of virus-infected neurons, and level of latency in mice. **Journal of Virology**, v. 82, n. 22, p. 11073–83, 2008.

GRÜNEWALD, K. et al. Three-Dimensional Structure of Herpes Simplex Virus from Cryo – Electron Tomography. **Science**, v. 302, p. 1396–1398, 2003.

HAZRATI, E. et al. Human α - and β -Defensins Block Multiple Steps in Herpes Simplex Virus Infection. **Journal of Immunology**, v. 177, p. 8658–8666, 2006.

HE, J. et al. Kinetics of Cytokine Production in the Cornea and Trigeminal Ganglion of C57BL/6 Mice after Corneal HSV-1 Infection. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 19, n. 6, p. 609–15, 1999.

HIEBERT, P. R.; GRANVILLE, D. J. Granzyme B in injury, inflammation, and repair. **Trends in Molecular Medicine**, v. 18, n. 12, p. 732–741, 2012.

HOCHREIN, H. et al. Herpes simplex virus type-1 induces IFN- α production via Toll-

like receptor 9-dependent and -independent pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 31, p. 11416–21, 2004.

HOSKING, M. P.; LANE, T. E. The role of chemokines during viral infection of the CNS. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 7, p. 1–4, 2010.

HUKKANEN, V. et al. Cytokines in experimental herpes simplex virus infection. **International Reviews of Immunology**, v. 21, n. (4-5), p. 355–371, 2002.

HUKKANEN, V.; PAAVILAINEN, H.; MATTILA, R. K. Host responses to herpes simplex virus and herpes simplex virus vectors. **Future Virology**, v. 5, n. 4, p. 493–512, 2010.

IDA, H. et al. Granzyme B and natural killer (NK) cell death. **Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association**, v. 15, n. 5, p. 315–22, 2005.

ITO, T.; WANG, Y.-H.; LIU, Y.-J. Plasmacytoid dendritic cell precursors/type I interferon-producing cells sense viral infection by Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR9. **Springer Seminars in Immunopathology**, v. 26, n. 3, p. 221–229, 2005.

IVANOVA, E. A.; OREKHOV, A. N. T Helper lymphocyte subsets and plasticity in autoimmunity and cancer: An overview. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **Nature Immunology**, v. 16, n. 4, p. 343–353, 2015.

JIMÉNEZ-DALMARONI, M. J.; GERSWHIN, M. E.; ADAMOPOULOS, I. E. Autoimmunity Reviews The critical role of toll-like receptors - From microbial recognition to autoimmunity: A comprehensive review. **Autoimmunity Reviews**, v. 15, n. 1, p. 1–8, 2016.

JOST, S.; ALTFELD, M. Control of Human Viral Infections by Natural Killer Cells. **Annual Review of Immunology**, v. 31, p. 163–94, 2013.

KANANGAT, S. et al. Herpes simplex virus type 1-mediated up-regulation of IL-12 (p40) mRNA expression. Implications in immunopathogenesis and protection. **The Journal of Immunology**, v. 156, n. 3, p. 1110–1116, 1996.

KASSIM, S. H. et al. In Vivo Ablation of CD11c-Positive Dendritic Cells Increases Susceptibility to Herpes Simplex Virus Type 1 Infection and Diminishes NK and T-Cell Responses. **Journal of Virology**, v. 80, n. 8, p. 3985–3993, 2006.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. **International Immunology**, v. 21, n. 4, p. 317–337, 2009.

KAWAMURA, K. et al. Virus-stimulated plasmacytoid dendritic cells induce CD4+ cytotoxic regulatory T cells. **Blood**, v. 107, n. 3, p. 1031–1038, 2006.

KIM, M. et al. Herpes Simplex Virus Antigens Directly Activate NK Cells via TLR2, Thus Facilitating Their Presentation to CD4 T Lymphocytes. **The Journal of**

Immunology, v. 188, n. 9, p. 4158–70, 2012.

KNICKELBEIN, J. E. et al. Noncytotoxic Lytic Granule-Mediated CD8⁺ T Cell Inhibition of HSV-1 Reactivation from Neuronal Latency. **Science**, v. 322, n. 5899, p. 268–271, 2008.

KNIPE, D. M.; CLIFFE, A. Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 211–221, 2008.

KODUKULA, P. et al. Macrophage control of Herpes simplex virus type 1 replication in the peripheral nervous system. **The Journal of Immunology**, v. 162, n. 5, p. 2895–2905, 1999.

KOGO, J. et al. Involvement of TNF- α in glutamate-induced apoptosis in a differentiated neuronal cell line. **Brain Research**, v. 1122, n. 1, p. 201–208, 2006.

KOURO, T.; TAKATSU, K. IL-5-and eosinophil-mediated inflammation: From discovery to therapy. **International Immunology**, v. 21, n. 12, p. 1303–1309, 2009.

KRUG, A. et al. Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1) activates murine natural interferon-producing cells (IPC) through toll-like receptor 9. **Blood Journal**, v. 103, n. 4, p. 1433–1438, 2004.

KRUSE, M. et al. Mature Dendritic Cells Infected with Herpes Simplex Virus Type 1 Exhibit Inhibited T-Cell Stimulatory Capacity. **Journal of Virology**, v. 74, n. 15, p. 7127–7136, 2000.

KURT-JONES, E. A. et al. Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 5, p. 1315–1320, 2004.

LACHMANN, R. Herpes simplex virus latency. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 5, n. 29, p. 1–14, 2003.

LEE, J. J. et al. Eosinophils In Health and Disease: The LIAR Hypothesis. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 40, n. 4, p. 563–575, 2010.

LEGER, A. J. S.; HENDRICKS, R. L. CD8 + T cells patrol HSV-1-infected trigeminal ganglia and prevent viral reactivation. **Journal Neurovirology**, v. 17, p. 528–534, 2011.

LEKSTROM-HIMES, J. A. et al. Gamma Interferon Impedes the Establishment of Herpes Simplex Virus Type 1 Latent Infection but Has No Impact on Its Maintenance or Reactivation in Mice. **Journal of Virology**, v. 74, n. 14, p. 6680–6683, 2000.

LEVY, D. E.; MARIÉ, I. J.; DURBIN, J. E. Induction and function of type I and III interferon in response to viral infection. **Current Opinion in Virology**, v. 1, n. 6, p. 476–486, 2011.

LIESEGANG, T. J. Herpes Simplex Virus Epidemiology and Ocular Importance. **Cornea**, v. 20, n. 1, p. 1–13, 2001.

LIM, H. K. et al. TLR3 deficiency in herpes simplex encephalitis: high allelic heterogeneity and recurrence risk. **Neurology**, v. 83, n. 21, p. 1888–97, 2014.

LIMA, G. K. et al. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR9 expressed in trigeminal ganglia are critical to viral control during Herpes simplex virus 1 infection. **The American journal of pathology**, v. 177, n. 5, p. 2433–2445, 2010.

LIMA, G. K. **TLR2 e TLR9: Receptores Essenciais Para o Controle da infecção por vírus Herpes Simplex do Tipo 1**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

LIU, B. T. et al. CD8+ T Cells Can Block Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) Reactivation from Latency in Sensory Neurons. **Journal of Experimental Medicine**, v. 191, n. 9, p. 1459–1466, 2000.

LIU, Y. IPC: Professional Type 1 Interferon-Producing Cells and Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 23, p. 275–306, 2005.

LOKENS GARD, J. R. et al. Robust expression of TNF- α , IL-1 β , RANTES, and IP-10 by human microglial cells during nonproductive infection with herpes simplex virus. **Journal of Neurovirology**, v. 7, p. 208–219, 2001.

LOW-CALLE, A. M.; PRADA-ARISMENDY, J.; CASTELLANOS, J. E. Study of interferon- β antiviral activity against Herpes simplex virus type 1 in neuron-enriched trigeminal ganglia cultures. **Virus Research**, v. 180, n. 2, p. 49–58, 2014.

LUNDBERG, P. et al. 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. **Journal of Virology**, v. 82, n. 14, p. 7078–7088, 2008.

MACLEAN, A. et al. Mice lacking inducible nitric-oxide synthase are more susceptible to herpes simplex virus infection despite enhanced Th1 cell responses. **Journal of General Virology**, v. 79, n. 4, p. 825–830, 1998.

MANSUR, D. S. et al. Lethal encephalitis in myeloid differentiation factor 88-deficient mice infected with Herpes simplex virus 1. **American Journal of Pathology**, v. 166, n. 5, p. 1419–1426, 2005.

MARQUES, C. P. et al. Interleukin-10 attenuates production of HSV-induced inflammatory mediators by human microglia. **Glia**, v. 47, n. 4, p. 358–366, 2004.

MARQUES, C. P. et al. Microglial cells initiate vigorous yet non-protective immune responses during HSV-1 brain infection. **Virus Research**, v. 121, p. 1–10, 2006.

MARQUES, C. P. et al. Microglia are the major cellular source of iNOS during experimental herpes encephalitis. **Journal of Neurovirology**, v. 14, n. 3, p. 229–238, 2008.

MASON, J. L. et al. Interleukin-1 β promotes repair of the CNS. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 18, p. 7046–7052, 2001.

MATLOUBIAN, M. et al. A role for perforin in downregulating T-cell responses during chronic viral infection. **Journal of Virology**, v. 73, n. 3, p. 2527–36, 1999.

MCNAB, F. et al. Type I interferons in infectious disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 2, p. 87–103, 2015.

MELCHJORSEN, J.; MATIKAINEN, S.; PALUDAN, S. R. Activation and evasion of innate antiviral immunity by Herpes simplex virus. **Viruses**, v. 1, n. 3, p. 737–759, 2009.

METTENLEITER, T. C. Herpesvirus Assembly and Egress. **Journal of Virology**, v. 76, n. 4, p. 1537–1547, 2002.

METTENLEITER, T. C. Budding events in herpesvirus morphogenesis. **Virus Research**, v. 106, p. 167–180, 2004.

METTENLEITER, T. C. et al. The way out: what we know and do not know about herpesvirus nuclear egress. **Cellular Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 170–178, 2013.

METTENLEITER, T. C.; KLUPP, B. G.; GRANZOW, H. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p. 423–429, 2006.

MILDNER, A.; JUNG, S. Development and Function of Dendritic Cell Subsets. **Immunity**, v. 40, n. 5, p. 642–656, 2014.

MIYARA, M.; SAKAGUCHI, S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. **Trends in Molecular Medicine**, v. 13, n. 3, p. 108–16, 2007.

MOON, B. et al. The role of IL-5 for mature B-1 cells in homeostatic proliferation, cell survival, and Ig production. **Journal of Immunology**, v. 172, n. 10, p. 6020–6029, 2004.

MOORE, K. W. et al. Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. **Annual Review of Immunology**, v. 19, n. 1, p. 683–765, 2001.

MORRISON, L. A. The Toll of herpes simplex virus infection. **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 8, p. 353–6, 2004.

MOSSMAN, K. L.; ASHKAR, A. A. Herpesviruses and the Innate Immune Response. **Viral Immunology**, v. 18, n. 2, p. 267–281, 2005.

MOTT, K. R.; GHIASI, H. Role of Dendritic Cells in Enhancement of Herpes Simplex Virus Type 1 Latency and Reactivation in Vaccinated Mice. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 12, p. 1859–1867, 2008.

MOTYKA, B. et al. Mannose 6-Phosphate/Insulin-like Growth Factor II Receptor Is a Death Receptor for Granzyme B during Cytotoxic T Cell–Induced Apoptosis. **Cell**, v. 103, n. 3, p. 491–500, 2000.

MUELLER, S. N. et al. Rapid Cytotoxic T Lymphocyte Activation Occurs in the Draining Lymph Nodes After Cutaneous Herpes Simplex Virus Infection as a Result of Early Antigen Presentation and Not the Presence of Virus. **Journal of**

Experimental Medicine, v. 195, n. 5, p. 651–656, 2002.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 11, p. 723–737, 2011.

MUYLAERT, I.; TANG, K.; ELIAS, P. Replication and recombination of Herpes simplex virus DNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 18, p. 15619–15624, 2011.

NEILL, L. A. J. O.; BOWIE, A. G. The family of five : TIR-domain- containing adaptors in Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 5, p. 353–364, 2007.

NICOLA, A. V et al. Herpes Simplex Virus Type 1 Enters Human Epidermal Keratinocytes , but Not Neurons , via a pH-Dependent Endocytic Pathway. **Journal of Virology**, v. 79, n. 12, p. 7609–7616, 2005.

NICOLL, M. P.; PROENÇA, J. T.; EFSTATHIOU, S. The molecular basis of herpes simplex virus latency. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, p. 684–705, 2012.

NOGUEIRA, M. L. et al. Diagnosis of mucocutaneous herpetic infections by PCR without DNA extraction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 2, p. 213–214, 1998.

NOGUEIRA, M. L. et al. Papers Detection of herpesvirus DNA by the polymerase chain reaction (PCR) in vitreous samples from patients with necrotising retinitis. **Journal of Clinical Pathology**, v. 54, p. 103–106, 2001.

NOVAK, N.; PENG, W. M. Dancing with the enemy : the interplay of herpes simplex virus with dendritic cells. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 142, p. 405–410, 2005.

O'GARRA, A.; VIEIRA, P. TH1 cells control themselves by producing interleukin-10. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 6, p. 425–8, 2007.

OJALA, P. M. et al. Herpes Simplex Virus Type 1 Entry into Host Cells : Reconstitution of Capsid Binding and Uncoating at the Nuclear Pore Complex In Vitro. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 13, p. 4922–4931, 2000.

OUYANG, W. et al. Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease. **Annual Review of Immunology**, v. 29, p. 71–109, 2011.

PALM, N. W.; MEDZHITOV, R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. **Immunological Reviews**, v. 227, n. 1, p. 221–233, 2009.

PALUDAN, S. R. et al. Recognition of herpesviruses by the innate immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 2, p. 143–154, 2011.

PARK, H. et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nature Immunology**, v. 6, n. 11, p. 1133–1141, 2005.

PELLETT, P. E. et al. Order Herpesvirales. In: KING, A. M. Q. et al. (Eds.). . **Virus**

Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press, 2011. p. 99–107.

PELLETT, P. E.; ROIZMAN, B. Herpesviridae. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds.). . **Fields Virology**. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p. 1802–1822.

PEREIRA, R. A.; SIMON, M. M.; SIMMONS, A. Granzyme A, a noncytolytic component of CD8(+) cell granules, restricts the spread of Herpes simplex virus in the peripheral nervous systems of experimentally infected mice. **Journal of Virology**, v. 74, n. 2, p. 1029–32, 2000.

POLLARA, G. et al. Herpes Simplex Virus Infection of Dendritic Cells: Balance among Activation, Inhibition, and Immunity. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 187, p. 165–178, 2003.

RADTKE, K. et al. Plus- and Minus-End Directed Microtubule Motors Bind Simultaneously to Herpes Simplex Virus Capsids Using Different Inner Tegument Structures. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 7, p. e1000991, 2010.

RAKOFF-NAHOUM, S.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 1, p. 57–63, 2009.

ROIZMAN, B.; KNIPE, D. M.; WHITLEY, R. J. Herpes simplex viruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds.). . **Fields Virology**. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p. 1823–1897.

ROSATO, P. C.; LEIB, D. A. Neuronal Interferon Signaling Is Required for Protection against Herpes Simplex Virus Replication and Pathogenesis. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 7, p. e1005028, 2015.

SALTI, S. M. et al. Granzyme B regulates antiviral CD8+ T cell responses. **Journal of Immunology**, v. 187, n. 12, p. 6301–9, 2011.

SANCHO-SHIMIZU, V. et al. Herpes simplex encephalitis in children with autosomal recessive and dominant TRIF deficiency. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 12, p. 4889–4902, 2011.

SARANGI, P. P. et al. IL-10 and Natural Regulatory T Cells: Two Independent Anti-Inflammatory Mechanisms in Herpes Simplex Virus-Induced Ocular Immunopathology. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 9, p. 6297–6306, 2008.

SATO, A.; IWASAKI, A. Induction of antiviral immunity requires Toll-like receptor signaling in both stromal and dendritic cell compartments. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 46, p. 16274–16279, 2004.

SATO, A.; LINEHAN, M. M.; IWASAKI, A. Dual recognition of herpes simplex viruses by TLR2 and TLR9 in dendritic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 46, p. 17343–8, 2006.

SERGERIE, Y.; RIVEST, S.; BOIVIN, G. Tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β

play a critical role in the resistance against lethal Herpes simplex virus encephalitis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 196, n. 6, p. 853–60, 2007.

SHAFTTEL, S. S.; GRIFFIN, W. S. T.; O'BANION, M. K. The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective. **Journal of Neuroinflammation**, v. 5, p. 7, 2008.

SIMMONS, A. Clinical Manifestations and Treatment Considerations of Herpes Simplex Virus Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. 71–77, 2002.

SKALITER, R.; LEHMAN, I. R. Rolling circle DNA replication in vitro by a complex of herpes simplex virus type 1-encoded enzymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, p. 10665–10669, 1994.

SMITH, C.; KHANNA, R. Immune Regulation of Human Herpesviruses and Its Implications for Human Transplantation. **American Journal of Transplantation**, v. 13, p. 9–23, 2013.

SØRENSEN, L. N. et al. TLR2 and TLR9 synergistically control Herpes simplex virus infection in the brain. **Journal of Immunology**, v. 181, n. 12, p. 8604–8612, 2008.

SORGELOOS, F. et al. Antiviral type I and type III interferon responses in the central nervous system. **Viruses**, v. 5, n. 3, p. 834–857, 2013.

SPEAR, P. G. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. **Cellular Microbiology**, v. 6, p. 401–410, 2004.

SPEAR, P. G.; LONGNECKER, R. Herpesvirus Entry: an Update. **Journal of Virology**, v. 77, n. 19, p. 10179–10185, 2003.

STEINER, I.; BENNINGER, F. Update on herpes virus infections of the nervous system. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 13, n. 12, p. 414–418, 2013.

STETSON, D. B.; MEDZHITOV, R. Type I Interferons in Host Defense. **Immunity**, v. 25, n. 3, p. 373–381, 2006.

SU, C.; ZHAN, G.; ZHENG, C. Evasion of host antiviral innate immunity by HSV-1, an update. **Virology Journal**, v. 13, n. 1, p. 38, 2016.

SUAZO, P. A. et al. Evasion of early antiviral responses by Herpes simplex viruses. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 1–16, 2015.

SURYAWANSHI, A. et al. Role of IL-17 and Th17 Cells in HSV Induced Corneal Immunopathology. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 4, p. 1919–1930, 2011.

SUVAS, S. et al. CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells Control the Severity of Viral Immunoinflammatory Lesions. **The Journal of Immunology**, v. 172, p. 4123–4132, 2004.

TADDEO, B.; ZHANG, W.; ROIZMAN, B. The Herpes Simplex Virus Host Shutoff

RNase Degrades Cellular and Viral mRNAs Made before Infection but Not Viral mRNA Made after Infection. **Journal of Virology**, v. 87, n. 8, p. 4516–4522, 2013.

TAKAOKA, A. et al. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 501–506, 2007.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805–820, 2010.

TANAKA, H. et al. Role of interleukin-5 and eosinophils in allergen-induced airway remodeling in mice. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 31, n. 1, p. 62–68, 2004.

THOMPSON, R. L.; SWATELL, N. M. The Herpes Simplex Virus Type 1 Latency-Associated Transcript Gene Regulates the Establishment of Latency. **Journal of Virology**, v. 71, n. 7, p. 5432–5440, 1997.

TRAPANI, J. A.; SMYTH, M. J. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 10, p. 735–47, 2002.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 2, p. 133–146, 2003.

TUMPEY, T. M. et al. Interleukin-10 treatment can suppress stromal keratitis induced by Herpes simplex virus type 1. **The Journal of Immunology**, v. 153, n. 5, p. 2258–2265, 1994.

TURVEY, S. E.; BROIDE, D. H. Innate immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. S24–S32, 2010.

UEMATSU, S.; AKIRA, S. Toll-like Receptors and Type I. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 21, p. 15319–15323, 2007.

UNTERHOLZNER, L. et al. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. **Nature Immunology**, v. 11, n. 11, p. 997–1004, 2010.

VÄLIMAA, H. et al. Human lactoferrin but not lysozyme neutralizes HSV-1 and inhibits HSV-1 replication and cell-to-cell spread. **Virology Journal**, v. 6, n. 1, p. 53, 2009.

VAN DE VEERDONK, F. L. et al. Th17 responses and host defense against microorganisms : an overview. **BMB reports**, v. 42, n. 12, p. 776–787, 2009.

VAN DOMMELEN, S. L. H. et al. Perforin and Granzymes Have Distinct Roles in Defensive Immunity and Immunopathology. **Immunity**, v. 25, p. 835–848, 2006.

VAN GENDEREN, I. L. et al. The Phospholipid Composition of Extracellular Herpes Simplex Virions Differs from That of Host Cell Nuclei. **Virology**, v. 200, n. 2, p. 831–836, 1994.

VOGEL, K. et al. Both plasmacytoid dendritic cells and monocytes stimulate natural killer cells early during human herpes simplex virus type 1 infections. **Immunology**,

v. 143, n. 4, p. 588–600, 2014.

VOLLSTEDT, S. 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. **Journal of Virology**, v. 78, n. 8, p. 3846–3850, 2004.

VOSKOBOINIK, I. et al. Perforin: Structure, function, and role in human immunopathology. **Immunological Reviews**, v. 235, n. 1, p. 35–54, 2010.

WAGNER, C. et al. Granzyme B and perforin: constitutive expression in human polymorphonuclear neutrophils. **Blood**, v. 103, n. 3, p. 1099–1104, 2004.

WALD, A.; COREY, L. Persistence in the population: epidemiology, transmission. In: ARVIN, A. et al. (Eds.). **Human herpesviruses: biology, therapy and immunoprophylaxis**. Cambridge: Cambridge University Press, 2007. p. 656–671.

WAN, Y. Y.; FLAVELL, R. A. How Diverse - CD4 Effector T Cells and their Functions. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 1, p. 20–36, 2009.

WANG, J. P. et al. Role of Specific Innate Immune Responses in Herpes Simplex Virus Infection of the Central Nervous System. **Journal of Virology**, v. 86, n. 4, p. 2273–2281, 2012.

WEST, A. P.; KOBLANSKY, A. A.; GHOSH, S. Recognition and Signaling by Toll-Like Receptors. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 22, p. 409–437, 2006.

WILSON, A. C.; MOHR, I. A cultured affair: HSV latency and reactivation in neurons. **Trends in Microbiology**, v. 20, n. 12, p. 604–611, 2012.

WUEST, T. R. et al. CXCL10 expressing hematopoietic-derived cells are requisite in defense against HSV-1 infection in the nervous system of CXCL10 deficient mice. **Journal of Neuroimmunology**, v. 234, n. 1–2, p. 103–108, 2011.

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

WUEST, T. R.; CARR, D. J. J. Dysregulation of CXCR3 signaling due to CXCL10 deficiency impairs the antiviral response to Herpes simplex virus 1 infection. **Journal of immunology**, v. 181, n. 11, p. 7985–93, 2008b.

WYNN, T. A. Type 2 cytokines: mechanisms and therapeutic strategies. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 5, p. 271–282, 2015.

YAMAMOTO, M. et al. Role of Adaptor TRIF in the MyD88-Independent Toll-Like Receptor Signaling Pathway. **Science**, v. 301, n. 5633, p. 640–643, 2003.

YONEYAMA, H. et al. Plasmacytoid DCs help lymph node DCs to induce anti-HSV CTLs. **Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 3, p. 425–435, 2005.

ZHANG, S.-Y. et al. TLR3 Deficiency in Patients with Herpes Simplex Encephalitis. **Science**, v. 317, n. 5844, p. 1522–1527, 14 set. 2007.

ZHOU, L.; CHONG, M. M. W.; LITTMAN, D. R. Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation. **Immunity**, v. 30, n. 5, p. 646–655, 2009.

ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W. E. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. **Annual Review of Immunology**, v. 28, p. 445–489, 2010.

ZOLINI, G. P. et al. Defense against HSV-1 in a murine model is mediated by iNOS and orchestrated by the activation of TLR2 and TLR9 in trigeminal ganglia. **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, p. 20, 2014.

APÊNDICES

APÊNDICE I – Artigos publicados

O trabalho apresentado nesta tese foi aceito para publicação na revista *Virology Journal*, mas sua versão on-line ainda não foi publicada. A versão completa do artigo segue mais à frente. Além disso, ao longo do doutorado pude contribuir com outros dois trabalhos, um publicado na *Journal of Virological Methods* e o outro no *Journal of Neuroinflammation*. Seguem as referências destes trabalhos:

- LUCINDA, N. et al. Dendritic cells, macrophages, NK and CD8+ T lymphocytes play pivotal roles in controlling HSV-1 in the trigeminal ganglia by producing IL1-beta, iNOS and granzyme B. ***Virology Journal***, 2017.
- ZOLINI, G. P. et al. Defense against HSV-1 in a murine model is mediated by iNOS and orchestrated by the activation of TLR2 and TLR9 in trigeminal ganglia. ***Journal of Neuroinflammation***, v. 11, n. 1, p. 20.
- JUNQUEIRA, B. R. T et al. A simplified approach to construct infectious cDNA clones of a tobamovirus in a binary vector. ***Journal of Virological Methods***, v. 198, p. 32-36, 2014.

RESEARCH

Open Access

Dendritic cells, macrophages, NK and CD8⁺ T lymphocytes play pivotal roles in controlling HSV-1 in the trigeminal ganglia by producing IL1-beta, iNOS and granzyme B



Natália Lucinda¹, Maria Marta Figueiredo¹, Natália Lima Pessoa¹, Beatriz Senra Álvares da Silva Santos¹, Graciela Kunrath Lima², Arthur Molinari Freitas¹, Alexandre Magalhães Vieira Machado¹, Erna Geessien Kroon³, Lis Ribeiro do Valle Antonelli⁴ and Marco Antônio Campos^{1*}

Abstract

Background: Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) cause not only mild symptoms but also blindness and encephalitis. It was previously shown that the immune response against HSV-1 occurs mainly in the trigeminal ganglia (TG) and that Toll-like receptors 2 and 9 (TLR2/9) are important in mediating this response. It was also demonstrated that iNOS (nitric oxide synthase) and interleukin 1 beta (IL-1β) play an essential role in the defense against HSV-1 infection. Importantly, the present work aimed to identify the primary cells responsible for iNOS and IL-1β production and search for other important molecules and cells that might or might not depend on TLR2/9 receptors to mediate the immune response against HSV-1.

Methods: C57BL/6 (wild type, WT) and TLR2/9^{-/-} mice were infected by the intranasal route with HSV-1 (1 × 10⁶ p.f.u.). Cells were obtained from the TG and spleen tissues and the profile of immune cells was determined by flow cytometry in infected and mock infected WT and knockout mice. The percentage of cells producing iNOS, IL-1β, granzyme B and perforin was also determined by flow cytometry. Chemokine monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) was measured by Cytometric Bead Array (CBA) in the TG, spleen and lung. Expression of type I interferons (IFNs), interleukins (IL) 5 and 10, IL-1β and granzyme B were quantified by real time PCR.

Results: The results indicate that dendritic cells (DCs) and monocytes/macrophages (Mo/Mφ) were the main sources of IL-1β and iNOS, respectively, which, together with type I IFNs, were essential for the immune response against HSV-1. Additionally, we showed that granzyme B produced by CD8⁺ T and NK lymphocytes and MCP-1 were also important for this immune response. Moreover, our data indicate that the robust production of MCP-1 and granzyme B is either TLR-independent or down regulated by TLRs and occurs in the TG of TLR2/9^{-/-} infected mice.

Conclusion: Taken together, our data provide strong evidence that the responses mediated by DCs, Mo/Mφ, NK and CD8⁺ T lymphocytes through IL-1β, iNOS and granzyme B production, respectively, together with the production of type I IFN early in the infection, are crucial to host defense against HSV-1.

Keywords: Herpes simplex virus 1, Innate immunity, Dendritic cells, Macrophages, CD8⁺ T lymphocytes, TLRs, Murine model, Neuropathogenesis, Encephalitis

* Correspondence: marcoasc@cpqrr.fiocruz.br

¹Imunologia de Doenças Virais, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz, Avenida Augusto de Lima 1715, Belo Horizonte 30190-002, MG, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) usually causes mild clinical symptoms such as herpes labialis, but in neonates and immunocompromised individuals, HSV-1 could lead to severe ophthalmic and neurologic lesions, culminating in blindness, encephalitis or even death [1]. HSV-1 establishes a lifelong latent infection in neuronal cells, predominantly in trigeminal ganglia (TG) [2]. The innate immune response is generated mainly through pattern recognition receptors (PRRs), such as Toll-like receptors (TLRs), which are capable of recognizing pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) [3]. Studies have shown that deficiency in some TLRs and their transducers, such as MyD88 (myeloid differentiation primary response 88) and TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β), can result in encephalitis and host death [4–9]. Infectious agent recognition activates TLR-signaling pathways, which culminate in pro-inflammatory cytokine production [3, 10, 11]. Among these cytokines, type I interferons (IFNs) (mainly IFN- α and IFN- β) play an important role in the innate response to HSV-1, since they stimulate the expression of many interferon-stimulated genes. This stimulation results in the production of cytokines, such as interleukin 1 beta (IL-1 β), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), IFN- γ and some chemokines, that lead to the recruitment of innate immune cells to the local site of infection, ending ultimately in activation of the adaptive response and infection control [12–16]. The main cells responsible for this coordinated immune response against HSV-1 are natural killer (NK), dendritic (DC) and T cells, mainly CD8⁺ lymphocytes [10, 11].

Thus, to study the immune response triggered by this herpesvirus, we used the intranasal model of infection. This route of infection was an alternative to the labial infection since this method caused lesions in the oral epithelium that resulted, ultimately, in cannibalism among the animals. As the TG innervates extensive areas of the face (through branches of the ophthalmic, maxillary and mandibular nerves), including the oral and nasal region [17–19], this model of infection maintain the route of HSV-1 infection and does not cause tissue lesions.

Previous studies from our group showed that the TG, but not the brain, seem to be the local site where an efficient immune response against HSV-1 occurs [6, 8, 9]. We used the HSV-1 strain EK, which was isolated from a human case of recurrent oral herpes with blisters. C57BL/6 intranasally infected with 10⁶ pfu of this strain show mild signs of infection (fur loss and snout edema) by the 4th and 5th day after infection. C57BL/6 mice have a mortality rate of only 10% while TLR2/9^{-/-} mice have a 100% mortality rate between the 5th and 8th day after infection with signs of encephalitis (prostration, ruffled fur, hunched posture, and posterior paw paralysis) [6, 8].

Analysis of the kinetics of viral replication as well as of some cytokines expression in the TG of C57BL/6 animals revealed that on the 5th day post infection (5 dpi) there are peaks of virus multiplication and also of some pivotal cytokines expression for an efficient immune response [8]. These peaks are subsequently accompanied by a decrease in viral replication as well as in the levels of cytokines. Additionally, no viral particles were detected in the brains of these animals, showing that they can control the infection in the TG, not developing encephalitis [8]. For this reason in our model of intranasal infection we have chosen the 5th day to study the immune response, since, it seems to be the “key” day to control virus in the TG of C57BL/6 animals in this model. Thus, immune response analyzes in TLR2/9^{-/-} animals were also performed on this day as they beginning to die after the 5th day, which suggests that this day is important for the infection outcome. Moreover, it was demonstrated that the adaptor molecule MyD88 or the TLR2 and TLR9 receptors together are crucial to host survival, since mice deficient in these molecules succumb to HSV-1 infection with encephalitis, whereas wild-type (WT) C57BL/6 mice can control the infection and survive [8, 9]. We have also demonstrated the important role of macrophages (M ϕ) as iNOS producers in host defense against HSV-1 [6].

Here, the present work aimed to further study the immune response against HSV-1 by identifying the organs and cells responsible for producing iNOS, IL-1 β and granzyme B in WT mice, together with the early production of type I IFN, and comparing them to the response in TLR2/9^{-/-} mice to identify which molecules are dependent on TLR2 and TLR9 receptors together and looking for other important organs and molecules in the HSV-1 immune response.

Methods

Vero cells

For virus replication and titration, Vero cells (ATCC) were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma) supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Cultilab, Brazil) and antibiotics at 5% CO₂ and 37 °C.

Virus replication and purification

Cell culture flasks containing cells at 80% confluence were infected with HSV-1, strain EK [20], which was isolated from a human case of recurrent oral herpes with blisters, at a multiplicity of infection (m.o.i.) of 0.1. After virus adsorption for 1 h in DMEM, the cells were maintained for 2 days in DMEM supplemented with 2% FBS. Purification of infectious virus particles was performed by collecting the supernatant of infected Vero cells. The supernatants were precipitated by dripping a saturated

ammonium sulfate solution to yield an ammonium sulfate concentration of 60% in the final volume of the mixture. This step occurred on ice under agitation. The mixture was then centrifuged at $10,415 \times g$ at $4^\circ C$ for 30 min. The precipitate was dissolved in 5 mL of 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, and centrifuged in a sucrose gradient (36%) in an ultracentrifuge at $36,320 \times g$ at $4^\circ C$ for 2 h. The supernatants were carefully removed and the pellet was dissolved in Tris-HCl 10 mM, pH 8.0.

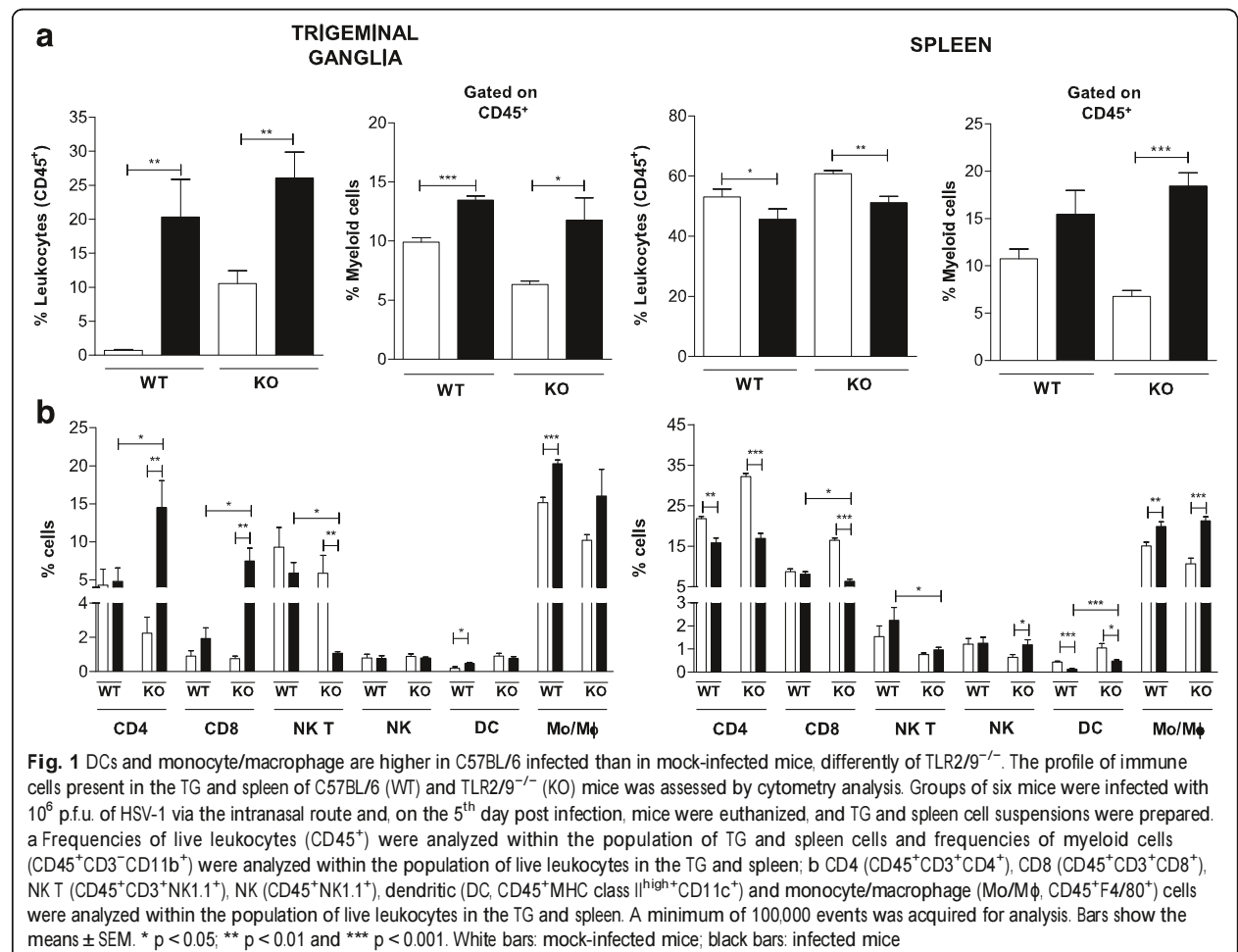
Animals

The mouse colonies and all experimental procedures were performed according to the institutional animal care and use guidelines from CPqRR/FIOCRUZ. The project was approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA from CPqRR/FIOCRUZ LW6/11 and LW-20/15). TLR2 and TLR9 knockout mice (TLR2^{-/-} and TLR9^{-/-}) were obtained by crossing TLR2^{-/-} and TLR9^{-/-} mice (both generated at Osaka University, Japan) at the National Institutes of Health (NIH, USA) and by backcrossing them to the C57BL/6 background for eight generations. These

mice were kind gifts of Shizuo Akira and Alan Sher, respectively. The C57BL/6 mice used as wild-type (WT) controls were obtained from the Centro de Pesquisas René Rachou, Oswaldo Cruz Foundation (CPqRR/FIOCRUZ) (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil), where all of the mice were maintained in a pathogen-free barrier environment. Six- to 10-week-old male mice were anesthetized with ketamine and xylazine. The mice were intranasally infected with 1×10^6 plaque-forming units (p.f.u.) of purified HSV-1 as described previously [21]. The control mice were administered phosphate-buffered saline (PBS). In the experiments in Figs. 1, 2b-c, 3, 4, 6, 7, 8 and 9, the mice were euthanized 5 days after infection, because a previously performed kinetic analysis of viral growth and the cytokine response showed that the peak of virus and cytokine levels occurred on the 5th day after infection when this multiplicity of infection was used [8].

Intraperitoneal macrophages

Thioglycolate-elicited peritoneal macrophages were obtained from either C57BL/6 or TLR2^{-/-} mice by peritoneal



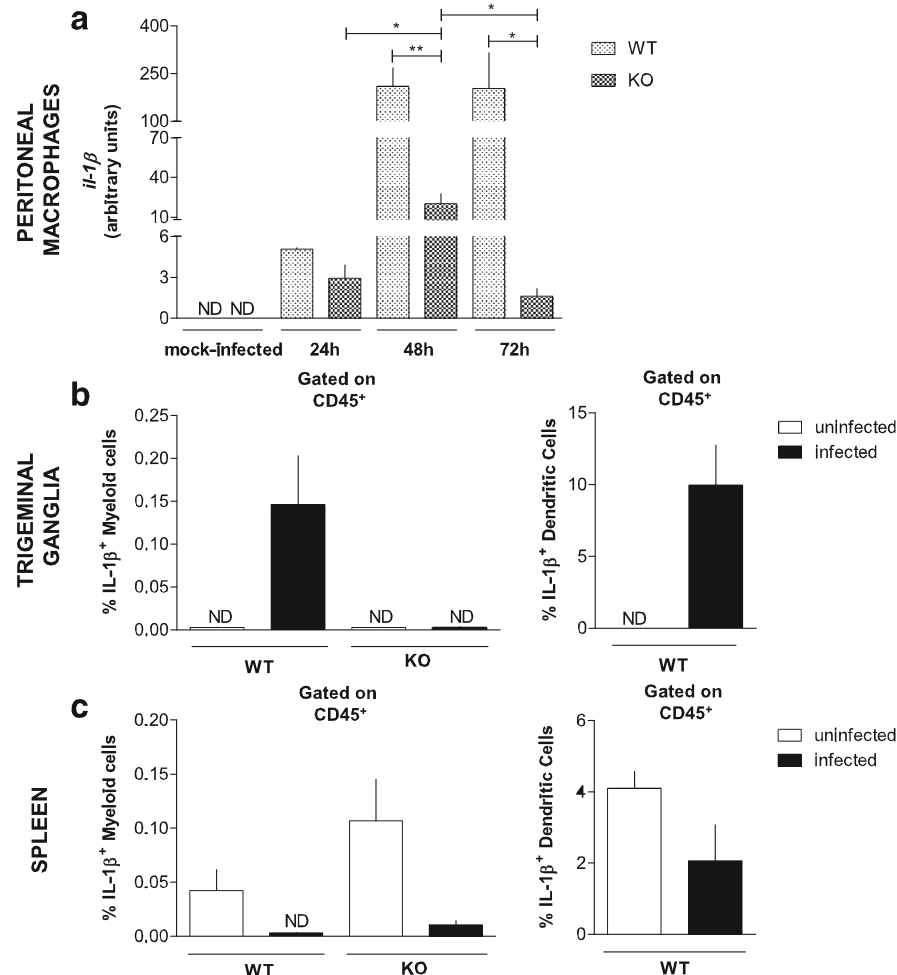


Fig. 2 DCs are the major producers of IL-1 β in the TG of C57BL/6 mice after infection. **a** Peritoneal macrophages derived from C57BL/6 (WT) and TLR2/9^{-/-} (KO) mice were infected with HSV-1 (m.o.i. of 1, 5 wells/group), and the levels of IL-1 β mRNA were determined in the supernatants at different times after infection (as indicated in the figure) by qPCR. The results use arbitrary units for the ratio of target gene mRNA to endogenous control HPRT mRNA. Data are representative of two independent experiments with similar results. For myeloid cell and DC frequency analyses, groups of six mice were infected with 10⁶ p.f.u. HSV-1 via the intranasal route and, on the 5th day post infection, mice were euthanized, and TG and spleen cell suspensions prepared for flow cytometry evaluation. The frequencies of myeloid (CD45⁺CD3⁻CD11b⁺) and dendritic (CD45⁺MHC class II^{high}CD11c⁺) cells producing IL-1 β in the TG (**b**) and spleen (**c**) are shown. The frequency of each cell was calculated within the population of live leukocytes. A minimum of 100,000 events was acquired for analysis. ND: not detected. Bars show the means $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$

washing. Adherent peritoneal macrophages were cultured in 6-well plates in an atmosphere with 5% CO₂ at 37 °C in DMEM supplemented with 5% FBS and antibiotics. A group of wells were infected with HSV-1 at a m.o.i. of 1. A second group was used as a control and did not receive any stimulus. All wells were then activated with sub-optimal concentration of murine IFN- γ (20 U/mL). At different time points (24, 48 and 72 h post infection), the cells were harvested, and the supernatant was collected and homogenized in TRIzol Reagent (Invitrogen) for RNA isolation and subsequent reverse transcription (RT) reaction.

RNA extraction and reverse transcription

Five days post infection, for the TG and spleen, and 3hs and 24hs post infection, for the lung tissues, were aseptically collected, homogenized in TRIzol (Thermo Fisher Scientific, USA) and stored at -70 °C until RNA extraction. RNA extraction was performed according to the procedures provided by the manufacturer of TRIzol reagent. Total RNA was treated with DNase (Promega, USA) and subjected to a RT reaction that used M-MLV enzyme (Promega, USA) according to the manufacturer's instructions.

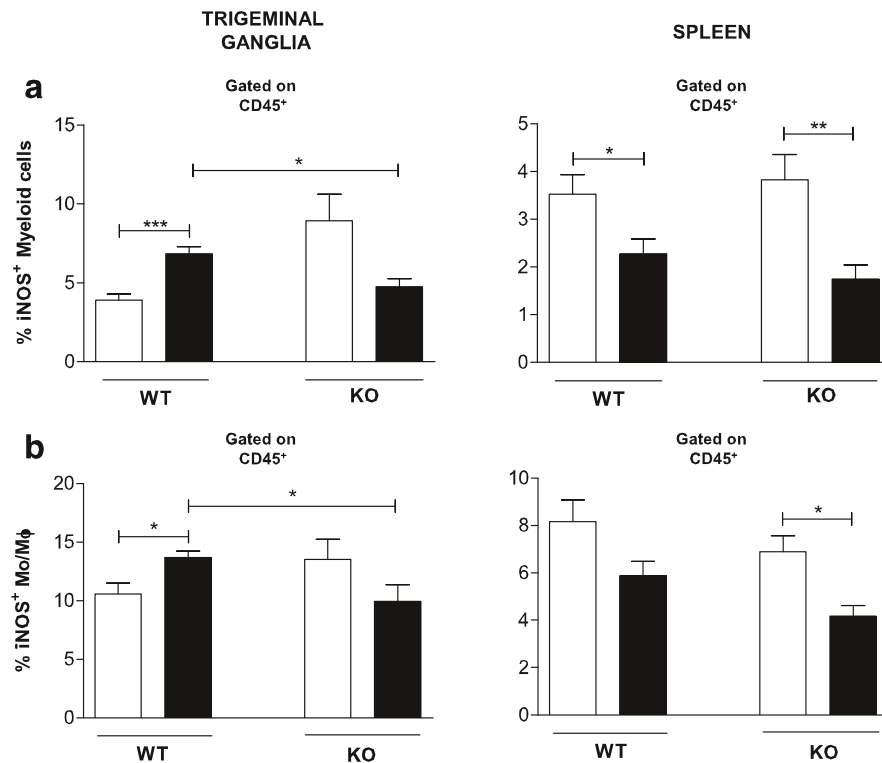


Fig. 3 Monocytes/macrophages are the main iNOS producers in the TG of C57BL/6 mice during HSV-1 infection. Groups of six mice were infected with 10^6 p.f.u. HSV-1 via the intranasal route and, on the 5th day post infection, mice were euthanized, and TG and spleen cell suspensions prepared for cytometry analyses. **a** Frequencies of iNOS-producing myeloid cell populations ($CD45^+CD3^-CD11b^+$) within the live leukocyte population. **b** Frequencies of iNOS-producing monocytes/macrophages (Mo/Mφ) ($CD45^+F4/80^+$) within the population of live leukocytes in the TG and spleen. A minimum of 100,000 events was acquired for analysis. KO = TLR2/9^{-/-} mice. White bars: mock-infected mice; black bars: infected mice. Bars show the means $\pm$ SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$

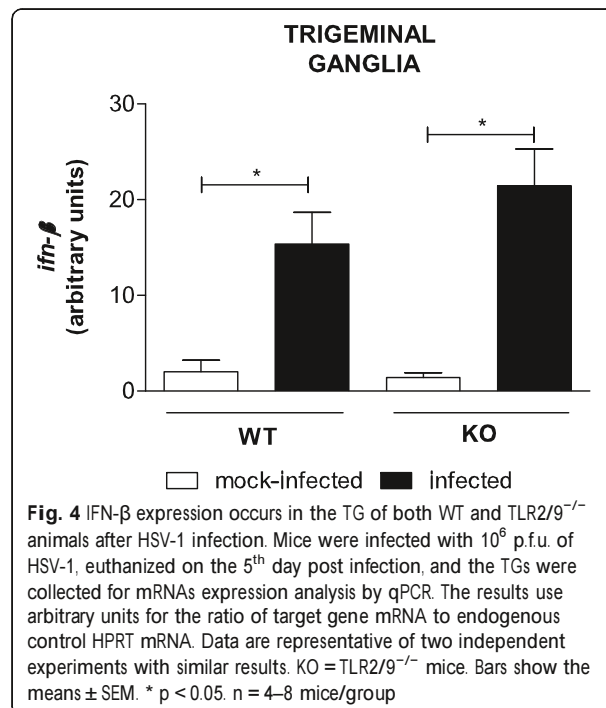
Quantitative PCR (qPCR)

qPCRs were performed to measure mRNA expression in the TG, lung, spleen tissues and peritoneal macrophages. The reactions were performed with SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) in a 7500 real-time PCR System (Applied Biosystems, USA). Amplification was performed with SYBR Green PCR Master Mix using the following conditions: 95 °C for 10 min, followed by 50 two-step cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min and a final dissociation stage. The qPCR was performed with oligonucleotide primer pairs specific for the coding region of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) (forward: 5'-GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GTT G-3'; reverse: 5'-GAT TCA ACT TGC GCT CAT CTT AGG C-3'); granzyme B (GRZ-b) (forward: 5'-ACT TTC GAT CAA GGA TCA GCA-3'; reverse: 5'-GGC CCC CAA AGT GAC ATT TAT T-3'); IL-10 (forward: 5'-GGT TGC CAA GCC TTA TCG GA-3'; reverse: 5'-ACC TGC TCC ACT GCC TTG CT-3'); IL-5 (forward: 5'-ACA GTG GTG AAA GAG ACC TT-3'; reverse: 5'-TCC AAT GCA TAG CTG GTG ATT T-3'); chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL-2

or MCP-1) (forward: 5'-CTT CTG GGC CTG CTG TTC A-3'; reverse: 5'-CCA GCC TAC TCA TTG GGA TCA-3') [22]; pro-interleukin 1 beta (pro-IL-1 β) (forward: 5'-CGC AGC ACA TCA ACA AGA GC-3'; reverse: 5'-TGT CCT CAT CCT GGA AGG TCC ACG-3'); interferon alpha 4 (IFN- α 4) (forward: 5'- ACT CAT TCT GCA ATG ACC TCC A -3'; reverse: 5'- AGA GGA GGT TCC TGC ATC ACA -3') and interferon beta (IFN- β) (forward: 5'- CTGGAGCAGCTGAATGGAAA-3'; reverse: 5'-TGTCT GCTGGTGGAGTTCAT-3'). A standard curve was prepared by serial dilution of the amplified DNA for each target gene. The standard curve method was used to analyze the data. The mRNA levels of the target genes were normalized to the expression of HPRT, the housekeeping gene. All reactions were done in duplicate.

Cytokine bead array analysis

MCP-1 levels were measured in TG, lung, spleen and cervical lymph node tissues using Cytometric Bead Array kit (CBA, BD Biosciences Pharmingen, USA) according to the manufacturer's instructions. The tissues from mock infected and infected C57BL/6 and TLR2/



9^{-/-} mice were homogenized in PBS containing protease inhibitors (Complete mini [EDTA-free], Roche, Basel, Switzerland), and the supernatants were used for cytokine measurements.

Isolation of TG and splenic leukocytes

Single-cell suspensions were harvested from the TG and spleens of six C57BL/6 and six TLR2/9^{-/-} mock-infected (PBS) and infected (1 $\times$ 10⁶ p.f.u.) mice, 5 days after infection. TG were incubated with 2 mg/mL collagenase (Merck-Chemicals) for 30 min in 5% CO₂ at 37 °C. Single-cell suspensions were prepared by passing the TG and spleen through a 70- μ m nylon cell strainer (BD Biosciences). Splenocytes were then treated with ACK lysis buffer (BD Biosciences) on ice for two minutes. Samples were suspended in complete Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) and plated for flow cytometry analysis.

Flow cytometry analysis of cell populations and intracellular cytokine production

For flow cytometry analysis, BD GolgiPlug Protein Transport Inhibitor (BD Biosciences, San Jose, CA) was added, and cells were cultured for 10 h in 5% CO₂ at 37 °C. After incubation, cells were washed with FACS buffer (PBS with 2% FBS) and stained with Acqua Live/Dead (Invitrogen, USA) for 10 min at 4 °C for dead cell exclusion. Cells were washed and stained for surface molecules for 30 min at 4 °C, fixed and permeabilized according to the manufacturer's instructions (Cytofix/Cytoperm,

BD Biosciences, USA). After washing, cells were incubated with antibodies against intracellular antigens for 30 min at 4 °C. Cells were then washed and suspended in 200 μ L of FACS buffer for cytometry analysis. Data were collected using an LSR II (BD Immunocytometry Systems, USA) with Diva (BD Biosciences, USA). At least 100,000 gated events were acquired. Representative FACS density plots showing the gate strategy for the identification of IL-1 β within CD11c⁺MHCII^{high} and iNOS within F4/80⁺ gated on live CD45⁺ leucocytes in the trigeminal ganglia and spleen from a single HSV-1-infected wild type mouse were done on Additional file 1: Figure S1 and Additional file 2: Figure S2, respectively.

The antibody panels used to define the cell subpopulations included the following: anti-CD11c PE-Cy7 (clone N418), anti-F4/80 eFluor 450 (clone BM8), anti-CD45.2 Alexa Fluor 700 (clone 104), anti-NK1.1 APC-eFluor 780 (clone PK136), anti-IL-1 β pro-form APC (clone NJTEN3), anti-granzyme B PE-Cy7 (clone 16G6) and anti-perforin FITC (clone eBioOMAK-D), all purchased from eBioscience, USA; anti-I-4/I-E biotin (clone 2G9), anti-CD8a PE (clone 53-6.7) and anti-CD3e PerCP (clone 145-2C11), purchased from BD Pharmingen, USA; streptavidin Qdot 605 and anti-CD4 Qdot 605 (clone RM4-5), purchased from Invitrogen, USA; anti-CD11b Brilliant Violet 570 (clone M1/70), purchased from BioLegend, USA; and anti-iNOS/NOS Type II FITC (clone 6/iNOS/NOS Type II), purchased from BD Transduction Laboratories, USA. Data were analyzed with FlowJo (Tree Star) software. The expression of myeloid markers was analyzed after gating on CD45⁺CD3⁻ live cells.

Statistical analysis

The statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 software for Windows (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). The sample groups were assessed by non-parametric or parametric tests depending on Kolmogorov-Smirnov normality. The Mann-Whitney test was used for nonparametric data, and an unpaired T test was used for parametric data.

Results

More dendritic cells and monocytes/macrophages are present in the TG of infected WT mice than mock-infected WT mice, in contrast to TLR2/9^{-/-} mice. Cell population profiles in the TG and spleen of C57BL/6 and TLR2/9^{-/-} mice were analyzed without infection and on the 5th day of HSV-1 infection using flow cytometry (Fig. 1). The percentage (%) of leukocytes (CD45⁺) and myeloid cells (CD45⁺CD3⁻CD11b⁺) increased in the TG of WT and TLR2/9^{-/-} mice after HSV-1 infection (Fig. 1a). In the spleen, the % of myeloid cells was also larger in the infected groups. However, the global leukocyte % decreased in the spleen in both groups after

infection (Fig. 1a). Further analysis of the cell profile in the TG showed that the % of DCs and Mo/M ϕ was larger in infected WT mice than in mock-infected WT mice, while there were no significant alterations in the presence of these two cell types in infected and mock-infected TLR2/9^{-/-} mice (Fig. 1b). The % of CD4⁺ T and CD8⁺ T lymphocytes present did not differ significantly in infected and mock-infected WT mice, whereas these cell populations were larger in infected than mock-infected TLR2/9^{-/-} mice. In contrast, the % of NK T cells in the TG was smaller in infected than mock-infected TLR2/9^{-/-} mice, whereas the WT mice presented no significant difference in the % of this cell population in infected and mock-infected mice. The NK cells in the TG presented the same profile in WT and TLR2/9^{-/-} infected and mock-infected mice. In the spleen, the % of DCs and CD4⁺ T lymphocytes was smaller in infected than in mock-infected WT and TLR2/9^{-/-} mice. The % of CD8⁺ T lymphocytes was lower in the spleen of infected than mock-infected TLR2/9^{-/-} mice, but the profile of CD8⁺ T lymphocytes in the spleen of infected and mock-infected WT mice was similar. The number of NK T cells in the spleen did not change significantly with the infection of WT and TLR2/9^{-/-} animals, although the percentage of NK T cells in infected WT mice was larger than that in the TLR2/9^{-/-} mice. There were more NK cells in infected than mock-infected TLR2/9^{-/-} mice, while there was no difference between infected and mock-infected WT mice. Finally, in the spleen, there was a lower % of Mo/M ϕ in the mock-infected mice than in the infected WT and TLR2/9^{-/-} mice.

Dendritic cells are the main producers of IL-1 β in the TG and are crucial for HSV-1 defense

The kinetics of IL-1 β mRNA transcription in peritoneal M ϕ from WT and TLR2/9^{-/-} mice were analyzed by qPCR at different time points following in vitro infection (Fig. 2a). Prior to infection, IL-1 β mRNA was not detected in peritoneal M ϕ from either group of animals. Following infection, M ϕ derived from WT mice exhibited a higher mRNA level of IL-1 β 48 and 72 h post infection, while the IL-1 β mRNA level from the TLR2/9^{-/-} mice showed a slight increase with a peak at 48 h of infection; however, this level was lower than that in the WT mice and was followed by a decrease at the next time point. These results showed that the absence of TLR2 and TLR9 has a strong negative effect on IL-1 β mRNA level. Thus, to identify the major IL-1 β -producing cell in the TG and spleen of WT and TLR2/9^{-/-} mice, we performed flow cytometry analysis (Fig. 2b, c and Additional file 1: Figure S1). Our data showed that the main IL-1 β response against infection occurs in the TG (Fig. 2b, left and Additional file 1: Figure S1a), as indicated by the high % of cells producing this cytokine in

this tissue (with no significant differential detection in the spleen) (Fig. 2c and Additional file 1: Figure S1b) and that myeloid cells derived from TLR2/9^{-/-} mice were unable to produce this cytokine, as shown by the impaired production in the TG observed in mock-infected and infected mice (Fig. 2b, left). Since no detectable production of IL-1 β by myeloid cells was seen in the TG of TLR2/9^{-/-} mice, we performed the subsequently analysis (Fig. 2b, right) only in the WT group. Thus, among the cell populations evaluated, it was discovered that DCs (Fig. 2b, right) are the major cell producing IL-1 β in the TG during infection.

Monocytes/macrophages are the most important producer of iNOS and have a pivotal role against HSV-1

To determine the primary tissue producing iNOS, which is essential for establishing an efficient immune response against HSV-1, a previous study from our group evaluated the levels of iNOS in the TG and brain of WT and TLR2/9^{-/-} mice through qPCR and an immunofluorescence assay. The data suggested that iNOS is expressed in a TLR-dependent manner and identified Mo/M ϕ as the primary iNOS-producing cells important for mouse survival [6]. Thus, to evaluate the production of iNOS at the local and systemic levels and identify other types of cells producing this molecule, we checked iNOS production in the TG and spleen of WT and TLR2/9^{-/-} mice through flow cytometry analysis (Fig. 3a, b and Additional file 2: Figure S2).

Our results showed an increase in the % of myeloid cells producing iNOS in the TG of infected WT mice; this was unlike in TLR2/9^{-/-} mice, which exhibited no statistically difference in the % of cells producing this molecule during infection (Fig. 3a, left). On the other hand, spleens from both WT and TLR2/9^{-/-} infected mice presented a reduction in the % of myeloid cells producing iNOS (Fig. 3a, right). In addition, a greater percentage of iNOS-producing Mo/M ϕ was found in the TG of WT mice during infection compared to TLR2/9^{-/-} infected mice (Fig. 3b and Additional file 2: Figure S2a). The spleens from WT and TLR2/9^{-/-} infected mice presented similar profile of Mo/M ϕ producing iNOS (Fig. 3b and Additional file 2: Figure S2b).

Type I interferon expression in the TG is higher in infected than in mock-infected WT and TLR2/9^{-/-} animals 5 days after infection

The mRNA expression level of type I IFNs during HSV-1 infection was evaluated in the TG of WT and TLR2/9^{-/-} mice on the 5th day after infection using qPCR. In the TG of both the WT and TLR2/9^{-/-} infected groups, the levels of IFN- β mRNA increased relative to their respective control groups (Fig. 4). Nevertheless, no difference was observed between WT and TLR2/9^{-/-} infected mice. As the virus was administered intranasally and type I IFNs are

generally expressed earlier, we also decided to evaluate their expression in the first few hours of infection in the lungs.

The expression of Type I interferons in the first 3 and 24 h after infection in the lung, in contrast, is higher only in the WT animals

The expression of type I IFNs mRNA in the lungs was measured 3 and 24 h after infection. The WT mice showed an increase in IFN- β mRNA level, which reached a higher level of expression at 24 h post infection, while the TLR2/9 $^{-/-}$ mice exhibited a marked decrease in the mRNA level of this cytokine at this time (Fig. 5a). A similar pattern in mRNA levels was also observed for IFN- $\alpha 4$ in the lungs of WT and TLR2/9 $^{-/-}$ infected mice (Fig. 5b).

Infected mice generate more MCP-1 in the trigeminal ganglia and spleen than mock-infected mice

As reported previously, during HSV-1 infection, the chemokine MCP-1 is overexpressed in the TG of TLR2/9 $^{-/-}$ infected mice [8]. Thus, to better understand how the response of this protein occurs, MCP-1 expression and production in the TG, spleen and lung was evaluated.

A higher level of MCP-1 was produced in the TG and spleen of WT infected mice relative to mock-infected mice. Higher production of MCP-1 was observed in the TLR2/9 $^{-/-}$ infected mice relative to WT infected mice (Fig. 6a). The same production profile was observed in the spleen (Fig. 6b). In the lung, the infected TLR2/9 $^{-/-}$ mice showed higher levels of MCP-1 than the mock-infected TLR2/9 $^{-/-}$ mice, whereas in WT mice, there was no differential production of this protein (Fig. 6c).

Granzyme B is produced by CD8 $^{+}$ T and NK lymphocytes. To better understand the mechanism underlying the immune response against HSV-1, the role of granzyme B during HSV-1 infection was also evaluated (Fig. 7).

Therefore, we evaluated the mRNA levels of granzyme B in the TG and spleen of WT and TLR2/9 $^{-/-}$ mice and identified the cell types producing this molecule in these tissues during HSV-1 infection.

The mRNA level of granzyme B in the TG and spleen of infected mice was higher than that in mock-infected animals for both the WT and the TLR2/9 $^{-/-}$ animals, although the mRNA level in the infected TLR2/9 $^{-/-}$ mice was much higher than that in the WT mice (Fig. 7a). Thus, the next step was to identify the cells responsible for granzyme B production. Although the production of granzyme B in the spleen of WT infected compared to mock infected animals occurred distinctly only by NK cells, this molecule was also produced by other population of cells, though there was no statistical difference between the mock-infected and infected groups (Fig. 7c-f, right). The same was observed in the trigeminal ganglia (Fig. 7c-f, left). In this case, the production of granzyme B in WT animals occurred mainly through NK and CD8 $^{+}$ cells (Fig. 7e and f, left). However, in the TLR2/9 $^{-/-}$ mice, several cell types in the spleen, such as CD4 $^{+}$, CD8 $^{+}$, NK T and NK cells, produced granzyme B when we compared infected and mock-infected mice (Fig. 7c-f, right). Furthermore, analysis of a gate containing all granzyme B-positive cells confirmed that TG cells from TLR2/9 $^{-/-}$ mice not only show higher mRNA levels but also produce more granzyme B than WT mice, as observed for the spleen (Fig. 7b).

CD8 $^{+}$ T lymphocytes are the main cell producing perforin in the spleen, while the perforin produced in the TG seems to be irrelevant

Furthermore, the production of perforin was evaluated after HSV-1 infection. A comparison of the infected and mock-infected WT and TLR2/9 $^{-/-}$ groups showed that the overall production of perforin in the TG by several

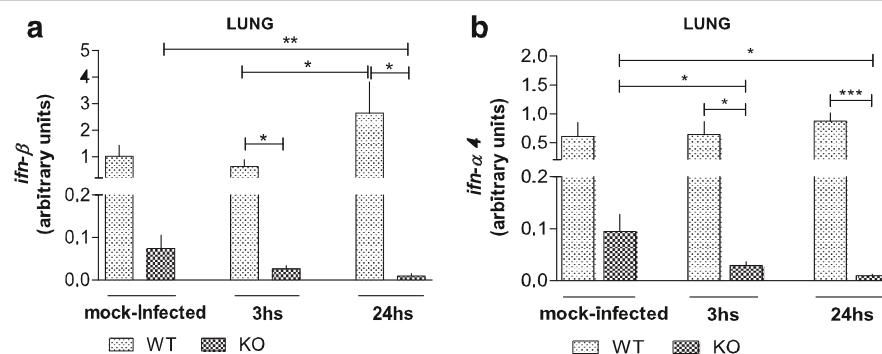


Fig. 5 Earlier type I IFN expression in the lung occurs in WT infected animals. Mice were infected with 10^6 p.f.u. of HSV-1, euthanized, and lung tissues were collected for mRNAs expression analysis by qPCR. IFN- β (a) and IFN- $\alpha 4$ (b) mRNAs level in the lung 3 or 24 h after infection. Mock-infected = animals that inhaled PBS. The results use arbitrary units for the ratio of target gene mRNA to endogenous control HPRT mRNA. Data are representative of two independent experiments with similar results. KO = TLR2/9 $^{-/-}$ mice. Bars show the means $\pm$ SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. $n = 7-11$ mice/group

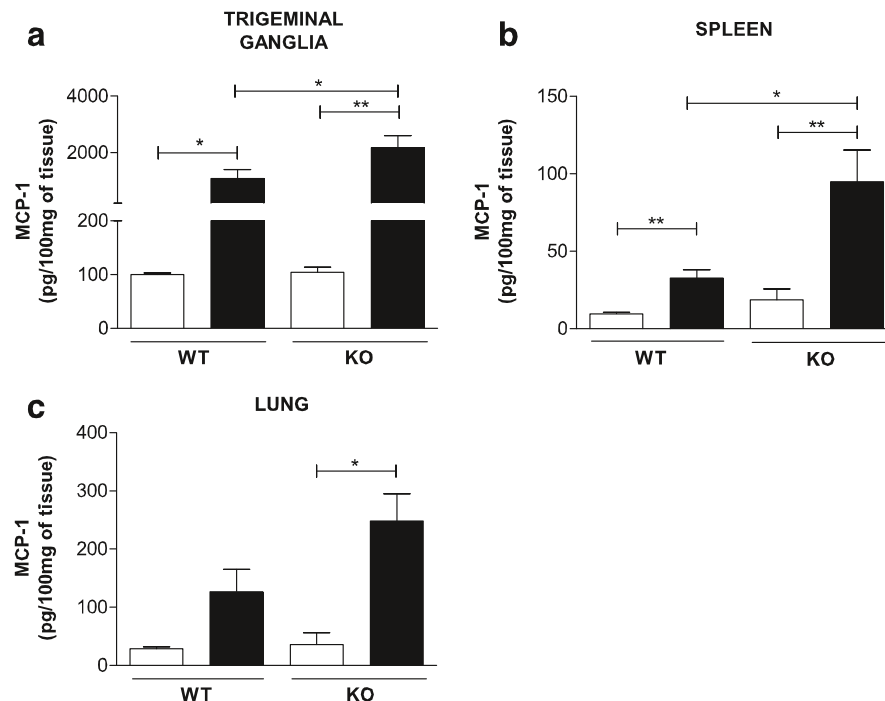


Fig. 6 MCP-1 levels are higher in the TG and spleen of infected animals than mock-infected animals. C57BL/6 (WT) and TLR2/9^{-/-} (KO) mice were infected with 10⁶ p.f.u. of HSV-1, and the chemokine levels were determined in tissue homogenates with a bead-based immunoassay. a MCP-1 measured in the TG. b MCP-1 in the spleen. c MCP-1 in the lung. These experiments are representative of three independent experiments with similar results. White bars: mock-infected groups. Black bars: infected groups. Bars show means ± SEM. * p < 0.05 and ** p < 0.01

cell types (such as CD4⁺, CD8⁺, NK T and NK cells) was not statistically significant during infection (Fig. 8a-d). However, in the spleen, CD8⁺ T lymphocytes from the infected mice produced more perforin than the mock-infected cells. Additionally, the infected TLR2/9^{-/-} mice produced more perforin than the infected wild-type mice (Fig. 8b, right).

TLR2/9^{-/-} mice exhibit a mix of Th1 and Th2 immune responses

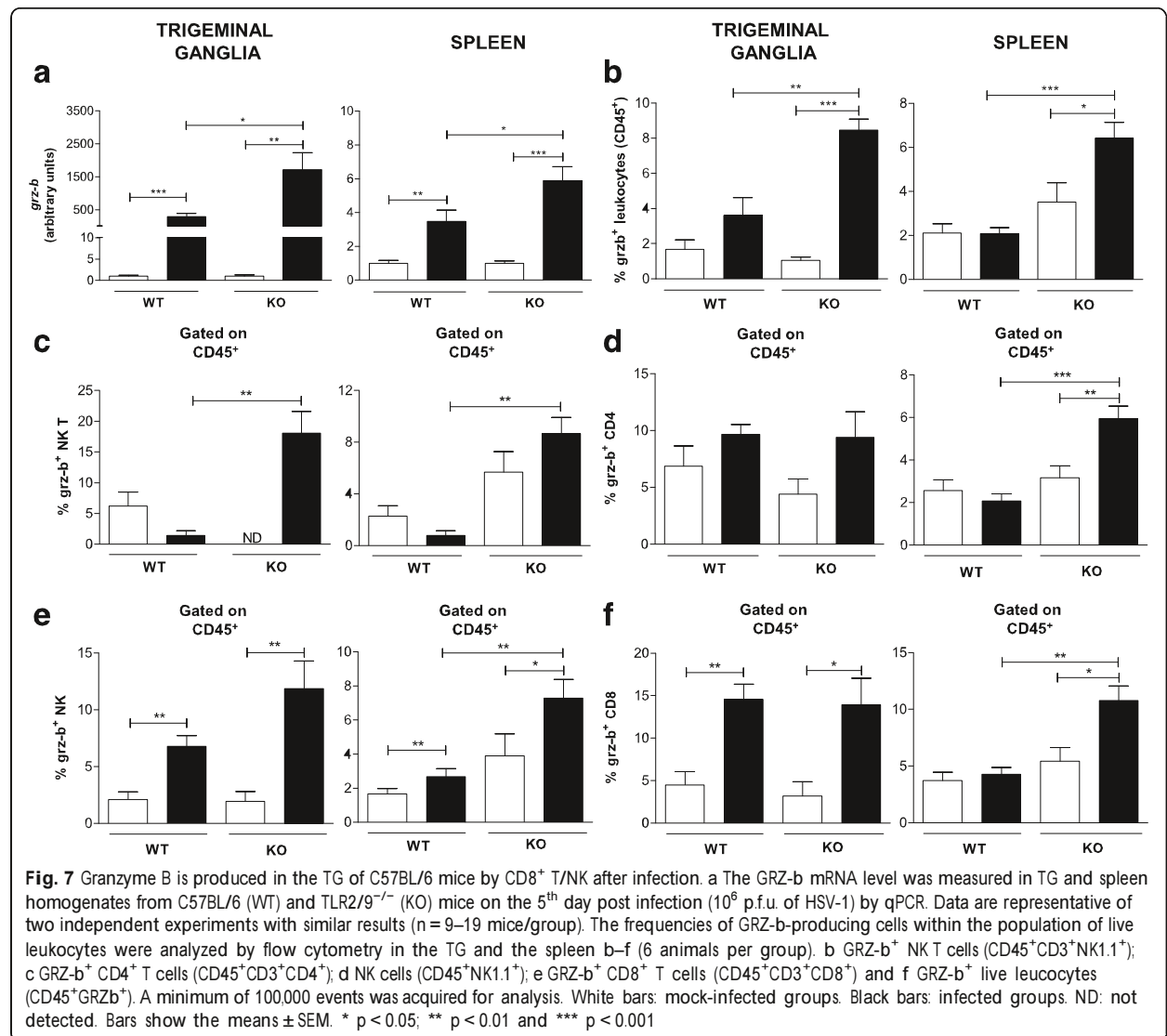
Therefore, realizing that TLR2/9^{-/-} mice were less effective in protecting against HSV-1 [8] and that they produced less IL-1β and iNOS, typical molecules in the Th1 immune response, we analyzed the mRNA levels of IL-10, a regulatory cytokine in the immune response, and IL-5, an important component of the Th2 immune response, on the 5th day post infection using qPCR. The infected WT mice exhibited a lower level of IL-5 mRNA and a higher level of IL-10 mRNA than the mock-infected WT mice but a much lower mRNA level of IL-10 than the infected TLR2/9^{-/-} mice.

Surprisingly, the TLR2/9^{-/-} infected mice exhibited an exacerbated response with regard to these two cytokines, indicating that a strong regulatory response was possibly being mediated by IL-10 due to the increased mRNA levels of chemokines in the TLR2/9^{-/-} mice (Fig. 9a).

Additionally, a Th2-skewed response also occurred in the TLR2/9^{-/-} mice, which exhibited higher levels of IL-5 mRNA (Fig. 9b), suggesting a mixed Th1 and Th2 immune response in the TLR2/9^{-/-} mice.

Discussion

Several studies have attempted to understand the main mechanisms involved in the immune response and identify the key components responsible for the recognition and establishment of an efficient immune response against HSV-1 [9, 15, 23–26]. Data from our group and from other studies have highlighted the key role of TLR2 and TLR9 in the recognition and activation of the immune response against HSV-1 infection and have suggested synergistic action of these receptors in the establishment of an effective response, since all the WT animals survive the infection, while all the TLR2/9^{-/-} mice die after infection [6, 8, 27, 28]. Furthermore, our group discovered that this immune response is mainly localized in the TG with the important role of the MyD88 adapter molecule along with IFN-γ and iNOS during infection. In the TG, after infection, a viral transcript and viral protein were identified [6, 8, 9]. Thus, continuing our studies, this work attempted to extend our knowledge of the immune response against HSV-1 by identifying the immune cells involved and the



molecules produced as a result of their activation to obtain an effective response.

We showed that the % of Mo/M ϕ and DCs are higher in the TG of infected than mock-infected WT mice (Fig. 1b), which differs from what occurs in TLR2/9^{-/-} mice. These leukocytes are important components of the innate immune system as they play a crucial role in activating the antiviral cell-mediated immune response and also in producing important immune mediators [29–31]. During HSV-1 primary infection they act limiting viral replication and maintaining the latency state but also, activating the adaptive immune response [32]. Macrophages are especially important in phagocyte infected and apoptotic cells but also through the release of pro-inflammatory cytokines, as well as other immune mediators such as nitric oxide [33, 34]. Dendritic cells, in turn, are crucial for antigen presentation and,

thus, trigger the adaptive immune response as was previously reported [35–38].

Furthermore, we showed that both the IL-1 β mRNA [8] and protein level (Fig. 2b) are higher in the TG of infected than mock-infected WT mice. There was a drastic decrease in IL-1 β in TLR2/9^{-/-} mice (Fig. 2b). This shows that IL-1 β production is probably not down modulated by viral post-transcriptional modification, since HSV-1 is a complex virus with several evasion mechanisms, including inhibition of the translation of host proteins [39–41]. Importantly, it was discovered that among the studied cells, DCs in the TG of WT mice were the major cells producing IL-1 β (Fig. 2b and Additional file 1: Figure S1a). As IL-1 β is a cytokine with a major role to initiate the inflammatory process after an infection [42–44], this was also showed during the HSV-1 infection. Likewise, previous studies revealed that IL-

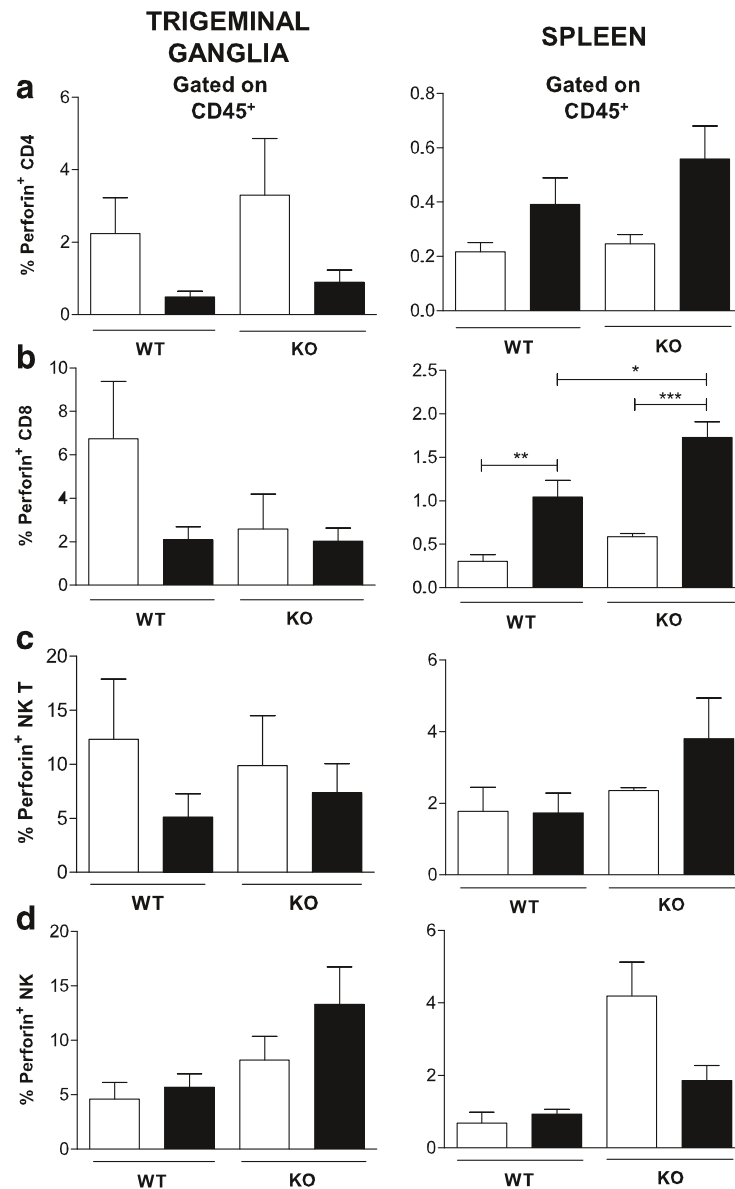


Fig. 8 Perforin is produced by CD8⁺ T lymphocytes in the spleen of C57BL/6 mice after infection. Groups of C57BL/6 (WT) and TLR2/9^{-/-} (KO) mice (6 animals/group) were infected with 10⁶ p.f.u. HSV-1 via the intranasal route and, on the 5th day post infection, mice were euthanized, and TG and spleen cell suspensions prepared for flow cytometry analysis. The frequency of each cell within the live leukocyte population was determined. **a** Frequencies of perforin-producing CD4⁺ T cells (CD45⁺CD3⁺CD4⁺); **b** CD8⁺ T cells (CD45⁺CD3⁺CD8⁺); **c** NK T cells (CD45⁺CD3⁺NK1.1⁺) and **d** NK cells (CD45⁺NK1.1⁺). A minimum of 100,000 events was acquired for analysis. White bars: mock-infected mice; black bars: infected mice. Bars show the means ± SEM. * p < 0.05; ** p < 0.01 and *** p < 0.001

1 β deficiency is lethal to mice and demonstrated its important role in repairing pathological insults due to HSV-1 infection within the central nervous system [45, 46]. In TLR2/9^{-/-} mice the decreased IL-1 β level could be one of the reasons for their highly mortality [8].

Zolini and collaborators (2014) [6], in addition to highlighting the TLR-dependence, showed that macrophages are the producers of iNOS, an important host defense

protein [47, 48] in the TG. We confirmed that Mo/M ϕ were the primary iNOS-producing cells (Fig. 3a, b and Additional file 2: Figure S2) in the TG and that DCs were not good producers of iNOS. Other studies have also highlighted the important role of this molecule in host defense and indicate M ϕ as the main source, which is in line with our results [33, 34, 49, 50]. In other words, IL-1 β together with iNOS is essential in mediating the local

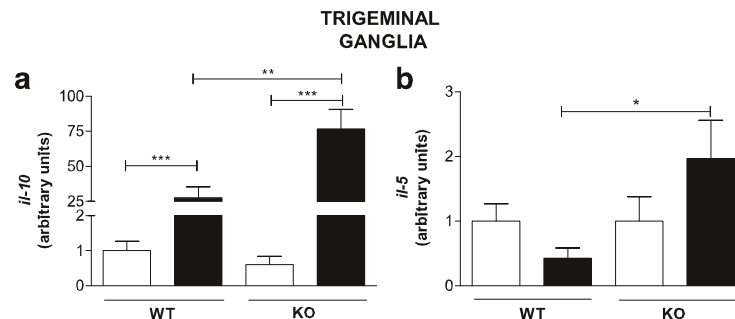


Fig. 9 The immune response in TLR2/9^{-/-} mice appears to be a mix of Th1/ Th2 response. IL-10 a and IL-5 b mRNAs levels were measured in TG homogenates from C57BL/6 (WT) and TLR2/9^{-/-} (KO) mice on day 5 post infection (10⁶ p.f.u. of HSV-1) by qPCR. The expression results use arbitrary units for the ratio of target gene mRNA to the endogenous control, HPRT. Data are representative of two independent experiments with similar results. n = 9–19 mice/group. White bars: mock-infected groups. Black bars: infected groups. Bars show the means ± SEM. * p < 0.05; ** p < 0.01 and *** p < 0.001

(TG), but not systemic (spleen), immune response against HSV-1. Additionally, these two molecules are TLR2/9 dependent, as TLR2/9^{-/-} mice produce them at low levels (Figs. 2 and 3), and, in contrast to WT mice, these mice died after infection [8].

IFN-β transcript, however, is detected in both WT and TLR2/9^{-/-} mice in the TG on the 5th day after infection (Fig. 4), indicating that this response seems to be TLR-independent. However, at the beginning of the infection, the type I IFN (IFN-α and IFN-β) mRNA levels in the lung of WT mice were higher than those in the infected TLR2/9^{-/-} mice (Fig. 5a, b). As the response of these cytokines occurs early during a viral infection, their mRNA levels were down regulated in the lungs of TLR2/9^{-/-} mice in the first hours after intranasal infection. In other studies [32, 51–54] it was demonstrated that type I IFNs certainly play an essential role in the immune response in restricting viral infections and shaping the adaptive immune response.

Down regulation of the levels of IL-1β and iNOS in TG occurs simultaneously with overexpression of other molecules as MCP-1 and granzyme B in TLR2/9^{-/-} infected mice. The increase in MCP-1 mRNA levels after HSV-1 infection was already observed in the TG of TLR2/9^{-/-} mice in our previous study [8]; however, in the present work, the increase in MCP-1 was confirmed at the protein level in the TG and spleen as well (Fig. 6a, b). Thus, MCP-1 seems not to depend on TLRs to be expressed/produced. Alternatively, MCP-1 down regulation could depend on these receptors, since its mRNA and protein levels are higher in TLR2/9^{-/-} mice than WT mice after infection. As MCP-1 attracts monocytes, basophils, NK and T cells, its presence at these initial sites of HSV-1 infection could play a role in preventing the spread of virus to neighboring tissues [55], but these cells in TLR2/9^{-/-} mice lack functional TLR2 and TLR9, resulting in nonfunctional cells and in a nonfunctional

immune response. Several studies have highlighted the relevance of MCP-1 in mediating the immune response against HSV-1, however its exactly role is not yet completely understood [25, 56–59].

Since our previous studies have indicated the importance of IFN-γ-producing CD8⁺ T cells in the control of HSV-1 infection in WT mice [8], we decided to evaluate the role of the granzyme B and perforin molecules and identify the primary cells producing these molecules. Notably, granzyme B (a serine protease) and perforin (a pore-forming protein) are important components of the immune response, as they confer the cytotoxic activity of NK cells and CD8⁺ T lymphocytes [60–62]. Moreover, these molecules, when released within the target cell, cause DNA fragmentation and rapid loss of membrane integrity, leading to cell apoptosis and, consequently, viral clearance [63, 64]. It was shown that granzyme B mRNA levels in the TG and spleen of infected WT mice were higher than those in mock-infected animals (Fig. 7a). The TLR2/9^{-/-} infected mice also showed a higher mRNA level of granzyme B than mock-infected mice and even a higher level than the WT mice. Thus, this high level of granzyme B in TLR2/9^{-/-} mice together with lower production of IL-1β and iNOS is not sufficient to control the infection, resulting in mortality (as reported in [8]). It was shown that among the studied cells, NK and CD8⁺ T cells are the major cells producing granzyme B in the TG, while in the spleen only the NK cells produced it (Fig. 7e, f). In TLR2/9^{-/-} mice TG large amount of granzyme B was produced by NK T, NK and CD8⁺ cells after infection (Fig. 7c, e-f). The production of granzyme B by NK T cells from the spleen of TLR2/9^{-/-} mice was even higher than that observed in the WT mice (Fig. 7c). In a more general analysis of the number of leukocytes producing granzyme B in the TG and spleen in the WT and TLR2/9^{-/-} infected mice, the production of granzyme B was higher in

the TLR2/9^{-/-} mice than in the WT mice (Fig. 7b). Thus, in the WT infected mice, granzyme B could be mediating cell cytotoxic activity, regulating the immune response and interfering in HSV-1 reactivation in the TG, as previously evidenced in other studies [61, 65–67]. In contrast, in the infected TLR2/9^{-/-} mice, the high level of granzyme B could be contributing to an exacerbated immune response and the pathogenesis of the infection, contributing to animal death [68]. However, the regulation of perforin is different, with consistent basal production by all tested cells (CD4⁺, CD8⁺, NK T and NK cells) in the TG of mock-infected WT mice (Fig. 8a–d, left). This was also observed in the TG of TLR2/9^{-/-} mice (Fig. 8a–d, left). However, in the spleen, perforin was differentially produced by CD8⁺ T cells, which exhibited an increased % of perforin-positive cells after HSV-1 infection in both WT and TLR2/9^{-/-} mice (Fig. 8b, right). Thus, in the TG of WT mice, the basal levels of perforin seemed to be sufficient for its role in mediating cytotoxicity activity [63, 69, 70], or if the release of granzyme B occurs in a perforin-independent manner, it would not be necessarily functional [63, 71, 72]. However, in the TLR2/9^{-/-} mice, perforin possibly was not acting in viral clearance but contributing to the immunopathogenesis of infection, as previously described [63, 73, 74].

Another remarkable finding was that the IL-10 mRNA levels, which plays an important role in controlling the levels of pro-inflammatory cytokines [75–77] were higher in the TG of both WT and TLR2/9^{-/-} mice after HSV-1 infection (Fig. 9a). The mRNA levels were even higher in the TLR2/9^{-/-} mice than in the WT mice. Thus, IL-10 does not seem to depend on TLRs to increase its mRNA levels, or perhaps down regulation is TLR dependent. During HSV-1 infections, IL-10 was shown to control the production of immune mediators by microglial cells and corneal immunopathology in stromal keratitis [78–80]. Thus, the high levels of IL-10 mRNA observed in the TG of TLR2/9^{-/-} mice could be an attempt to control the exacerbated immune response triggered by the cells that were attracted by the high levels of MCP-1, whereas in the WT mice, its expression could be sufficient to control the immune response triggered by HSV-1. Surprisingly, increased levels of IL-5 mRNAs were observed in the TG of infected compared to mock-infected TLR2/9^{-/-} mice and also compared to WT infected mice (Fig. 9b). IL-5 is an important component of the Th2 immune response that is known to act not only in response to extracellular parasites and allergens but also in maintaining metabolic homeostasis and tissue repair [81, 82]. Type 2 immune responses are also known to play a regulatory role in limiting type 1 immune responses and the extent of its damage, as well

[83]. IL-5, produced primarily by T helper type 2 cells and mast cells, induces B cell differentiation into antibody-producing cells and enhances the proliferation and differentiation of eosinophils [84, 85]. However, the production of IL-5 during an immune response can also lead to tissue damage, mainly through the excess activity of eosinophils [86, 87]. Therefore, the high IL-5 mRNA levels in the TG of TLR2/9^{-/-} infected mice could be contributing to their ineffective immune response.

Conclusions

Altogether, this work has highlighted, among the studied cells, the main cells (DCs, Mo/MΦ, CD8⁺ T lymphocytes) that produce the molecules (IL-1β; iNOS, granzyme B) in the key organ (TG) of the body that controls the immune response against HSV-1. Additionally, it was shown that, very early after infection, type I IFNs (IFN-α and IFN-β) are expressed by cells in virus-infected tissue and, also, that MCP-1 chemokine showed to be important in the HSV-1 response, since it attracts the immune cells to the site of infection. Beyond uncovering more knowledge about the host response to HSV-1, these data could help scientists develop efficient vaccines, treatments or diagnostic and prognostic approaches for HSV-1.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. Representative FACS density plots showing the gate strategy for the identification of IL-1β within CD11c⁺ MHCII^{high} gated on live CD45⁺ leucocytes in the trigeminal ganglia (a) and spleen (b) from a single HSV1-infected WT mouse. A minimum of 100,000 events was acquired for analysis. (PPTX 386 kb)

Additional file 2: Figure S2. Representative FACS density plots showing the gate strategy for the identification of iNOS within F4/80⁺ gated on live CD45⁺ leucocytes in the trigeminal ganglia (a) and spleen (b) from a single HSV1-infected WT mouse. A minimum of 100,000 events was acquired for analysis. (PPTX 2700 kb)

Abbreviations

CBA: Cytometric bead array; DCs: Dendritic cells; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium; dpi: Day post infection; FACS buffer: PBS with 2% FBS; FBS: Fetal bovine serum; GRZ-b: Granzyme B; HPRT: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; HSV-1: Herpes simplex virus type 1; IFN: Interferon; IL: Interleukin; iNOS: Nitric oxide synthase; m.o.i.: Multiplicity of infection; MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1; Mo/MΦ: Monocyte/macrophage; MyD88: Myeloid differentiation factor 88; MΦ: Macrophage; NK: Natural killer; NO: Nitric oxide; p.f.u.: Plaque-forming unit; PAMPs: Pathogen-associated molecular patterns; PBS: Phosphate-buffered saline; PRRs: Pattern recognition receptors; qPCR: Quantitative PCR; RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium; RT: Reverse transcription; TG: Trigeminal ganglia; TLR2/9^{-/-}: TLR2 and TLR9 knockout; TLR2^{-/-}: TLR2 knockout; TLR9^{-/-}: TLR9 knockout; TLRs: Toll-like receptors; WT: Wild type

Acknowledgements

Funding

Work supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brazil, to MAC, MMF and EGK), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil, to AMVM, EGK, LRVA, MMF and MAC), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Vacinas/

CNPq/FAPEMIG (INCTV/CNPq/FAPEMIG; Brazil, to AMVM, LRVA, MAC), and the Programa Estratégico de Pesquisa em Saúde VI (PAPES)/FIOCRUZ/CNPq (Brazil, to MAC). AMVM, EGK, LRVA and MAC are Fellows from CNPq. The authors thank the program for technological development in tools for health-PDTIS-FIOCRUZ for the use of its facilities.

Availability of data and materials

All data and informations are available without restriction and included in the manuscript and supplementary figures.

Authors' contributions

AMVM, EGK, LRVA and MAC conceived and designed the experiments. AMF, BSASS, GKL, MMF, NL, NLP, performed the experiments. NL performed the statistical analyses. EGK, LRVA, NL, MMF and MAC analyzed the data. EGK, MAC and LRVA contributed reagents, materials, and analysis tools. NL, EGK, LRVA and MAC wrote the paper. Correspondent author: MAC. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Ethics approval and consent to participate

This project was approved by the Ethical Committee of Animal Handling (CEUA) from FIOCRUZ, Brazil (LW -6/11 and LW-20/15).

Author details

¹Imunologia de Doenças Virais, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, FioCruz, Avenida Augusto de Lima 1715, Belo Horizonte 30190-002, MG, Brazil. ²Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil. ³Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil. ⁴Biologia e Imunologia Parasitária, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, FioCruz, Avenida Augusto de Lima 1715, Belo Horizonte 30190-002, MG, Brazil.

Received: 6 December 2016 Accepted: 18 January 2017

Published online: 21 February 2017

References

1. Arduino PG, Porter SR. Herpes simplex virus type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features. *J Oral Pathol Med*. 2008;37:107–21.
2. Pellett PE, Roizman B. Herpesviridae. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 1802–22.
3. Janeway Jr CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197–216.
4. Andersen LL, Mørk N, Reinert LS, Kofod-Olsen E, Narita R, Jørgensen SE, et al. Functional IRF3 deficiency in a patient with herpes simplex encephalitis. *J Exp Med*. 2015;212:1371–9.
5. Lim HK, Seppänen M, Hautala T, Ciancanelli MJ, Itan Y, Lafaille FG, et al. TLR3 deficiency in herpes simplex encephalitis: high allelic heterogeneity and recurrence risk. *Neurology*. 2014;83:1888–97.
6. Zolini GP, Lima GK, Lucinda N, Silva MA, Dias MF, Pessoa NL, et al. Defense against HSV-1 in a murine model is mediated by iNOS and orchestrated by the activation of TLR2 and TLR9 in trigeminal ganglia. *J Neuroinflammation*. 2014;11:20.
7. Sancho-Shimizu V, de Diego RP, Lorenzo L, Halwani R, Alangari A, Israelsson E, et al. Herpes simplex encephalitis in children with autosomal recessive and dominant TRIF deficiency. *J Clin Invest*. 2011;121:4889–902.
8. Lima GK, Zolini GP, Mansur DS, Lima BHF, Wischhoff U, Astigarraga RG, et al. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR9 expressed in trigeminal ganglia are critical to viral control during Herpes simplex virus 1 infection. *Am J Pathol*. 2010;177:2433–45.
9. Mansur DS, Kroon EG, Nogueira ML, Arantes RME, Rodrigues SCO, Akira S, et al. Lethal encephalitis in myeloid differentiation factor 88-deficient mice infected with Herpes simplex virus 1. *Am J Pathol*. 2005;166:1419–26.
10. Chew T, Taylor KE, Mossman KL. Innate and adaptive immune responses to herpes simplex virus. *Viruses*. 2009;1:979–1002.
11. Paludan SR, Bowie AG, Horan KA, Fitzgerald KA. Recognition of herpesviruses by the innate immune system. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:143–54.
12. Levy DE, Marié IJ, Durbin JE. Induction and function of type I and III interferon in response to viral infection. *Curr Opin Virol*. 2011;1:476–86.
13. Delhaye S, Paul S, Blakqori G, Minet M, Weber F, Staeheli P, et al. Neurons produce type I interferon during viral encephalitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:7835–40.
14. Stetson DB, Medzhitov R. Type I interferons in host defense. *Immunity*. 2006;25:373–81.
15. 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;103:1433–8.
16. Le Bon A, Tough DF. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr Opin Immunol*. 2002;14:432–6.
17. Dhuria SV, Hanson LR, Frey WH. Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. *J Pharm Sci*. 2010;99:1654–73.
18. Aoyagi H, Tsuchikawa K, Iwasaki S. Three-dimensional observation of the mouse embryo by micro-computed tomography: composition of the trigeminal ganglion. *Odontology*. 2010;98:26–30.
19. Dando SJ, Mackay-Sim A, Norton R, Currie BJ, St John JA, Ekberg JAK, et al. Pathogens penetrating the central nervous system: infection pathways and the cellular and molecular mechanisms of invasion. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27:691–726.
20. Nogueira ML, Carvalho AF, Barbosa EF, Bonjardim CA, Ferreira PCP, Kroon EG. Diagnosis of mucocutaneous herpetic infections by PCR without DNA extraction. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1998;93:213–4.
21. 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.
22. 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.
23. Casrouge A, Zhang S-Y, Eidschchenk C, Jouanguy E, Puel A, Yang K, et al. Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-93B deficiency. *Science*. 2006;314:308–12.
24. Hochrein H, Schlatter B, O'Keeffe M, Wagner C, Schmitz F, Schiemann M, et al. Herpes simplex virus type-1 induces IFN- α production via toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:11416–21.
25. Kurt-Jones EA, 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 U S A*. 2004;101:1315–20.
26. Zhang S-Y, Jouanguy E, Ugolini S, Smahi A, Elain G, Romero P, et al. TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science*. 2007;317:1522–7.
27. Sørensen 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*. 2008;181:8604–12.
28. Sato A, Linehan MM, Iwasaki A. Dual recognition of herpes simplex viruses by TLR2 and TLR9 in dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:17343–8.
29. Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol*. 2015;16:343–53.
30. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:723–37.
31. Mildner A, Jung S. Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity*. 2014;40:642–56.
32. Egan KP, Wu S, Wiggdahl B, Jennings SR. Immunological control of herpes simplex virus infections. *J Neurovirol*. 2013;19:328–45.
33. Ellermann-Eriksen S. Macrophages and cytokines in the early defence against herpes simplex virus. *Virol J*. 2005;2:59.
34. Kodukula P, Liu T, Rooijen NV, Jager MJ, Hendricks RL. Macrophage control of herpes simplex virus type 1 replication in the peripheral nervous system. *J Immunol*. 1999;162:2895–905.
35. Mott KR, Ghiasi H. Role of dendritic cells in enhancement of herpes simplex virus type 1 latency and reactivation in vaccinated mice. *Clin Vaccine Immunol*. 2008;15:1859–67.
36. Mott KR, Allen SJ, Zandian M, Konda B, Sharifi BG, Jones C, et al. CD8 α dendritic cells drive establishment of HSV-1 latency. *Plos One*. 2014;9:e93444.
37. Donaghy H, Bosnjak L, Harman AN, Marsden V, Tyring SK, Meng T, et al. Role for plasmacytoid dendritic cells in the immune control of recurrent human herpes simplex virus infection. *J Virol*. 2009;83:1952–61.

38. Yoneyama H, Matsuno K, Toda E, Nishiwaki T, Matsuo N, Nakano A, et al. Plasmacytoid DCs help lymph node DCs to induce anti-HSV CTLs. *J Exp Med*. 2005;202:425–35.
39. Melchjorsen J, Matikainen S, Paludan SR. Activation and evasion of innate antiviral immunity by herpes simplex virus. *Viruses*. 2009;1:737–59.
40. Su C, Zhan G, Zheng C. Evasion of host antiviral innate immunity by HSV-1, an update. *Virol J*. 2016;13:38.
41. Suazo PA, Ibañez FJ, Retamal-Díaz AR, Paz-Fiblas MV, Bueno SM, Kalergis AM, et al. Evasion of early antiviral responses by herpes simplex viruses. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:1–16.
42. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:519–50.
43. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*. 2013;39:1003–18.
44. Shafteel SS, Griffin WST, O'Banion MK. The role of interleukin-1 in neuroinflammation and alzheimer disease: an evolving perspective. *J Neuroinflammation*. 2008;5:7.
45. Mason JL, Suzuki K, Chaplin DD, Matsushima GK. Interleukin-1 β promotes repair of the CNS. *J Neurosci*. 2001;21:7046–52.
46. Sergerie Y, Rivest S, Boivin G. Tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β play a critical role in the resistance against lethal herpes simplex virus encephalitis. *J Infect Dis*. 2007;196:853–60.
47. Bogdan C, Röllinghoff M, Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev*. 2000;173:17–26.
48. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*. 2001;2:907–16.
49. Gamba G, Cavalieri H, Courreges MC, Massouh EJ, Benencia F. Early inhibition of nitric oxide production increases HSV-1 intranasal infection. *J Med Virol*. 2004;73:313–22.
50. Maclean A, Wei XQ, Huang FP, Al-Alem UAH, Chan WL, Liew FY. Mice lacking inducible nitric-oxide synthase are more susceptible to herpes simplex virus infection despite enhanced Th1 cell responses. *J Gen Virol*. 1998;79:825–30.
51. Low-Calle AM, Prada-Arismendi J, Castellanos JE. Study of interferon- β antiviral activity against herpes simplex virus type 1 in neuron-enriched trigeminal ganglia cultures. *Virus Res*. 2014;180:49–58.
52. Rosato PC, Leib DA. Neuronal interferon signaling is required for protection against herpes simplex virus replication and pathogenesis. *Plos Pathog*. 2015;11:e1005028.
53. Steiner I, Benninger F. Update on herpes virus infections of the nervous system. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2013;13:414–8.
54. Wang JP, Bowen GN, Zhou S, Cerny A, Zacharia A, Knipe DM, et al. Role of specific innate immune responses in herpes simplex virus infection of the central nervous system. *J Virol*. 2012;86:2273–81.
55. Hosking MP, Lane TE. The role of chemokines during viral infection of the CNS. *Plos Pathog*. 2010;6:1–4.
56. 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;77:10037–46.
57. Carr DJJ, Tomanek L. Herpes simplex virus and the chemokines that mediate the inflammation. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;303:47–65.
58. Wuest TR, Carr DJJ. Dysregulation of CXCR3 signaling due to CXCL10 deficiency impairs the anti-viral response to HSV-1 infection. *J Immunol*. 2008;181:7985–93.
59. Wuest TR, Thapa M, Zheng M, Carr DJJ. CXCL10 expressing hematopoietic-derived cells are requisite in defense against HSV-1 infection in the nervous system of CXCL10 deficient mice. *J Neuroimmunol*. 2011;234:103–8.
60. Ida H, Utz PJ, Anderson P, Eguchi K. Granzyme B and natural killer (NK) cell death. *Mod Rheumatol*. 2005;15:315–22.
61. Salti SM, Hammelev EM, Grewal JL, Reddy ST, Zemple SJ, Grossman WJ, et al. Granzyme B regulates antiviral CD8+ T cell responses. *J Immunol*. 2011;187:6301–9.
62. Voskoboinik I, Dunstone MA, Baran K, Whistock JC, Trapani JA. Perforin: structure, function, and role in human immunopathology. *Immunol Rev*. 2010;235:35–54.
63. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:735–47.
64. Wagner C, Iking-Konert C, Deneffle B, Stegmaier S, Hug F, Hansch GM. Granzyme B and perforin: constitutive expression in human polymorphonuclear neutrophils. *Blood*. 2004;103:1099–104.
65. Grubor-Bauk B, Arthur JL, Mayrhofer G. Importance of NKT cells in resistance to herpes simplex virus, fate of virus-infected neurons, and level of latency in mice. *J Virol*. 2008;82:11073–83.
66. Knickelbein JE, Khanna KM, Yee MB, Baty CJ, Kinchington PR, Hendricks RL. Noncytotoxic lytic granule-mediated CD8+ T cell inhibition of HSV-1 reactivation from neuronal latency. *Science*. 2008;322:268–71.
67. Pereira RA, Simon MM, Simmons A, Granzyme A, a noncytolytic component of CD8(+) cell granules, restricts the spread of Herpes simplex virus in the peripheral nervous systems of experimentally infected mice. *J Virol*. 2000;74:1029–32.
68. Hiebert PR, Granville DJ. Granzyme B in injury, inflammation, and repair. *Trends Mol Med*. 2012;18:732–41.
69. Matloubian M, Suresh M, Glass A, Galvan M, Chow K, Whitmire JK, et al. A role for perforin in downregulating T-cell responses during chronic viral infection. *J Virol*. 1999;73:2527–36.
70. Kawamura K, Kadowaki N, Kitawaki T, Uchiyama T. Virus-stimulated plasmacytoid dendritic cells induce CD4+ cytotoxic regulatory T cells. *Blood*. 2006;107:1031–8.
71. Kogo J, Takeba Y, Kumai T, Kitaoka Y, Matsumoto N, Ueno S, et al. Involvement of TNF- α in glutamate-induced apoptosis in a differentiated neuronal cell line. *Brain Res*. 2006;1122:201–8.
72. Motyka B, Korbitt G, Pinkoski MJ, Heibin JA, Caputo A, Hobman M, et al. Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell*. 2000;103:491–500.
73. Chang E, Galle L, Maggs D, Estes DM, Mitchell WJ. Pathogenesis of herpes simplex virus type 1-induced corneal inflammation in perforin-deficient mice. *J Virol*. 2000;74:11832–40.
74. Johnson AJ, Chu C-F, Milligan GN. Effector CD4+ T-cell involvement in clearance of infectious herpes simplex virus type 1 from sensory ganglia and spinal cords. *J Virol*. 2008;82:9678–88.
75. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the Interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:683–765.
76. O'Garra A, Vieira P. TH1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:425–8.
77. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:71–109.
78. Marques CP, Hu S, Sheng W, Cheeran MC-J, Cox D, Lokensgard JR. Interleukin-10 attenuates production of HSV-induced inflammatory mediators by human microglia. *Glia*. 2004;47:358–66.
79. Sarangi PP, Sehrawat S, Suvas S, Rouse BT. IL-10 and natural regulatory T cells: two independent anti-inflammatory mechanisms in herpes simplex virus-induced ocular immunopathology. *J Immunol*. 2008;180:6297–306.
80. Tumpey TM, Elnor VM, Chen SH, Oakes JE, Lausch RN. Interleukin-10 treatment can suppress stromal keratitis induced by herpes simplex virus type 1. *J Immunol*. 1994;153:2258–65.
81. Ivanova EA, Orekhov AN. T helper lymphocyte subsets and plasticity in autoimmunity and cancer: an overview. *Biomed Res Int*. 2015;2015:327470.
82. Zhou L, Chong MMW, Littman DR. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity*. 2009;30:646–55.
83. Wynn TA. Type 2 cytokines: mechanisms and therapeutic strategies. *Nat Rev Immunol*. 2015;15:271–82.
84. Kouro T, Takatsu K. IL-5 and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy. *Int Immunol*. 2009;21:1303–9.
85. Moon B, Takaki S, Miyake K, Takatsu K. The role of IL-5 for mature B-1 cells in homeostatic proliferation, cell survival, and Ig production. *J Immunol*. 2004;172:6020–9.
86. Lee JJ, Jacobsen EA, McGarry MP, Schleimer RP, Lee NA. Eosinophils in health and disease: the LIAR hypothesis. *Clin Exp Allergy*. 2010;40:563–75.
87. Tanaka H, Komai M, Nagao K, Ishizaki M, Kajiwara D, Takatsu K, et al. Role of interleukin-5 and eosinophils in allergen-induced airway remodeling in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004;31:62–8.

RESEARCH

Open Access

Defense against HSV-1 in a murine model is mediated by iNOS and orchestrated by the activation of TLR2 and TLR9 in trigeminal ganglia

Guilherme Pimenta Zolini^{1†}, Graciela Kunrath Lima^{2†}, Natália Lucinda¹, Mariana Almeida Silva¹, Marcela França Dias¹, Natália Lima Pessoa¹, Bruna Pizzolo Coura¹, Christiane Teixeira Cartelle³, Rosa Maria Esteves Arantes³, Erna Geessien Kroon⁴ and Marco Antônio Campos^{1*}

Abstract

Background: Herpes simplex 1 (HSV-1) causes various human clinical manifestations, ranging from simple cold sores to encephalitis. Innate immune cells recognize pathogens through Toll-like receptors (TLRs), thus initiating the immune response. Previously, we demonstrated that the immune response against HSV-1 is dependent on TLR2 and TLR9 expression and on IFN gamma production in the trigeminal ganglia (TG) of infected mice. In this work, we further investigated the cells, molecules, and mechanisms of HSV-1 infection control, especially those that are TLR-dependent.

Methods: C57BL/6 wild-type (WT), TLR2^{-/-}, TLR9^{-/-}, and TLR2/9^{-/-} mice were intranasally infected with HSV-1. On the viral peak day, the TG and brains were collected from mice and TLR expression was measured in the TG and brain and inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression was measured in the TG by real-time PCR. Immunofluorescence assays were performed in mice TG to detect iNOS production by F4/80⁺ cells. Intraperitoneal macrophages nitric oxide (NO) production was evaluated by the Griess assay. WT, CD8^{-/-}, RAG^{-/-}, and iNOS^{-/-} mice were intranasally infected in a survival assay, and their cytokine expression was measured in the TG by real-time PCR.

Results: Infected WT mice exhibited significantly increased TLR expression, compared with their respective controls, in the TG but not in the brain. TLR-deficient mice had moderately increased TLR expression in the TG and brain in compare with the non-infected animals. iNOS expression in the WT infected mice TG was higher than in the other groups with increased production by macrophages in the WT infected mice, which did not occur in the TLR2/9^{-/-} mice. Additionally, the intraperitoneal macrophages of the WT mice had a higher production of NO compared with those of the TLR-deficient mice. The CD8^{-/-}, RAG^{-/-}, and iNOS^{-/-} mice had 100% mortality after the HSV-1 infection compared with 10% of the WT mice. Cytokines were overexpressed in the iNOS^{-/-} infected mice, while the RAG^{-/-} mice were nearly unresponsive to the virus.

Conclusion: TLRs efficiently orchestrate the innate immune cells, eliciting macrophage response (with NO production by the macrophages), thereby controlling the HSV-1 infection through the immune response in the TG of mice.

Keywords: Encephalitis, HSV-1, Innate immunity, Toll-like receptors, Host immune response

* Correspondence: marcoasc@cpqrr.fiocruz.br

†Equal contributors

¹Laboratório de Imunopatologia, Imunologia de Doenças Virais, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz, Av. Augusto de Lima 1715, Belo Horizonte, Minas Gerais 30190-002, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Virological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jviomet

Short communication

A simplified approach to construct infectious cDNA clones of a tobamovirus in a binary vector



Bruna Rayane Teodoro Junqueira^a, Cícero Nicolini^b, Natalia Lucinda^b,
Anelise Franco Orílio^b, Tatsuya Nagata^{a,*}

^a Pós-graduação em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, 70910-900 Brasília, DF, Brazil

^b Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, 70910-900 Brasília, DF, Brazil

a b s t r a c t

Article history:

Received 23 August 2013

Received in revised form 3 December 2013

Accepted 17 December 2013

Available online 31 December 2013

Keywords:

Tobamovirus

PMMoV

Full-length cDNA clone

Overlap-extension PCR

Infectious cDNA clones of RNA viruses are important tools to study molecular processes such as replication and host–virus interactions. However, the cloning steps necessary for construction of cDNAs of viral RNA genomes in binary vectors are generally laborious. In this study, a simplified method of producing an agro-infectious Pepper mild mottle virus (PMMoV) clone is described in detail. Initially, the complete genome of PMMoV was amplified by a single-step RT-PCR, cloned, and subcloned into a small plasmid vector under the T7 RNA polymerase promoter to confirm the infectivity of the cDNA clone through transcript inoculation. The complete genome was then transferred to a binary vector using a single-step, overlap-extension PCR. The selected clones were agro-infiltrated to *Nicotiana benthamiana* plants and showed to be infectious, causing typical PMMoV symptoms. No differences in host responses were observed when the wild-type PMMoV isolate, the T7 RNA polymerase-derived transcripts and the agroinfiltration-derived viruses were inoculated to *N. benthamiana*, *Capsicum chinense* PI 159236 and *Capsicum annuum* plants.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

Pepper mild mottle virus (PMMoV) is a member of the genus Tobamovirus that has a rod-shaped particle with single-stranded RNA genome in the positive sense polarity. Similar to the type member Tobacco mosaic virus (TMV), the RNA genome contains four open reading frames (ORF) (Alonso et al., 1991; Velasco et al., 2002). The ORF1 encodes a 126-kDa protein and terminates with an amber stop codon. This protein possesses methyltransferase and helicase activities and is also reported as a suppressor of PTGS (post-transcriptional gene silencing) (Lewandowski and Dawson, 2000; Tsuda et al., 2007; Souza et al., 2013). According to Alonso et al. (1991), part of the ORF1 extends by the ribosome read-through mechanism, resulting in a 183-kDa protein with the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) activity. These two proteins are involved in RNA replication and vascular-dependent movement (Derrick et al., 1997). The movement protein (MP) and the coat protein (CP) are translated from subgenomic RNAs. The MP (ORF3) is responsible for the cell-to-cell spread of the virus by modifying the size exclusion limit of plasmodesmatal junctions (Deom et al., 1990; Bendahmane et al., 2002). The CP (ORF4) has primarily the function of virion formation (Okada, 1999), and is essential for

long-distance movement of the virus through the vascular system (Saito et al., 1990; Ivanov and Mäkinen, 2012).

Infectious cDNA clones of plant RNA viruses are very useful tools for the basic study of viral replication, virus–host interactions and, more recently, for biotechnological purposes (Boyer and Haenni, 1994; Yusibov et al., 1999; Marillonnet et al., 2005; Lindbo, 2007). Reports of the first infectious clones of plant RNA viruses date back to the 80s. Ahlquist et al. (1984) in a milestone work constructed an infectious clone of the Brome mosaic virus (BMV), which was followed by many other infectious clones of plant RNA viruses. Typically, an infectious clone under the T7 RNA polymerase promoter, which normally requires an in vitro transcription step before inoculation, can be constructed by a simple RT-PCR procedure, since the T7 promoter can be incorporated in the forward primer (Staczek et al., 2000; Yoon et al., 2001; Wu et al., 2003; Fujiyama et al., 2006; Jiang et al., 2006; Chandran et al., 2010). Even though a full-length cDNA is obtained, Boyer and Haenni (1994) pointed out some factors that may influence the infectivity of the RNA transcripts, such as the presence of mutations in the sequence of both the 5' and 3' untranslated regions (UTRs). Despite the convenience in the cloning strategy and the smaller size of the resulting plasmids, this technique requires careful handling of the RNA transcripts which are more prone to degradation due to RNase activities.

An alternative approach that avoids in vitro synthesis of RNA uses agro-infectious clones: viral cDNA is inserted downstream of

* Corresponding author. Tel.: +55 61 31072980.

E-mail addresses: tatsuya@unb.br, tatunag@gmail.com (T. Nagata).

APÊNDICE II – Participação em Eventos

- Innate Immunity - XL Congress of the Brazilian Society of Immunology. Molecules role in TLR2/9 knockout mice immune response against Herpes simplex virus 1. 2015. (Congresso).
- III Jornada de Pós-Graduação do Centro de Pesquisa Renê Rachou. A expressão de iNOS e a produção de óxido nítrico (NO) são TLR-dependentes durante infecção por Herpes Simplex Virus 1. 2014. (Encontro).
- III Workshop do INCTV. Optimal immune response is mediated by CD8-IFN gamma production and macrophages-iNOS expression after interactions of Toll Like Receptors in Herpes simplex virus-1 (hsv-1) infection. 2012. (Simpósio).
- International Course and Workshop on Innate Immunity: From Vector Resistance to Human Disease. 2012. (Simpósio).

APÊNDICE III – Co-orientações

- Arthur Molinari Freitas. Importância de Interferons do tipo I na resposta imune inata de camundongos a infecção com Herpes simplex 1. Início: 2015. Iniciação científica (Graduando em Ciências Biológicas) - Centro Universitário UNA, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais. Orientador: Marco Antônio da Silva Campos. Co-orientador: Natália Lucinda.
- Ana Paula Garcia. Expressão de TLRs após infecção com HSV-1. 2015. Iniciação Científica. (Graduando em Biomedicina) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Marco Antônio da Silva Campos. Co-orientador: Natália Lucinda.
- Aline Roberta de Souza Diniz. Expressão de IFN tipo I após infecção com HSV-1. 2014. Iniciação Científica. (Graduando em Abi - Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Minas Gerais, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais. Orientador: Marco Antônio da Silva Campos. Co-orientador: Natália Lucinda.
- Mariana Cotta Vieira. Importância de Interferons do tipo I na resposta imune inata de camundongos a infecção com Herpes simplex 1. 2013. Iniciação

Científica. (Graduando em Ciências Biológicas) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais. Orientador: Marco Antônio da Silva Campos. Co-orientador: Natália Lucinda.

- Natália Lima Pessoa. Expressão de TLRs após infecção com HSV-1. 2012. Iniciação Científica. (Graduando em Abi - Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Minas Gerais, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Marco Antônio da Silva Campos. Co-orientador: Natália Lucinda.
- Bruna Pizziolo Coura. Expressão de IFN tipo I após infecção com HSV-1. 2012. Iniciação Científica. (Graduando em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Minas Gerais, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais. Orientador: Marco Antônio da Silva Campos. Co-orientador: Natália Lucinda.

ANEXOS

ANEXO I – Comissão de Ética no Uso de Animais: Licença LW-6/11



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de ReferênciaComissão 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).

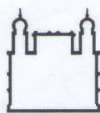
Mus musculus

- 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

ANEXO II – Comissão de Ética no Uso de Animais: Licença LW-20/15



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



Comissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-20/15

Certificamos que o protocolo (P-83/14-2), intitulado "Resposta à infecção por Herpes simplex vírus tipo 1 em modelo murino", 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 exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 27/04/2019 e inclui o uso total de :

Mus musculus

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

Mus musculus

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

Mus musculus

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

Mus musculus

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

Mus musculus

- 48 Machos de MYD-I-, Idade: 7 Semana(s), Peso: 20,0000 Grama(s).

Rio de Janeiro, 27 de abril de

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA

Octavio A. F. Presgrave
Coordenador
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 04626550
27/04/2015

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