

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**EXPRESSÃO GÊNICA DE MEDIADORES**  
**ASSOCIADOS A NEUROPATOGÊNESE CAUSADA**  
**PELO BHV5**

**Bruna Rezende Silva Martins de Oliveira**  
Enfermeira

ARAÇATUBA – SP  
2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**EXPRESSÃO GÊNICA DE MEDIADORES**  
**ASSOCIADOS A NEUROPATOGÊNESE CAUSADA**  
**PELO BHV5**

**Bruna Rezende Silva Martins de Oliveira**

**Orientadora: Profa. Dra. Tereza Cristina Cardoso**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

**ARAÇATUBA – SP**

**2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da FMVA / UNESP  
Bibliotecária Responsável: Isabel Pereira de Matos - CRB8-5613

O48e      Oliveira, Bruna Rezende Silva Martins de  
             Expressão gênica de mediadores associados a  
             neuropatogênese causada pelo BHV5 / Bruna Rezende Silva  
             Martins de Oliveira. – Araçatuba: [s.n.], 2018.  
             40 f.

             Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
             Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba.

             Orientadora: Profa. Dra. Tereza Cristina Cardoso

             1. Bovino. 2. Encefalite viral. 3. Virologia. 4. Herpesvírus.  
             5. microRNAs. I. Título.

CDD 616.9364



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Expressão gênica de mediadores associados a neuropatogênese causada pelo BVH5

AUTORA: BRUNA REZENDE SILVA MARTINS DE OLIVEIRA

ORIENTADORA: TEREZA CRISTINA CARDOSO DA SILVA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. TEREZA CRISTINA CARDOSO DA SILVA

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Prof. Dr. ROBERTO GAMEIRO DE CARVALHO

Departamento de Apoio Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. ANDRÉA FONTES GARCIA

Curso de Medicina Veterinária / Centro Católico Auxilium - UNISALESIANO/Araçatuba

Pós-doutoranda ANA CAROLINA BORSANELLI

Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. JAMILA CRISTINA BAPTISTELLA

Curso de Medicina Veterinária / Sociedade Educacional de Santa Catarina - UNISOCIESC

Araçatuba, 16 de julho de 2018.

## **DADOS CURRICULARES**

**BRUNA REZENDE SILVA MARTINS DE OLIVEIRA**– nascida no dia 04 de fevereiro de 1990, no município de São José do Rio Preto-SP, graduou-se em Enfermagem (2011) pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Ingressou no Programa de Mestrado em Ciência Animal em agosto de 2012, na área de Fisiopatologia Médica e Cirúrgica sob orientação do Prof. Dr. Mário Jefferson Quirino Louzada, então docente do campus de Araçatuba, Laboratório de Biofísica. Durante o mestrado recebeu premiação em 1º lugar “Prêmio Sérgio Ragi Eis de Incentivo à Pesquisa Clínica em Osteoporose e Osteometabolismo, pela Associação Brasileira de Avaliação Óssea e Osteometabolismo, com o trabalho “Consumo excessivo de leite de soja afeta o desenvolvimento ósseo” (Dissertação de Mestrado). Durante esse período foi bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, em regime de dedicação exclusiva (09/2012 à 07/2014). Realizou Especialização em Docência pela Universidade Anhembí Morumbi (2013); Especialização em Gestão em Saúde pela Escola Superior de Saúde Pública (2015); e Especialização em Docência no Ensino Técnico e Superior (2016) pelo Centro Universitário Toledo. Atuou como docente nas Faculdades Integradas de Três Lagoas-MS (2013-2014). Ingressou no doutorado em março de 2015, pelo mesmo Programa em que realizou mestrado, sob orientação da Profa Dr<sup>a</sup> Tereza Cristina Cardoso, docente na Faculdade de Medicina Veterinária, campus de Araçatuba da UNESP, responsável pelo Laboratório de Virologia.

## EPÍGRAFE

“Inteligência é a capacidade de se adaptar à mudança.”

Stephen Hawking

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho ao meu avô  
José Pedro da Silva (in memorian),  
exemplo de caráter e dignidade, todo  
meu amor e gratidão.

## **AGRADECIMENTOS**

A minha orientadora Professora Doutora Tereza Cristina Cardoso pela oportunidade de realização dessa importante etapa acadêmica. Pelo incentivo à pesquisa, realização deste e outros trabalhos, por todo aconselhamento durante este período.

Ao Professor Doutor Mário Jefferson Quirino Louzada, pela amizade e orientação científica e pessoal, por ter aberto portas essenciais, me acolhido.

Ao Pedro Luís Florindo, pelo carinho, amizade e ajuda em procedimentos técnicos.

Aos Professores Doutores Roberto Gameiro e Kátia Denise por fazerem parte da banca do Exame Geral de Qualificação. Agradeço pelas correções e sugestões para aprimorar este trabalho.

A Professora Doutora Cristina Maria Monteiro e Professor Doutor Roberto Gameiro, pelo conhecimento compartilhado durante o estágio de docência e vivência acadêmica.

Ao Professor Doutor Luiz Eduardo Fonseca, pela amizade e suporte no estágio de docência.

Aos professores e amigos Wagner André Pedro, Sérgio Diniz Garcia, Fabiano Cadioli: por todas as palavras de conforto, pela preocupação e carinho para comigo.

Aos Professores da Faculdade de Medicina Veterinária e Odontologia.

Aos companheiros de laboratório de virologia Ana Carolina Rosa, Flávia Vieira,

Lucas Okamura, obrigada pela convivência agradável.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, do STAEP, da Biblioteca pela contribuição e orientações para com este estudo.

Ao Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba.

A Universidade Estadual Paulista, por ter sido o maior instrumento dessa etapa.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo apoio financeiro a minha pessoa.

A minha irmã Fernanda pelo amor fraterno e constante. Pelo companheirismo deste o mestrado, me auxiliando desde os ensaios de apresentação até organização e presença no EGQ e defesa.

Aos meus pais, Cláudio e Meiry, que sempre estiveram presentes mesmo que distantes, prestando apoio além do necessário. Não há palavras que se aproximem da dimensão do meu amor e gratidão.

Ao meu namorado, Oscar Neto, por todo apoio, compressão e amor.

Ao meu avô, José Pedro da Silva (*in memoriam*), que recentemente nos deixou e que se orgulhava em dizer que tinha uma neta “doutora”, continuará sendo sempre minha inspiração na vida.

Agradeço a todas as pessoas que de modo direto ou indireto participaram na realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                                                         |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>CAPÍTULO 1.....</b>                                                                                                                                                                                  | <b>12</b> |
| <b>1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>                                                                                                                                                                      | <b>12</b> |
| <b>1.1 Herpes vírus bovino 5.....</b>                                                                                                                                                                   | <b>12</b> |
| <b>1.2 Receptores Toll-like .....</b>                                                                                                                                                                   | <b>15</b> |
| <b>1.3 MicroRNAs.....</b>                                                                                                                                                                               | <b>19</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                                                                                                                                                | <b>23</b> |
| <b>CAPÍTULO 2 – Expression of miR-155 associated with Toll-like receptors<br/>3, 7, and 9 transcription in the olfactory bulbs of cattle naturally infected<br/>with BHV5 – (artigo publicado).....</b> | <b>33</b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS

BHV1= Herpervírus bovino tipo 1

BHV5= Herpervírus bovino tipo 5

IFN- $\gamma$ = Interferon

IgE= imunoglobulina E

IKB= proteína inibitória kappa

IKK= enzima kinase

IL-10= interleucina 10

IL-13= interleucina 13

IL-2= interleucina 2

IL-4= interleucina 4

IL-5= interleucina 5

IL-6= interleucina 6

IL-9= interleucina 9

IRF-3= Interferon regulatory factor 3

IRF-5= Interferon regulatory factor 5

IRF-7= Interferon regulatory factor 7

LRR= Leucine-rich repeat

miR= micro RNA

mRNA= RNA mensageiro

MyD88= Fator de diferenciação mielóide

ncRNA= RNA não-codificante

NK= Natural Killer Cell

PAMP= Padrões Moleculares Associados à Patógenos

pri-miRNA= RNA primário

PRR= Pathern Recognition Receptors

RNA RISC= RNA-induced silencing complex

RNAse= Ribonuclease

rRNA= RNA ribossomal

siRNA= small interfering RNA

snRNA= small nuclear RNA

TIR= Translocated intimin receptor

TIRAP= Proteína adaptadora contendo TIR

TLR= Receptor Toll-like

TLRs= Receptores Toll-like

TNF= Fator de necrose tumoral

TNF $\beta$ = Fator de necrose tumoral  $\beta$

TRAM= Translocated-associated protein

tRNA= RNA transportador

## EXPRESSÃO GÊNICA DE MEDIADORES ASSOCIADOS A NEUROPATOGÊNESE CAUSADA PELO BHV5

**RESUMO** - O herpes vírus bovino 5 (HVB-5) é um agente infeccioso pertencente a família *Herpesviridae*, sub-família *Alphaherpesvirinae* e gênero *Varicellovirus*. É um vírus neurotrópico que causa doenças neurológicas principalmente em animais jovens em todo mundo, especialmente nos países Sul-americanos, resultado em significantes perdas econômicas. A infecção pelo herpesvírus bovino 5 em gado jovem está associado a doença neurológica que é, usualmente, fatal, sendo um ótimo modelo para estudar a patogênese da meningoencefalite induzida por vírus. O HVB5 replica na mucosa nasal, e invade sistema nervoso central (SNC), principalmente por meio do sistema olfatório. A resposta imune inata desencadeada pelo hospedeiro frente à replicação do vírus por meio da via olfativa não é totalmente entendida. Estudos verificaram as variações nos níveis de expressão de receptores Toll-Like (TLRs) em diferentes regiões do sistema nervoso central bovino durante a infecção aguda e reativação de bovinos infectados por HVB-1 e HVB-5. Uma nova perspectiva para entender a relação do patógeno e o hospedeiro relacionando os microRNAs (miRNAs) que interagem com a resposta imune inata durante infecções virais neurotrópicas.

**Palavras-Chave:** bovino, encefalite viral, virologia, herpesvirus, microRNAs

## GENE EXPRESSION OF MEDIATORS ASSOCIATED WITH NEUROPATHOGENESIS CAUSED BY BHV5

**ABSTRACT** - Bovine herpes virus 5 (BHV-5) is an infectious agent belonging to the family *Herpesviridae*, subfamily *Alphaherpesvirinae* and genus *Varicellovirus*. It is a neurotropic virus that causes neurological diseases mainly in young animals worldwide, especially in the South American countries, resulting in significant economic losses. Bovine herpesvirus 5 infection in young cattle is associated with neurological disease, which is usually fatal and is a good model for studying the pathogenesis of virus-induced meningoencephalitis. The BHV5 replicates in the nasal mucosa, and invades the central nervous system (CNS), mainly through the olfactory system. The innate immune response triggered by the host against virus replication via the olfactory route is not fully understood. Studies have found variations in the levels of Toll-Like receptor (TLR) expression in different regions of the bovine central nervous system during acute infection and reactivation of BoHV-1 and BoHV-5 infected bovines. A new perspective to understand the relationship of the pathogen and the host relating the microRNAs (miRNAs) that interact with the innate immune response during neurotropic viral infections.

**Key words:** cattle, bovine, viral encephalitis, virology, herpesvirus, microRNAs

## **CAPÍTULO 1**

### **1 CONSIDERAÇÕES GERAIS**

#### **1.1 Herpesvírus bovino tipo 5 (BHV5)**

A encefalite ocasionada pelo BHV5 é uma patologia infecciosa viral aguda e altamente fatal presente em diversos países. É caracterizada pelos sinais neurológicos corticais e associada à inflamação do encéfalo e meninges com necrose do córtex do telencéfalo. Os hospedeiros naturais para o BHV5 são os bovinos.

O BHV5 é um vírus DNA de dupla cadeia, envelopado, com capacidade de estabelecer latência em neurônios de gânglios sensoriais após infecção aguda. O herpes vírus bovino 5 é um agente infeccioso pertencente a família Herpesviridae, sub-família Alphaherpesvirinae e gênero Varicellovirus. É um vírus neurotrópico que causa doenças neurológicas principalmente em animais jovens em todo mundo, especialmente nos países sul-americanos, resultando em significantes perdas econômicas (CAMPOS et al., 2009; CZUPRYNSKI, 2009; DEL MÉDICO-ZAJAC et al., 2010; 2011a; RISSI et al., 2007). O segundo maior rebanho de bovinos no mundo pertence ao Brasil, cerca de 200 milhões de animais, sendo líder em exportação da carne internacionalmente comercializada. Cerca de 67 bilhões de reais são gerados para o país pela produção de carne e leite, evidenciando a importância econômica (BRASIL, 2018).

Constantemente os rebanhos bovinos são expostos a agentes que resultam em diversas enfermidades, que podem vir a afetar a produtividade e são de grande importância para a sanidade animal. Os herpesvírus pode acometer os bovinos e são responsáveis por grandes perdas econômicas no mundo (DEL MÉDICO ZAJAC et al., 2010). Esses agentes, quando instalados,

aumentam a mortalidade, elevam o número de abortos e meningoencefalite e também, resultam na diminuição da produção de leite. Tanto animais adultos quanto jovens podem ser acometidos pelos herpesvírus, e embora alguns animais pareçam sadios, os herpesvirus podem estar presentes (JONES; CHOWDHURY, 2008; STATHAM ; RANDALL; ARCHER, 2015).

A estrutura viral do BHV5 é formada por um DNA linear de dupla fita, um capsídeo icosaédrico, tegumento, e um envelope fosfolipídico que contém glicoproteínas na superfície. Com base no perfil eletroforético do DNA, classifica-se o BHV5 em três subtipos, após a clivagem em sítios específicos a enzimas de restrição, desta forma o BHV5a, (linhagem australiana N569), BHV5b (linhagem argentina A663) e BHV5c (DEL MÉDICO-ZAJAC et al., 2011b; FAVIER et al., 2014).

O BHV5 acomete principalmente o sistema nervoso central de bovinos jovens (13 a 18 meses). O animal afetado pela infecção apresenta inflamação na substância branca e cinzenta, e lesões necróticas do córtex cerebral, e ocasionalmente é fatal (DEL MÉDICO ZAJAC et al., 2010). A invasão do BHV5 no sistema neurológico, por infecção natural ou experimental, pode ocorrer em bovinos, ovinos, lagomorfos e em caprinos jovens. Os pequenos ruminantes são hospedeiros importantes desta enfermidade, quando o vírus está em fase de latência, essas espécies podem atuar transmitindo a enfermidade para bovinos (LUDLOW et al., 2016; OLDONI et al., 2004).

A transmissão do BHV5 acontece principalmente devido ao contato direto ou indireto entre os bovinos, os locais onde ocorre a replicação primária são as mucosas nasal, orofaríngea e também oral e ocular (SHIVKUMAR et al., 2013). A replicação primária ocorre em células epiteliais, posteriormente o vírus atinge as terminações nervosas e então é transportado aos neurônios e gânglios sensoriais, onde o vírus pode se replicar ou atingir latência. As vias de acesso do BHV5 ao sistema nervoso central (SNC) são via hematógena ou pela via intra-axonal por nervos cranianos (MORI et al., 2004). O BoHV-5 pode ser reativado e eliminado por secreções fisiológicas do hospedeiro, sem resultar quadro clínico nítido (CARDOSO et al., 2016b; TANG et al., 2014). É importante ressaltar que,

o animal infectado, apresentando latência, é um reservatório natural do BHV5, que pode ser reativado a qualquer momento (MARIN et al., 2015).

A reativação do BHV5 é acompanhada com frequência da supressão dos sintomas clínicos, em infecções naturais e experimentais (VOGEL et al., 2003). Os animais que sobrevivem a manifestação clínica apresentaram uma fase longa de latência viral que pode ser reativada naturalmente ou por estímulos específicos, tornando o animal infectado uma fonte de infecção para outros animais (CHOWDHURY et al., 1997; DAVISSON et al., 2009).

As alterações histopatológicas de animais acometidos pelo BHV5 mostram degeneração neuronal, intensa resposta inflamatória e infiltrado linfocitário, com ou sem presença de hemorragia. Subpopulações de linfócito CD3+ foram verificadas em trabalhos anteriores, e associadas as áreas de acúmulo celular intenso no SNC de bovinos naturalmente infectados pelo BoHV-5 (CARDOSO et al., 2016b).

Uma característica da família Herpesviridae é a latência, que garante que o agente se mantenha por tempo indeterminado no animal infectado sem que haja manifestação clínica. O estabelecimento de latência é a propriedade viral mais significativa a ser considerada no controle das enfermidades produzidas por essa família (DAVISON et al., 2010; GREY, 2015).

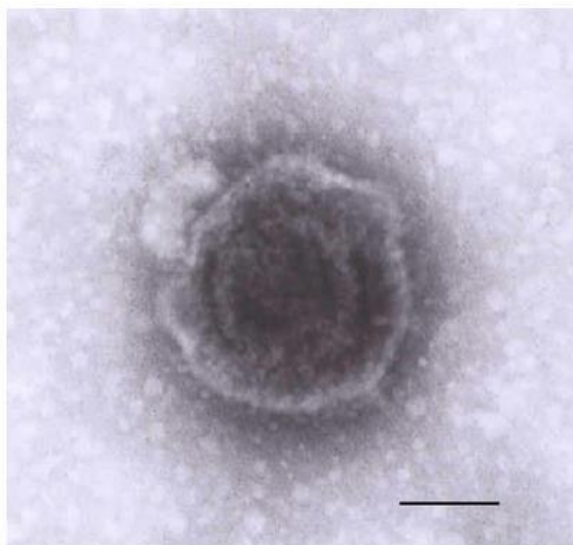


Figura 1- Morfologia do BHV5 visualizada por microscopia eletrônica de transmissão. A partícula viral possui aproximadamente 260 nm. A barra preta

indica 100 nm (DEL MÉDICO ZAJAC et al., 2010).

O herpesvírus bovino tipo 1 (BHV1) e 5 (BHV5) são herpesvírus alfa intimamente relacionados. O BHV5 é o agente causal da meningoencefalite não supurativa principalmente em bovinos jovens, e BHV1 causa doença respiratória, abortos, distúrbios genitais e, ocasionalmente, encefalite em bovinos. Ambos os vírus são neurotrópicos e compartilham propriedades biológicas semelhantes. No entanto, eles diferem em sua capacidade de causar doença neurológica. Receptores Toll-like (TLRs) estão envolvidos na resposta imune inata a patógenos (RENSETTI et al., 2016; VAN RIEL; VERDIJK; KUIKEN, 2015).

Estudos verificaram as variações nos níveis de expressão de TLRs em diferentes regiões do sistema nervoso central bovino durante a infecção aguda e reativação de bovinos infectados por BHV1 e BHV5-. Com exceção do TLR9, a regulação positiva de todos os TLRs foi detectada após infecção primária de tecidos neurais por ambos os herpesvírus bovinos (WINKLER et al., 2015). Além disso, verificou-se que os estágios de infecção aguda e reativação foram caracterizados por um padrão de expressão de TLR distinto. As notáveis diferenças nos níveis de mRNA de TLR durante a infecção aguda e reativação fornecem evidências de que a resposta imune inata pode estar envolvida nos desfechos clínicos observados em cada estágio (RENSETTI et al., 2016).

## **1.2 Receptores Toll-like**

Os receptores do tipo Toll (inglês Toll-like Receptors, TLR) constituem uma família de receptores que reconhecem padrões moleculares (inglês Pathern Recognition Receptors, PRR) e são frequentemente associados a agentes infecciosos. Estudar os TLRs tem proporcionado avanços significantes no entendimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro em relação a invasão de microorganismos diversos (VERMA; BHARTI, 2017). Os TLRs são proteínas

altamente conservadas, pertencem à família de proteínas transmembrânicas tipo I, possuem uma porção citoplasmática e uma extracelular abundante em repetições de leucina, desempenham papel importante na detecção e reconhecimento dos padrões moleculares de um patógeno (XANGORAR et al., 2008).

Originalmente descoberta na década de 90 em insetos do gênero *Drosophila*, em 1997 identificou-se e caracterizou-se um homólogo da proteína Toll em humanos denominado de receptor Toll-like (BOWIE, 2007). Até o momento onze receptores Toll foram identificados e descritos (TLR1-11) constituindo papel importante na detecção e reconhecimento de patógenos e indução de atividade antimicrobiana pela ativação dos sistemas de imunidade inata e adquirida (IWASAKI; AKIRA, 2010; PARKER; PRINCE; SABROE, 2007). Os TLRs 1-9 são preservados no homem e camundongo, o TLR10 é apenas funcional em humanos e o TLR11 apenas em camundongos. Quanto a localização, os TLRs 1, 2, 4, 5, 6 e 10 são extracelulares, presentes na membrana plasmática, e possuem domínios intracelular devido a presença de proteínas TIR (MyD88, TRIF, TRAM e TIRAP) e extracelular (LRR), enquanto os TLRs 3, 7, 8 e 9 são intracelulares situados em endossomas e não possuem domínio extracelular. O domínio TIR é necessário para iniciar os sinais intracelulares, uma vez que a proteína MyD88 está em todos receptores, exceto o TLR3 (GOLDMAN, 2007; KAWAI; AKIRA, 2010).



O'NEILL, 2010). O complexo estimula a fosforilação do IKB e consequentemente a degradação resulta no fator de transcrição nuclear, que então, irá para o núcleo conduzir a expressão das citocinas inflamatórias e moléculas de adesão (KUMAR, 2009).

As citocinas quando liberadas devido a ativação dos TLRs pelos patógenos, estimulam os leucócitos e outros macrófagos para o local da infecção. Os linfócitos Th1 liberam IL-2, promovendo ativação dos linfócitos B e proliferação celular T. Os linfócitos Th2 produzem IL-4 e IL-5 que induzem a produção de IgE. A IgE promove liberação de histamina, fatores quimiotáticos para neutrófilos e eosinófilos, promove degranulação de basófilos e mastócitos, e ainda induz reações imediatas de hipersensibilidade. A IL-2 produzida pelas células dendríticas e macrófagos, estimulam a diferenciação dos linfócitos T em Th1 e a ativação das células NK, responsáveis por secretar o interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), que age na ativação de linfócitos TCD8+ e macrófagos (ARANCIBIA et al., 2007).

Se um RNA viral ou um lipopolissacarídeo é identificado pelos TLR3 e TLR4, localizados nas células dendríticas e macrófagos, a proteína TRIF ativa o complexo constituído por subunidades, que levam a fosforilação de diferentes fatores reguladores de interferon (IRF-3, IRF-5, IRF-7). Assim, o IRF-3 ativado é conduzido ao interior do núcleo e induz a expressão de genes a produzir interferons do tipo I (ARANCIBIA et al., 2007; KUMAR, 2009).

As células dendríticas são maturadas por indução dos interferons do tipo I, fazendo com que a atividade humoral dos linfócitos B aumente, também induz a diferenciação dos linfócitos T CD8+, além de inibir a replicação viral e evitar a disseminação do processo infeccioso, devido ao recrutamento de monócitos e linfócitos. As citocinas inflamatórias liberadas pelas células dendríticas ativam os linfócitos T para se diferenciarem em linfócitos Th1(IL-2, TNF- $\beta$  E IFN- $\gamma$ ) e Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 IL-10 E IL 13). O fator de necrose tumoral (TNF) que os macrófagos produzem, estimula a ativação de macrófagos para liberação de IL-12 (BARTON; KAGAN, 2009; MIYAKE, 2007).

Para evitar que ocorra uma resposta inflamatória excessiva, é necessário

equilíbrio entre a ativação e inativação de TLR. A ativação de TLR pode ser moderada por diversas moléculas que preservam um equilíbrio entre saúde e doença, por meio de receptores reguladores intra e extracelulares (ONEILL, 2006; UEMATSU; AKIRA, 2007). A hipoatividade dos TLRs pode gerar susceptibilidade a patógenos, ao mesmo tempo em que hiperatividade está associada a doenças autoimunes (PAPADIMITRAKI; BERTSIAS; BOUMPAS, 2007).

### **1.3 MicroRNAs**

O RNA é uma molécula de fita simples, que contem sequências de bases transcritas a partir de moldes de DNA, que possuem funções específicas. Os tipos de RNA são RNA mensageiro (mRNA), RNA transportador (tRNA) e o RNA ribossômico (rRNA). Existem outros tipos de RNA que não participam diretamente na síntese de proteínas, como: RNAs não codificantes (ncRNA) que possui específicas funções. Temos small nuclear RNA (snRNA), small nucleolar RNAs (snoRNAs), o small interfering RNA (siRNA) e os micro-RNAs. Os micro-RNAs (miR) não participam diretamente na tradução de proteínas, no entanto desempenham função extremamente importante, e significativa, na regulação de genes das células eucariontes (BJOMER et al., 2014; HIGA et al., 2014).

Os microRNAs possuem aproximadamente de 14 a 20 nucleotídeos organizados em um único filamento. Originados de regiões não-codificantes (introns), os micro-RNAs possuem função na regulação gênica, fundamental para diferenciação de tecidos, ciclo celular, proliferação e apoptose (LECLERCQ; DIALLO; BLANCHETTE, 2013). Existem evidências de que são, também, essenciais na regulação, desenvolvimento e homeostase celular, possuindo controle de diversos processos metabólicos bem como do mRNA (DOENCH et al., 2003; HOEFIG et al., 2008).

Há outras atividades celulares, além dos processos vitais anteriormente

citados, em que os microRNAs estão envolvidos, como metabolismo lipídico, secreção de insulina, síntese de neurotransmissores, replicação viral, resposta imune, entre outros (GLAZOV et al., 2009; LEE; DUTTA, 2009).

Os microRNAs são filamentos únicos originados da transcrição gênica presente no DNA, normalmente são transcritos de introns pela RNA polimerase II, resultando no microRNA primário (pri-miRNA), este apresenta extremidade cap na porção 5' e cauda poli (A) na porção 3'. O pri-miRNA é clivado no núcleo pela RNase III e seu cofator DGCR8, produzindo precursores de microRNAs denominados pré-miRNA, este possui em média de 70 a 90 nucleotídeos em sua cadeia e uma estrutura secundária não pareada que possui formato parecido a um grampo, em alça (LEE et al., 2004; RODRIGUEZ; VIGOTIYO; CLARE, 2007). A proteína exportina-5' reconhece o pré-miRNA e o transporta ao citoplasma onde outra RNase III realiza clivagem eliminando a alça, então, surge uma cadeia de fita dupla de miRNA que contém uma fita de miRNA madura e uma fita complementar, que possui aproximadamente 22 pares de nucleotídeos (LIU; LI, 2012; MAJER et al., 20017).

Uma fita do microRNA é reconhecida pelo complexo protéico (RNA RISC), as fitas são separadas então e o miRNA maduro incorpora ao RISC e a outra fita sofre degradação (FIGURA 3). O microRNA que incorporou ao RISC é levado ao mRNA e induz o silenciamento por meio de duas maneiras: pareamento perfeito ou imperfeito entre eles. Em mamíferos geralmente ocorre o pareamento imperfeito que leva a inibição da síntese proteica. O microRNA liga-se a região 3'-UTR do mRNA com pareamento imperfeito, resultando na inibição da tradução do mRNA alvo (KOZOMARA; GRIFFITHS-JONES, 2014).

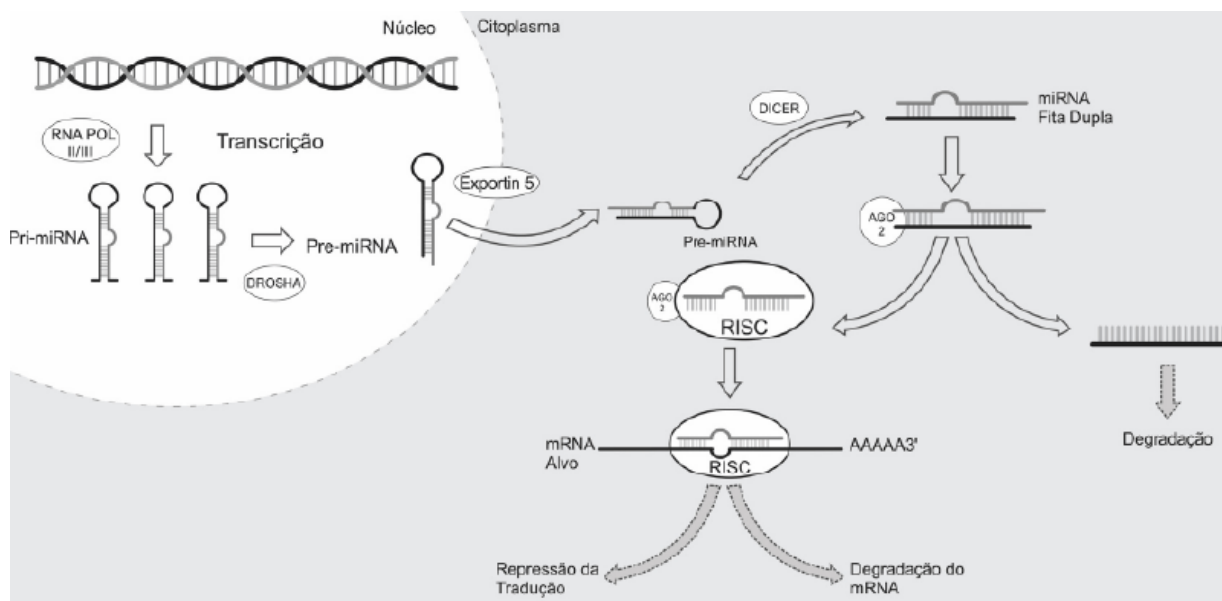


Figura 2 - Modelo de Biogênese de microRNAs (BJÖRNER et al., 2014).

Os microRNAs são pequenos RNAs não-codificantes que regulam a expressão gênica inibindo a tradução de proteínas ou por desestabilizar a fita de mRNA. Os miRNAs ligam-se a região 3'-UTR do mRNA e usualmente, regulam de forma negativa a sua expressão. Foi descoberto ao menos um miRNA que regula de forma positiva a expressão gênica, e aparentemente, um único miRNA pode regular diversos genes (BHELA et al., 2014; CARDOSO; GUEDES; LIMA, 2016a).

Uma fita de mRNA pode conter vários sítios de ligação para um único miRNA ou conter um sítio para vários miRNAs, criando um complexo sistema de regulação entre miRNAs e mRNAs (DICKY et al., 2016; IZZARD et al., 2017). mRNAs que possuem vários sítios de ligação para miRNAs são mais suscetíveis a supressão da tradução do que os que possuem um único sítio (SOREL; DEWALS, 2016). Estudos sugerem que miRNAs regulam a síntese protéica sem afetar o mRNA, ao mesmo tempo outros estudos evidenciam a existência de miRNAs que degradam o mRNA (PAREEK et al., 2004; THAI et al., 2007; VIGORITO et al., 2007; BJÖRNER et al., 2014).

Devido a quantidade de informações já descritas sobre miRNAs, existe então um banco de dados criado em 2002, onde milhares de miRNAs estão

registrado no miRbase, um depósito online que contém todas informações sobre miRNAs já publicadas. Até o momento, o banco de dados possui registrado 38.589 miRNAs.

O microRNA-155 encontra-se no transcrito de RNA BIC não codificante e está envolvido na imunidade inata, evidenciado pela rápida indução em linfócitos B e linfócitos T após a exposição ao antígeno ou devido a alguns mediadores inflamatórios (BHELA et al., 2015; DICKEY et al., 2017 PEREZ et al., 2006). O miR-155 tem como alvo os fatores de transcrição PU.1 e c-Maf, que resultam na regulação negativa da linhagem de IgG1 e células T pela diferenciação das células T auxiliares tipo 1 e tipo 2 (PIEADADE; AZEVEDO-PEREIRA, 2016; POWDRILL et al., 2016).

## REFERÊNCIAS

ALBIGER, B.; DAHLBERG, S.; HENRIQUES-NORMARK, B.; NORMARK, S. Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. **J. Intern. Med.**, v. 261, p. 511-528, 2007.

ARANCIBIA, S. A.; BELTRAN, C. J.; AGUIRRE, I. M.; SILVA, P.; PERALTA, A. L.; MALINARICH, F. Toll-like Receptors are key participants in innate immune responses. **Biol. Res.**, v. 40, p. 97-112, 2007.

BARTON, G. M.; KAGAN, J. C. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 9, p. 535-542, 2009.

BHELA, S.; MULIK, S.; REDDY, P. B.; RICHARDSON, R. L.; GIMENEZ, F.; RAJASAGI, N. K.; VEIGA-PARGA, T.; OSMAND, A. P.; ROUSE, B. T. Critical role of microRNA-155 in herpes simplex encephalitis. **J. Immunol.**, v. 192, p. 2734–2743, 2014.

BHELA, S.; MULIK, S.; REEDY, P. B.; RICHARDSON, R. L.; VARANASI, S. K.; JAGGI, U.; XU, J.; LU, P. Y.; ROUSE, B. T. Role of miR-155 in the pathogenesis of herpetic stromal keratitis. **Am. J. Pathol.**, v. 185, p. 1073–1084, 2015.

BJÖRNER, S.; FITZPATRICK, P. A.; LI, Y.; ALLRED, C.; HOWELL, A.; RINGBERG, A. Epithelial and stromal microRNA signatures of columnar cell hyperplasia linking let-7c to precancerous and cancerous breast cancer cell proliferation. **Plos. One.**, v. 9, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Bovinos e bubalinos**, <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>. Acesso em: 4 Maio 2018.

BOWIE, A. G. Translational mini-review series on Toll-like receptors: recent advances in understanding the role of Toll-like receptors in anti-viral immunity. **Clin. Exp. immunol.**, v. 147, p. 217-226, 2007.

CAMPOS, F. S.; FRANCO, A. C.; HÜBNER, S. O.; OLIVEIRA, M. T.; SILVA, A. D.; ESTEVES, P. A.; ROEHE, P. M.; RIJSEWIJK, F. A. High prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in Southern Brazil. **Microbiology**, v. 139, n. 1-2, p. 67-73, 2009.

CARDOSO, A. L.; GUEDES, J. R.; LIMA, M. C.P. Role of microRNAs in theregulation of innate immune cells under neuroinflammatory conditions.**Curr Op. Pharmacol.**, v.26, p.1–9, 2016a.

CARDOSO, T. C.; FERREIRA, H. L.; OKAMURA, L. H.; GIROTO, T. P.; OLIVEIRA, B. R. S. M.; FABRI, C. U. F.; GAMEIRO, R.; FLORES, E. F. Cellular response markers and cytokine gene expression in the central nervous system of cattle naturally infected with bovine herpesvirus 5. **Vet. J.**, v. 218, p. 71–77, 2016b.

CHOWDHURY, S.I.; LEE, B. J.; MOISER, D.; SUR, J. H.; OSORIO, F. A.; KENNEDY, G.; WEISS, M. L. Neuropathology of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) meningoencephalitis in a rabbit seizure model. **J. Comp. Pathol.**, v. 117, p. 295–310, 1997.

CZUPRYNSKI, C. J. Host response to bovine respiratory pathogens. **Anim. Health Rev.**, v.10, p. 141-143, 2009.

DAVISON, A. J. Herpesvirus systematics. **Vet. Microbiol.**, v. 143, p. 52–69, 2010.

DAVISON, A. J.; EBERLE, R.; EHLERS, B.; HAYWARD, G. S.; MCGEOCH, D. J.; MINSON, A. C.; PELLET, P. E.; ROIZMAN, B.; STUDDERT, M. J.; THIRY, E. The order Herpesvirales. **Arch. Virol.**, v. 154, p. 171–177, 2009.

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

DEL MÉDICO-ZAJAC, M.P.; ODEÓN, A.; BLANCO-VIEIRA, J.; COMBESSIES, G.; FONDEVILA, N.; PALACIOS, M.; THIRY, J.; MUYLKENS, B.; THIRY, E.; ROMERA, A.S. Characterization of BoHV-5 field strains circulation and report of transient specific subtype of bovine herpesvirus 5 in Argentina. **BMC Vet. Res.**, v. 7, p. 8, 2011a.

DEL MÉDICO-ZAJAC, M.P.; ROMERA, A.S.; LADELFA, M.F.; KOTSIAS, F.; DELGADO, F.; THIRY, J.; MEURENS, F.; KEIL, G.; THIRY, E.; MUYLKENS, B. In vitro-generated interspecific recombinants between bovine herpesviruses 1 and 5 show attenuated replication characteristics and establish latency in the natural host. **BMC Vet. Res.**, v. 7, p. 19, 2011b.

DICKEY, L. L.; HANLEY, T. M.; HUFFAKER, T. B.; RAMSTEAD, A. G.; O'CONNEL, R. M.; LANE, T. E. MicroRNA 155 and viral-induced neuroinflammation. **J. Neuroimmunol.**, v. 308, p. 17-24, 2017. doi:10.1016/j.jneuroim.2017.01.016.

DICKEY, L. L.; WORNE, C. L.; GLOVER, J. L.; LANE, T. E.; O'CONNEL, R. M. MicroRNA-155 enhances T cell trafficking and antiviral effector function in a model

of coronavirus-induced neurological disease. **J. Neuro-Oncol.**, v. 13, p. 240, 2016.

DOENCH, J. G.; PETERSEN, C. P.; SHARP, P. A. siRNAs can function as miRNAs. **Genes Dev.**, v.17, p. 438-442, 2003.

FAVIER, P. A.; MARIN, M. S.; MORAN, P. E.; ODEON, A. C.; VERNA, A. E.; PEREZ, S. E. Latency of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) in tonsils and peripheral blood leukocytes. **Vet. J.**, v. 202, p. 134–140, 2014.

GLAZOV, E. A.; KOGSUWAN, K.; ASSAVALAPSAKUL, W.; HORWOOD, P. F.; MITTER, N.; MAHONY, T. J. Repertoire of bovine miRNA and miRNA-like small regulatory of bovine miRNA and miRNA-like small regulatory RNAs expressed upon viral infection. **PLoS One**, v. 4, p. e6349, 2009.

GREY, F. Role of microRNAs in herpesvirus latency and persistence. **J. Gen. Virol.**, v. 96, p. 739–751, 2015.

GOLDMAN, M. Translational mini-review series on toll-like receptors: toll-like receptor ligands as novel pharmaceuticals for allergic disorders. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 147, p. 208-216, 2007.

HENNESSY, E. J.; PARKER, A. E.; O'NEILL, L. A. J. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? **Nature Rev. Drug. Discov.**, v. 9, p. 293-307, 2010.

HIGA, G. S.; DE SOUSA, E.; WALTER, L. T.; KINJO, E. R.; RESENDE, R. R.; KIHARA, A. H. MicroRNAs in neuronal communication. **Mol. Neurobiol.**, v. 49, p.1309-1326, 2014.

HOEFIG, K. P.; THORNS, C.; ROEHLE, A.; KAEHLER, C.; WESCHE, K. O.; REPSILBER, D. Unlocking pathology archives for microRNA-profiling. **Anticancer Res.**, v. 28, p. 119-124, 2008.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. **Science.**, v. 327, p. 291-295, 2010.

IZZARD, L.; DLUGOLESKI, D.; XIA, Y.; MCMAHON, M.; MIDDLETON, D.; STAMBAS, J. Enhanced immunogenicity following miR-155 incorporation into influenza A virus genome. **Virus Res.**, v. 235, p. 115-120, 2017.

JONES, C.; CHOWDHURY, S. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. **Anim. Health Res. Rev.**, v. 8, n. 2, p. 187-205, 2008.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nat. Immunol.**, v. 11, p. 373-384, 2010.

KOZOMARA, A.; GRIFFITHS-JONES, S. miRbase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. **Nucleic Acids Res.**, v. 42, p. 68-73, 2014.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and innate immunity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 388, p. 621-625, 2009.

LECLERCQ, M.; DIALLO, A. B.; BLANCHETTE, M. Computational prediction of the localization of microRNAs within their pre-miRNA. **Nucleic Acids Res.**, v. 41, p. 7200-7211, 2013.

LEE, Y. S.; DUTTA, A. MicroRNAs in cancer. **Annu. Rev. Pathol.**, v. 4, p. 199-227, 2009.

LEE, Y.; KIM, M.; HAN, J.; YEOM, K. H.; LEE, S.; BAEK, S. H.; et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **EMBO J.**, v. 23, p. 4051-4060, 2004.

LIU, B.; LI, J.; CAIRNS, M. J. Identifying miRNAs, targets and functions. **Brief Bioinform.**, v. 15, p. 1-19, 2012.

LUDLOW, M.; KORTEKAAS, J.; HERDEN, C.; HOFFMANN, B.; TAPPE, D.; TREBST, C.; GRIFFIN, D. E.; BRINDLE, H. E.; SOLOMON, T.; BROWN, A. S.; VANRIEL, D.; WOLTERS, K. C.; PAJKRT, D.; WOHLSEIN, P.; MARTINA, K. C.; BAUMGÄRTNER, V. G. M.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Neurotropic virus infections as the cause of immediate and delayed neuropathology. **Acta Neuropathol.**, v.131, p.159–184, 2016.

MAJER, A.; CALIGIURI, K. A.; GALE, K. K.; NIU, Y.; PHILLIPSON, C. S.; BOOTH, T. F.; BOOTH, S. A. Induction of multiple miR-200/182 members in the brains of mice are associated with acute herpes simplex virus 1 encephalitis. **Plos One**, v.12, n. 1, p. E01069081, 2017.

MARIN, M. S.; QUINTANA, S.; LEUNDA, M. R.; ODEON, A. C.; PEREZ, S. E. Toll-like receptor expression in the nervous system of bovine alphaherpesvirus-infected calves. **Res. Vet. Sci.**, v. 97, p.422–429, 2015.

MCGETTRICK, A. F.; O'NEILL, L. A. J. Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 22, p. 20-27, 2010.

MIYAKE, K. Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. **Semin. Immunol.**, v. 19, p. 3-10, 2007.

MORI, I.; NISHIYAMA, Y.; YOKOCHI, T.; KIMURA, Y. Olfactory transmission of neurotropic viruses. **J. Neuro-Oncol.**, v.11, p.129–137, 2004.

OLDONI, I.; WEIBLEN, R.; INKELMANN, M.A.; FLORES, E. F. Production and characterization of monoclonal antibodies to a Brazilian bovine herpesvirus type 5. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, p. 213–221, 2004.

O'NEILL, L. A. J. How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 18, p. 3-9, 2006.

PAPADIMITRAKI, E. D.; BERTSIAS, G. K.; BOUMPAS, D. T. Toll like receptors and autoimmunity: a critical appraisal. **J. Autoimmun.**, v. 29, p. 310-318, 2007.

PAREEK, S.; ROY, S.; KUMARI, B.; JAIN, P.; BANERJEE, A.; VRATI, S. miR-155 induction in microglial cells suppress Japanese encephalitis virus replication and negatively modulates innate immune responses. **J. Neuroinflammation.**, v.11, p. 97, 2014.

PARKER, L. C.; PRINCE, L. R.; SABROE, I. Translational mini-review series on Toll-like receptors: networks regulated by Toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 147, p. 199-207, 2007.

PEREZ, S.; LOVATO, L.; ZHOU, J.; DOSTER, A.; JONES, C. Comparison of inflammatory infiltrates in trigeminal ganglia of cattle infected with wild-type Bovine herpesvirus 1 versus a virus strain containing a mutation in the LR (latency-related) gene. **J. Neuro-Oncol.**, v. 12, p. 392–397, 2006.

PIEADADE, D.; AZEVEDO-PEREIRA, M. The role of microRNAs in the pathogenesis of herpesvirus infection. **Viruses**, v. 8, p. E156, 2016.

POWDRILL, M. H.; DESROCHERS, G. F.; SINGARAVELU, R.; PEZACKI, J. P. The role of microRNAs in metabolic interactions between viruses and their hosts. **Curr. Op. Virol.**, v. 19, p. 71–76, 2016.

RENSETTI, D.; MARIN, M.; QUINTANA, S.; MORÁN, P.; VERNA, A.; ODEON, A.; PEREZ, S. Involvement of toll-like receptors 3 and 7/8 in the neuropathogenesis of bovine herpesvirus types 1 and 5. **Res. Vet. Sci.**, v. 107, p. 1-7, 2016.

RISSI, R.D., PIEREZAN, F., SILVA, M.S., FLORES, E.F., BARROS, C.S.L. Neurological disease in cattle in southern Brazil associated with Bovine herpesvirus infection. **J. Vet. Diag. Investig.**, v. 20, p. 346-349, 2007.

RODRIGUEZ, A.; VIGORITO, E.; CLARE, S. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function, *Science*, v. 316, p. 608–611, 2007.

SHIVKUMAR, M.; MILHO, R.; MAY, J. S.; NICOLL, M. P.; EFSTAHIOU, S.; STEVENSON, P. G. Herpes simplex virus 1 targets the murine olfactory neuroepithelium for host entry. **J. Virol.**, v. 87, p. 10477–10488, 2013.

SOREL, O.; DEWALS, B. G. MicroRNAs in large herpesvirus DNA genomes: recent advances. **BioMol. Concepts**, v. 7, p. 229–239, 2016.

STATHAM, J.M.E.; RANDALL, L.V.; ARCHER, S.C. Reduction in daily milk yield associated with subclinical bovine herpesvirus 1 infection. **Vet. Rec.**, v. 177, p. 339-343, 2015.

TANG, Q. I.; WY-Q.; CHEN, D-S.; ZHOU, Q.; CHEN, H-C.; LIU, Z-F.

Bovineherpesvirus 5 encodes a unique pattern of microRNAs comparedwith bovine herpesvirus 1. **J. Gen. Virol.**, v. 95, p. 671–678, 2014.

THAI, H.; CALADO, D.P.; CASOLA, S.; ANSEL, K.M.; XIAO, C. Regulation of the germinal center response bymicroRNA-155, **Science**, v. 316 p.604-608, 2007.

UEMATSU, S.; AKIRA, S. Toll-like receptors and type I interferons. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 15319-15324, 2007.

VAN RIEL, D.; VERDIJK, R.; KUIKEN, T. The olfactory nerve: a shortcutfor influenza and other viral diseases into the central nervous system. **J. Pathol.**, v. 235, p. 277–287, 2015.

VERMA, R.; BHARTI, K. Toll like receptor 3 and viral infections ofnervous system. **J. Neurol. Sci.**, v. 372, p. 40–48, 2017.

VIGORITO, E.; PERKS, K. L.; ABREU-GOODGER,C.; BUNTING, S.; XIANG, Z.; KOHLHAAS, S.; DAS, P. P.; MISKA, E. A.; RODRIGUEZ, A.; BRADLEY, A.; SMITH, K. G.; RADA, C.; ENRIGHT, A. J.; TOELLNER, K. M.; MACLENNAN, I. C.; TURNER, M. MicroRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin classs witched plasma cells, **Immunity**, v. 27, p. 847–859, 2007.

VOGEL, F.S.; CARON, L.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; WINKELMANN, E. R.; MAYER, S.V.; BASTOS, R. G. Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. **J. Clin. Microbiol.**, v.41, p.4512–4520, 2003.

WINKLER, C. W.; RACE, B.; PHILIPS, K.; PETERSON, K. E. Capillaries in the olfactory bulb but not the cortex are highly susceptible to virus induced vascular

leak and promote viral neuroinvasion. **Acta Neuropathol.**, v.130, p.233–245, 2015.

XAGORARI, A.; CHLICHLIA, K. Toll-like receptors and viruses: induction of innate antiviral immune responses. **Open Microbiol. J.**, v. 2, p. 49–59, 2008.

**CAPÍTULO 2** – Expression of miR-155 associated with Toll-like receptors 3, 7, and 9 transcription in the olfactory bulbs of cattle naturally infected with BHV5 – (artigo publicado)

SHORT COMMUNICATION

# Expression of miR-155 associated with Toll-like receptors 3, 7, and 9 transcription in the olfactory bulbs of cattle naturally infected with BHV5

Bruna R. S. M. Oliveira<sup>1</sup> & Flavia V. Vieira<sup>2</sup> & Dielson de S. Vieira<sup>1</sup> & Sergio E. L. da Silva<sup>3</sup> & Roberto Gameiro<sup>1</sup> & Eduardo F. Flores<sup>4</sup> & Tereza C. Cardoso<sup>1</sup>

Received: 6 May 2017 / Revised: 14 July 2017 / Accepted: 30 July 2017  
# Journal of NeuroVirology, Inc. 2017

**Abstract** Bovine herpesvirus 5 (BHV5) infection of young cattle is frequently associated with fatal neurological disease and, as such, represents an attractive model for studying the pathogenesis of viral-induced meningoencephalitis. Following replication in the nasal mucosa, BHV5 invades the central nervous system (CNS) mainly through the olfactory pathway. The innate immune response triggered by the host face to virus replication through the olfactory route is poorly understood. Recently, an upregulation of conserved pathogen-associated molecular pattern, as Toll-like receptors (TLRs), has been demonstrated in the CNS of BHV5 experimentally infected cows. A new perspective to understand host-pathogen interactions has emerged elucidating microRNAs (miRNAs) network that interact with innate immune response during neurotropic viral infections. In this study, we demonstrated a link between the expression of TLRs 3, 7, and 9 and miR-155 transcription in the olfactory bulbs (OB) of 16 cows suffering from acute BHV5-induced neurological disease. The OBs were analyzed for viral antigens and genome, miR-155 and TLR 3, 7, and 9 expression considering three major

regions: olfactory receptor neurons (ORNs), glomerular layer (GL), and mitral cell layer (ML). BHV5 antigens and viral genomes, corresponding to *glycol-C* gene, were detected in all OBs regions by fluorescent antibody assay (FA) and PCR, respectively. TLR 3, 7, and 9 transcripts were upregulated in ORNs and ML, yet only ORN layers revealed a positive correlation between TLR3 and miR-155 transcription. In ML, miR-155 correlated positively with all TLRs studied. Herein, our results evidence miR-155 transcription in BHV5 infected OB tissue associated to TLRs expression specifically ORNs which may be a new window for further studies.

**Keywords** BHV5 · miRNAs · Neuropathogenesis · Neuroinvasion · Innate immune response

## Introduction

Bovine herpesvirus 5 (BHV5) belongs to the family *Herpesviridae*, subfamily *Alphaherpesvirinae*, and genus *Varicellovirus* (Davison et al. 2009; Davison 2010). BHV5 is a neurotropic virus that produces neurological disease mainly in young animals worldwide, especially in South American countries (Vogel et al. 2003). Following primary replication in the nasal mucosa, BHV5 is believed to invade the central nervous system (CNS) mainly through the olfactory route (Vogel et al. 2003; Mori et al. 2004; Perez et al. 2006). The olfactory mucosa is composed by a neuroepithelium divided into layers organized initially by nasal mucosa, olfactory receptor neurons (ORNs), glomerular layer (GL), cribriform plate, mitral cell layer (ML), and limbic system (Mori et al. 2004). The olfactory receptor neurons (ORNs) are bipolar neuronal cells whose axons leave the epithelium, penetrate the cribriform plate, enter the olfactory bulb and, finally, make synapse with the dendrites of mitral cells in the glomerular

\* Tereza C. Cardoso  
tcardoso@fmva.unesp.br

<sup>1</sup> DAPSA Department, Laboratory of Animal Virology and Cell Culture, College of Veterinary Medicine, São Paulo State University (UNESP), Araçatuba, SP 16050-680, Brazil

<sup>2</sup> College of Veterinary Medicine, Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), Rodovia BR-369 km 54, Vila Maria, Bandeirantes, PR 86360000, Brazil

<sup>3</sup> College of Veterinary Medicine, Universidade Federal Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, Brazil

<sup>4</sup> Setor de Virologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

layer (Mori et al. 2004; Shivkumar et al. 2013). Mitral cells project to the olfactory and limbic systems, mainly the olfactory cortex and hippocampus, respectively (Mori et al. 2004; van Riel et al. 2015). During acute infection, BHV5 gains access mostly to the CNS cranial areas, indicating that viral invasion occurs more directly along olfactory neurons (Chowdhury et al. 1997; Favier et al. 2014). Despite evidences indicating that BHV5 uses the olfactory pathway to invade the CNS, detailed information on the sequential progression of the virus—and the host-mediated immune events—through the OB layers is lacking.

Toll-like receptors (TLRs) are a broad family of conserved innate immune receptors that recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) (Xagorari and Chlichlia 2008). TLRs 3, 7, 8, and 9 are expressed in intracellular vesicles and recognize nucleic acids from viral origin (Cardoso et al. 2016a). Cattle experimentally infected with BHV5 showed an overexpression of TLRs 3, 7, and 9 in the frontal cerebral cortex, including the OBs, during acute infection and/or following virus reactivation (Marin et al. 2015). We have previously demonstrated that the host immune response and inflammation play a crucial role in the pathogenesis of acute encephalitis by BHV5 in cattle (Cardoso et al. 2016b). In many aspects, there is a consensus that BHV5 acute infection induces activation of pro-inflammatory cytokines and chemokines that eventually lead to brain injury, especially in frontal cortices (Marin et al. 2015). However, the portion/areas of the OBs more affected by inflammation process remain unclear.

MicroRNAs (miRNAs) represent small RNA species composed by ~ 20–14 nucleotides found in virtually all living organisms (Grey 2015; Sorel and Dewals 2016). Mature miRNAs are able to cause either mRNA degradation or translational repression regulating physiological process by target genes after their transcription (Glazov et al. 2009). Moreover, host miRNAs control herpesvirus infection by inhibiting viral or host transcripts (Piedade and Azevedo-Pereira 2016; Powdrill et al. 2016; Dickey et al. 2017). Recent data indicate that miR-155 plays a critical role in immunity, inflammation, and viral infections (Bhela et al. 2014; Dickey et al. 2016). Moreover, miR-155 is expressed in a variety of immune cells, including B cells, macrophages, types of T cells, NK cells, and dendritic cells (Dickey et al. 2017). In addition, miR-155 modulation may act to control Japanese encephalitis virus infection (Pareek et al. 2004) and to enhance T cell trafficking in a model of coronavirus-induced neurological disease (Dickey et al. 2016). In fact, a number of studies have demonstrated that T cell responses are impaired in the absence of miR-155 during infection with some neurotropic viruses (Bhela et al. 2014; Bhela et al. 2015; Dickey et al. 2016; Dickey et al. 2017). Recently, induction of miR-155 was associated to HSV1 acute encephalitis in a mouse model (Majer et al. 2017). Considering the finding described for HSV1 encephalitis (Shivkumar et al. 2014; Bhela et al. 2014; Grey 2015;

Sorel and Dewals 2016; Majer et al. 2017), it would be worth to investigate miRNA expression in the CNS during BHV5 infection.

In this study, we investigated TLRs 3, 7, and 9 transcription associated with the distribution of BHV5 antigens and genome in OB portions/layers of cattle naturally infected with BHV5. In addition, expression of host miR-155 was also examined. The results were compared in order to describe a possible participation of these components in the pathogenesis/immune response in natural BHV5 acute infections.

## Materials and methods

### Olfactory bulb samples

Brains of 16 cattle with positive diagnosis of acute BHV5 neurological disease (Cardoso et al. 2016b) and from eight healthy cattle were obtained from routine pathological diagnostics at the Laboratory of Animal Virology of University of São Paulo state, Brazil. The brain samples were selected from 38 cattle reported previously (Cardoso et al. 2016b) based on OB anatomical preservation. All applicable institutional guidelines for the care and use of animals were followed (CEEA 2015/09765). The whole brain was carefully removed, sectioned into two halves and the olfactory bulbs (OB) were gently removed to preserve the anatomical and histological structures. Two fragments of approximately 8.5 mm were collected from each OB (Fig. 1) and stored in RNA later®-ICE (Ambion®, Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA) at – 86 °C for molecular analysis, and immersed in 10% formalin for immunofluorescence in histological sections (Marin et al. 2015; Vogel et al. 2003).

### BHV5 antigen detection in OBs

Briefly, OB histological slides (infected and controls) prepared as described previously (Cardoso et al. 2016b) were hydrated for 15 min followed by incubation overnight at 4 °C with 1:50 diluted monoclonal antibody to BHV5 (BHV52F9) (Goldoni et al. 2004) and 1:100 diluted N200 monoclonal antibody (Sigma-Aldrich®) produced against neurofilament. After three washes, slides were incubated with the respective goat secondary antibody (1:100) anti-mouse FITC (Sigma-Aldrich®) and nuclear staining was performed with 1 mg/ml of DAPI (4'-6-diamino-2-phenylindole; Sigma-Aldrich®) was diluted in Fluormount™ aqueous medium. The images were collected under an AxioImager® A.1 light and an ultraviolet (UV) microscope connected to an AxioCam® MRc (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). The images were processed using AxioVision® 4.8 software (Carl Zeiss) for viral antigen detection and neuron cells.

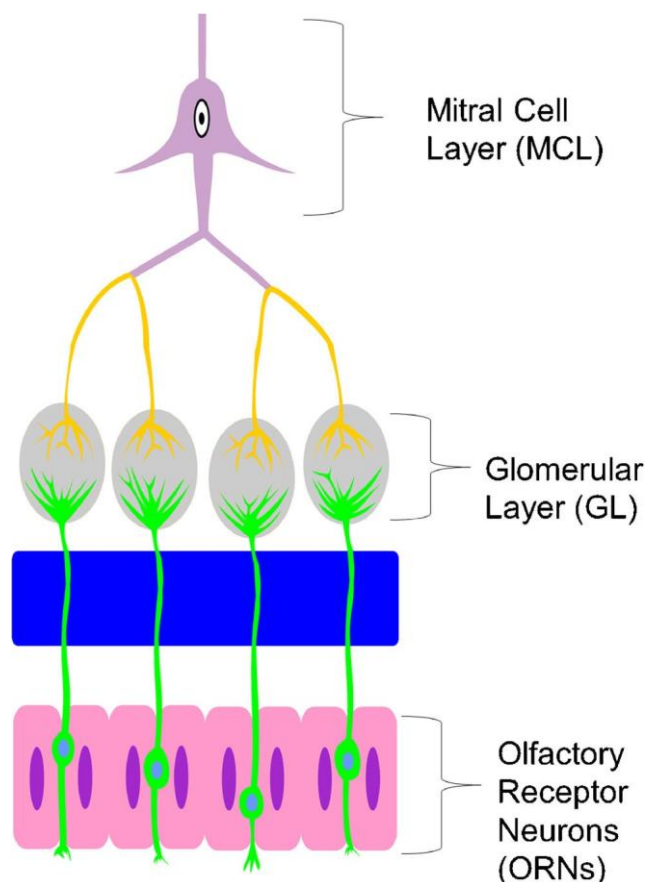


Fig. 1 Schematic overview of the bovine olfactory bulb (OB) regions examined in this study: olfactory receptor neurons (ORNs), glomerular layer (GL), and mitral layer (ML)

#### BHV5 DNA detection by quantitative real-time polymerase chain reaction

Briefly, total DNA from each OB region and respective negative control was extracted using DNAzol™ according to manufacturer's instructions (Invitrogen®). An average of 100 ng of genomic DNA were used for quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) and BHV5 primers and respective probes developed for *glycol-C* gene were used as described previously (Cardoso et al. 2016b). The data obtained from three replicates were carried out by qPCR reaction and analyzed by the software on a StepOnePlus™ real time instrument (Applied Biosystems®). Housekeeping Histone 2a gene (*H2A*) was used for normalization and comparative delta-delta *Ct* method applied to analyze the results (Livak and Schmittgen 2001).

#### RNA extraction, RNA integrity and cDNA generation

OB samples stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  in RNAlater™ (Ambien, Paisley, UK) were thawed on ice and RNA extracted using a Trizol™ protocol according to manufacturer's instructions

(Invitrogen®) with a DNase digestion step to remove contaminating genomic DNA using TurboDNase™ (Ambien, Paisley, UK). RNA concentration was determined using the Nanodrop™ ND-2000 spectrophotometer (Thermo-Scientific, Wilmington, DE, USA) and samples were diluted in nuclease-free water appropriately to give a final concentration of 40 ng/μL per sample. The RNA integrity was determined using an Agilent 2100 Bioanalyzer™ (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). All samples included in this study had an RNA Integrity Number (RIN) value in excess of six. cDNA was generated using an Enhanced Avian™ RT First Strand Synthesis Kit (Sigma-Aldrich®), aliquoted and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### Molecular quantification of miR-155 and Toll-like receptors 3, 7, and 9

The qPCR was applied in order to quantify TLR 3, 7, and 9 genes using a single tube assay from 100 ng of cDNA prepared. Both TaqMan™ FAM-MGB primers and probes: *TLR3* Bt03210267\_m1 (cat # 4351372), *TLR7* Bt03225261\_s1 (cat # 4351373), and *TLR9* Bt03224812\_m1 (cat # 4331182). The expression of the housekeeping Histone 2a gene was also quantified in a similar way as viral DNA. The qPCR reaction was conducted as described previously (Cardoso et al. 2016b). The same amount of cDNA applied on TLR3, 7, and 9 transcription was used to detect sequence mature of bta-miR-155 (cat # 25576) and amplification was performed using Advanced miRNA Assay™ (Applied Biosystems®). All reactions were carried out and analyzed as described for BHV5 DNA detection.

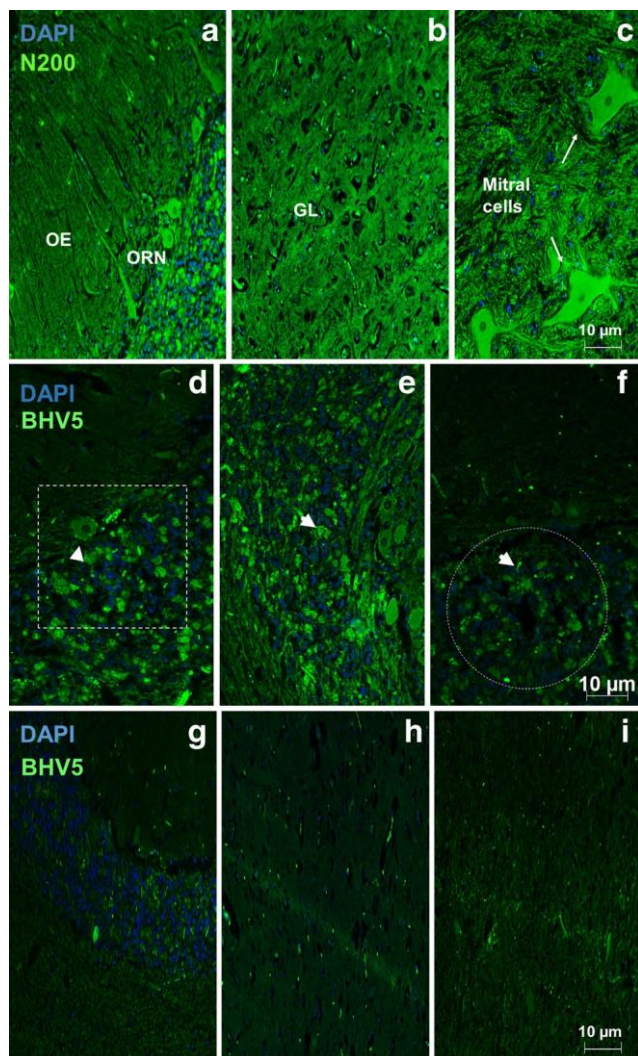
#### Statistical analysis

All experiments were performed at least in duplicate. Descriptive statistics included the mean  $\pm$  standard deviation (s.d.). A *p* value  $< 0.005$  was considered significant. All statistical analyses were performed using Prism software (GraphPad® v.6, CA, USA). Gene expression values were transformed in logs and correlations were evaluated with Spearman correlation coefficient. The differences between various groups were examined for a significance using the non-parametric Mann-Whitney *U* test.

#### Results

##### BHV5 antigens and genome detection

The control samples, represented by OBs obtained from healthy animals, were included to elucidate the histology of each studied area, ORNs, GL, and ML (Fig. 2a–c, respectively). The distribution of BHV5 antigens in ORNs, GL, and ML



**Fig. 2** Analysis of negative samples showed OBs, divided into a ORNs, b GL, and c ML stained with N200 monoclonal antibody whereas OE-olfactory epithelium, olfactory receptor neurons, and GL-glomerular layer are represented, respectively. The photomicrography is a representative for all negative OBs analyzed. BHV5 antigen visualization by immunofluorescence performed using monoclonal antibody (BHV5 2F9) against BHV 5 (green) followed by DAPI (blue) counterstain. The photomicrography is a representative for all positive 16 OBs, divided into d ORNs, e GL, and f ML analyzed. The arrows indicate positive label for BHV5 and boxed areas represent viral antigens,  $\times 100$  magnification. The negative OB samples are illustrated g ORNs, h GL, and i ML, respectively

regions is illustrated in Fig. 2d–f, respectively. The ORNs showed positive fluorescence in olfactory neurons and glomerular layer showed by boxed areas (Fig. 2d, e, respectively). The ML revealed positive BHV5 antigens not associated with mitral cells (Fig. 2f). After labeled with BHV52F9 monoclonal control, OBs did not show any positive signal for viral antigens in ORNs, GL, and ML regions (Fig. 2g–i). Detection of BHV5 in the OBs reinforces the role of the olfactory pathway as a route for BHV5 neuroinvasion.

These findings correlated with the distribution of BHV5 genome, since all OBs regions were positive for *glyco-C* BHV5 expression (Fig. 3a).

TLR3, TLR7, and TLR9 expression associated to miR-155 transcription

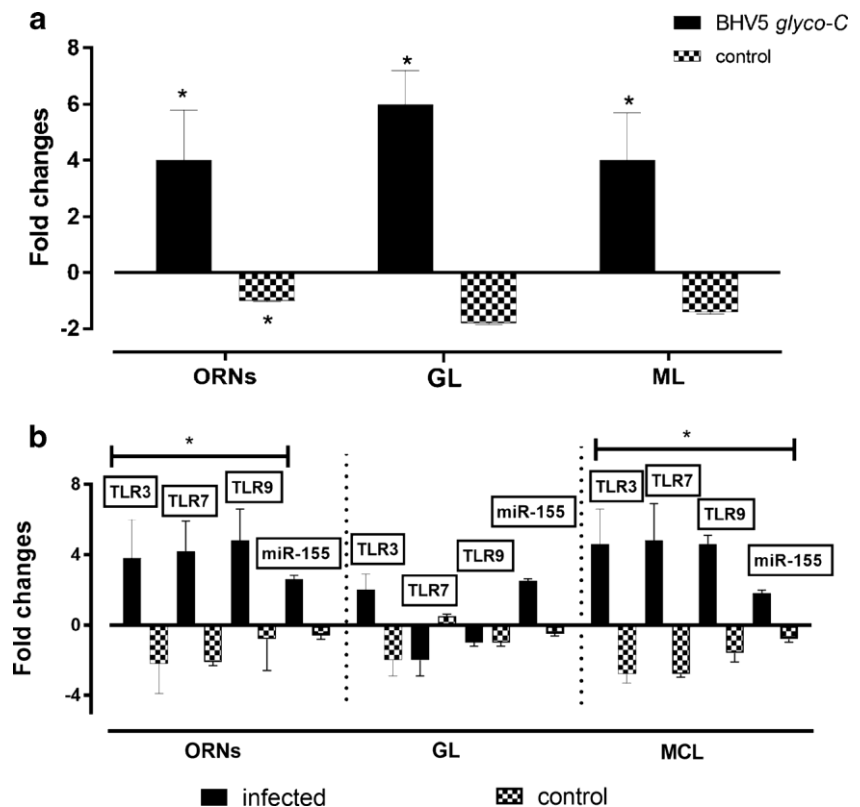
Despite viral expression detected in all OBs regions, only ORNs and ML regions showed TLR3, 7, and 9 upregulation (Fig. 3b). Moreover, only TLR3 was upregulated in GL, while TLR7 and 9 were downregulated. No positive results were observed among control samples. In regard to miR-155 expression, only TLR3 correlated positively in ORNs,  $r = 0.92$  (Fig. 4a). No correlation was observed between TLR and miR-155 expression in GL region (Fig. 4b). However, the highest correlation between the same parameter was found in ML, whereas  $r > 0.90$  was observed in all OBs regions (Fig. 4c).

## Discussion

Toll-like receptors (TLRs) play an important role in host defense against pathogens, including viruses. Among these, TLR3, TLR7, and TLR9 are involved in antiviral responses through cytokine activation, such as the type-I IFNs (Xagorari and Chlichlia 2008). Studies focusing on the interaction between BHV5 and TLRs in the CNS are scarce (Marin et al. 2015). The results presented in the present study provide new information on the regulation of TLR3, TLR7, and TLR9 in ORNs, GL, and ML of OBs by association of their expression with miR-155 transcription. Taken together, these data indicate that BHV5 infection may result in a differential expression of TLRs in neural tissues. Basically, TLR3 showed correlation with miR-155 transcription in ORNs, and all studied TLRs were positively correlated with miR-155 transcription in ML.

The olfactory mucosa is an external barrier of the nasal cavity in human and animals (Mori et al. 2004; van Riel et al. 2015; Winkler et al. 2015). The olfactory neuroepithelium consists of a limited number of cell types, including ORN (Winkler et al. 2015). The course of neurotropic virus infection may include a latent phase in the OBs and neuroepithelium, representing potential for virus reactivation (Mori et al. 2004). For example, HSV1 established latent infection in the murine OBs after experimental infection (Shivkumar et al. 2013) and Equine herpesvirus type 1 (EHV1) remained latent in mitral cells after experimental infection of mice (Mori et al. 2004). Moreover, after experimental inoculation of rabbits, BHV5 is transported retrogradely from the nasal cavity and may be found in the OBs and limbic system (Ludlow et al. 2016). These findings are in agreement, to what has been described in the present study. Nonetheless,

**Fig. 3** a Detection of viral DNA amplification in ORNs, GL, and ML from olfactory bulbs suspensions collected from positive and negative animals. b Transcription of *TLR3*, *TLR7*, *TLR9*, and *miR-155* by qPCR in ORNs, GL, and ML from the same tissue samples. The data is a media (X) plus standard deviation (s.d) of positive and negative samples analyzed



detection/localization of BHV5 antigens in ORNs and GL of OBs regions has not been described previously.

Despite the fact that TLR9 was the only receptor affected by viral infection, and only animals acutely infected showed high levels of TLR9 transcription, olfactory cortices were not the main brain region of TLR9 detection (Marin et al. 2015). These findings contrast our results, in which, in addition to OBs, ORNs, and ML regions also presented upregulation of TLRs. Moreover, BHV5 antigens and genomes were also detected in ORNs and GL regions.

In fact, it has been described that olfactory nerve acts as a shortcut for influenza and other viruses into the CNS (Van Riel et al. 2015) and the neuroepithelium for HSV 1 invasion (Shivkumar et al. 2013). Moreover, defects in TLR3-interferon (IFN) and IFN-responsive pathways were shown to facilitate HSV encephalitis (Verma and Bharti 2017). Therefore, TLR3-mediate immune response in CNS infection should be considered an important pathway to control neuroinvasion (Verma and Bharti 2017). In addition, capillaries in the OBs were shown to be susceptible to virus-induced vascular leak and to facilitate neuroinvasion (Winkler et al. 2015). Recently, a novel role for miR-155 in host defense in a model of viral-induced encephalomyelitis has been supported, by enhancing antiviral T cell responses including cytokine secretion, cytolytic activity, and homing to the CNS in response to coronavirus infection (Dickey et al. 2016). In conclusion, miR-155 may play either a host-

protective or damaging role during neuroinflammation, depending on the disease trigger (Pareek et al. 2004). Interestingly, BHV5 has been shown to encode different microRNAs when compared with BHV1, which could help to explain the differences in cell/tissue tropism (Tang Qi et al. 2014). Taking our results together, we can speculate that ORNs could be the target cells for BHV5 neuroinvasion during natural infections. In, the HSV 1 system, it was established a possible link between miR-155 overexpression and susceptibility of the CNS to virus infection (Bhela et al. 2014) in accordance to what has been proposed in the present study. In addition, induction of miR-155 has been recently associated with HSV 1 acute encephalitis in a mouse model (Majer et al. 2017).

The CNS changes observed during BHV5 infection are composed by an increase of lymphocyte migration during acute, late, or reactivation phases (Cardoso et al. 2016b; Perez et al. 2006). However, the neuropathogenesis of BHV5 neurological disease is not completely understood. Recently, a pro-inflammatory cytokines profile has been demonstrated and an association with CD3+ T cells was established mainly in the OBs (Cardoso et al. 2016b). This could help to understand the high levels of miR-155 transcription in this study, since an association of miR-155 with the immune response has been described for another alphaherpesviruses (Bhela et al. 2014). The importance of miR-155 immune properties has been described in mice

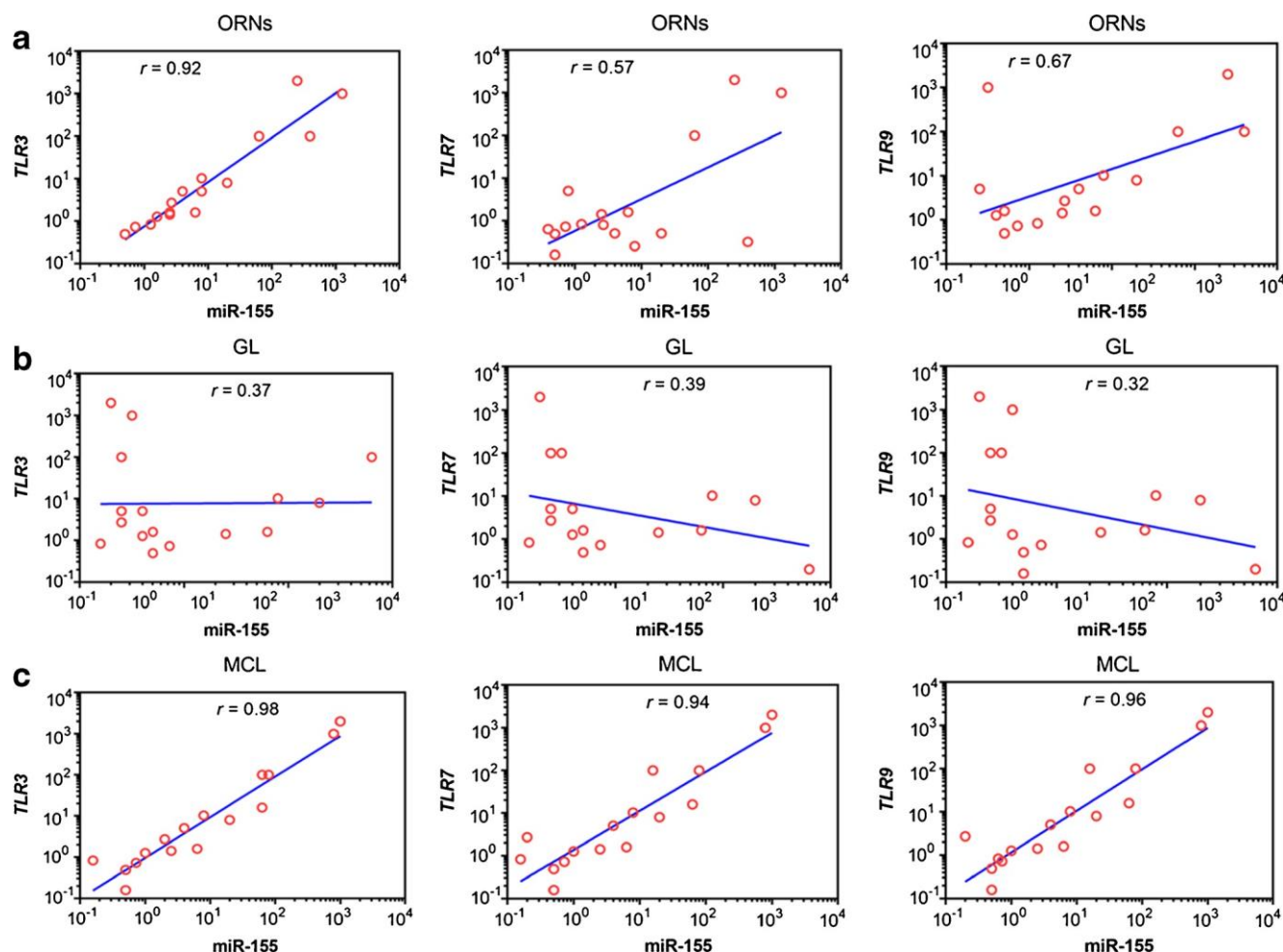


Fig. 4 Correlation between *TLR3*, *TLR7*, *TLR9*, and miR-155 expression in a ORNs, b GL, and c ML from bovine olfactory bulbs naturally infected with BHV5. The correlation coefficient ( $r$ ) was calculated according to the Spearman analysis and  $p < 0.005$  was considered significant

infected with a recombinant influenza virus encoding miR-155 in the NS gene segment, resulting in expansion of CD8<sup>+</sup> T cells and production of high levels of neutralizing antibodies (Izzard et al. 2017).

In summary, the overall results obtained in this work suggest that BHV5 is able to regulate the innate immunity by the TLR pathways associated to miR-155 expression in ORNs and ML. These preliminary results can be useful for further studies focusing on the innate immunity against BHV5 neurological infection under in vitro conditions.

**Acknowledgments** This work was supported by the FAPESP (Grant 2012/16715-4) and CNPq (Grant 500063/2014-1) both Brazilian Council for Research. T.C. Cardoso and E.F. Flores are the recipients of CNPq fellowships.

**Compliance with ethical standards**

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Bhela S, Mulik S, Reddy PB, Richardson RL, Gimenez F, Rajasagi NK, Veiga-Parga T, Osmand AP, Rouse BT (2014) Critical role of microRNA-155 in herpes simplex encephalitis. *J Immunol* 192: 2734–2743
- Bhela S, Mulik S, Reedy PB, Richardson RL, Varanasi SK, Jaggi U, Xu J, Lu PY, Rouse BT (2015) Role of miR-155 in the pathogenesis of herpetic stromal keratitis. *Am J Pathol* 185:1073–1084
- Cardoso AL, Guedes JR, Lima MCP (2016a) Role of microRNAs in the regulation of innate immune cells under neuroinflammatory conditions. *Curr Op Pharmacol* 26:1–9
- Cardoso TC, Ferreira HL, Okamura LH, Giroto TP, Oliveira BRSM, Fabri CUF, Gameiro R, Flores EF (2016b) Cellular response markers and cytokine gene expression in the central nervous system of cattle naturally infected with bovine herpesvirus 5. *Vet J* 218:71–77
- Chowdhury SI, Lee BJ, Moiser D, Sur JH, Osorio FA, Kennedy G, Weiss ML (1997) Neuropathology of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) meningoencephalitis in a rabbit seizure model. *J Comp Pathol* 117: 295–310
- Davison AJ (2010) Herpesvirus systematics. *Vet Microbiol* 143:52–69

- Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellet PE, Roizman B, Studdert MJ, Thiry E (2009) The order *Herpesvirales*. Arch Virol 154:171–177
- Dickey LL, Hanley TM, Huffaker TB, Ramstead AG, O'Connel RM, Lane TE (2017) MicroRNA 155 and viral-induced neuroinflammation. J Neuroimmunol. doi:10.1016/j.jneuroim.2017.01.016
- Dickey LL, Worne CL, Glover JL, Lane TE, O'Connel RM (2016) MicroRNA-155 enhances T cell trafficking and antiviral effector function in a model of coronavirus-induced neurological disease. J Neuro-Oncol 13:240
- Favier PA, Marin MS, Moran PE, Odeon AC, Verna AE, Perez SE (2014) Latency of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) in tonsils and peripheral blood leukocytes. Vet J 202:134–140
- Glazov EA, Kogswan K, Assavalapsakul W, Horwood PF, Mitter N, Mahony TJ (2009) Repertoire of bovine miRNA and miRNA-like small regulatory of bovine miRNA and miRNA-like small regulatory RNAs expressed upon viral infection. PLoS One 4:e6349
- Grey F (2015) Role of microRNAs in herpesvirus latency and persistence. J Gen Virol 96:739–751
- Izzard L, Dlugoleski D, Xia Y, McMahon M, Middleton D, Stambas J (2017) Enhanced immunogenicity following miR-155 incorporation into influenza A virus genome. Virus Res doi. doi:10.1016/j.virusres.2017.04.002
- Livak K, Schmittgen T (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> method. Methods 25:402–408
- Ludlow M, Kortekaas J, Herden C, Hoffmann B, Tappe D, Trebst C, Griffin DE, Brindle HE, Solomon T, Brown AS, van Riel D, Wolthers KC, Pajkrt D, Wohlsein P, Martina KC, Baumgärtner VGM, Osterhaus ADME (2016) Neurotropic virus infections as the cause of immediate and delayed neuropathology. Acta Neuropathol 131:159–184
- Majer A, Caligiuri KA, Gale KK, Niu Y, Phillipson CS, Booth TF, Booth SA (2017) Induction of multiple miR-200/182 members in the brains of mice are associated with acute herpes simplex virus 1 encephalitis. PLoS 3:0169081
- Marin MS, Quintana S, Leunda MR, Odeon AC, Perez SE (2015) Toll-like receptor expression in the nervous system of bovine alpha-herpesvirus-infected calves. Res Vet Sci 97:422–429
- Mori I, Nishiyama Y, Yokochi T, Kimura Y (2004) Olfactory transmission of neurotropic viruses. J Neuro-Oncol 11:129–137
- Oldoni I, Weiblen R, Inkelmann MA, Flores EF (2004) Production and characterization of monoclonal antibodies to a Brazilian bovine herpesvirus type 5. Braz J Med Biol Res 37:213–221
- Pareek S, Roy S, Kumari B, Jain P, Banerjee A, Vrati S (2004) miR-155 induction in microglial cells suppress Japanese encephalitis virus replication and negatively modulates innate immune responses. J Neuroinflammation 11:97
- Perez S, Lovato L, Zhou J, Doster A, Jones C (2006) Comparison of inflammatory infiltrates in trigeminal ganglia of cattle infected with wild-type Bovine herpesvirus 1 versus a virus strain containing a mutation in the LR (latency-related) gene. J Neuro-Oncol 12:392–397
- Piedade D, Azevedo-Pereira M (2016) The role of microRNAs in the pathogenesis of herpesvirus infection. Viruses 8:156
- Powdrill MH, Desrochers GF, Singaravelu R, Pezacki JP (2016) The role of microRNAs in metabolic interactions between viruses and their hosts. Curr Op Virol 19:71–76
- Shivkumar M, Milho R, May JS, Nicoll MP, Efsthiaou S, Stevenson PG (2013) Herpes simplex virus 1 targets the murine olfactory neuroepithelium for host entry. J Virol 87:10477–10488
- Sorel O, Dewals BG (2016) MicroRNAs in large herpesvirus DNA genomes: recent advances. BioMol Concepts 7:229–239
- Tang Qi WY-Q, Chen D-S, Zhou Q, Chen H-C, Liu Z-F (2014) Bovine herpesvirus 5 encodes a unique pattern of microRNAs compared with bovine herpesvirus 1. J Gen Virol 95:671–678
- Van Riel D, Verdijk R, Kuiken T (2015) The olfactory nerve: a shortcut for influenza and other viral diseases into the central nervous system. J Pathol 235:277–287
- Verma R, Bharti K (2017) Toll like receptor 3 and viral infections of nervous system. J Neurol Sci 372:40–48
- Vogel FS, Caron L, Flores EF, Weiblen R, Winkelmann ER, Mayer SV, Bastos RG (2003) Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. J Clin Microbiol 41:4512205
- Winkler CW, Race B, Philips K, Peterson KE (2015) Capillaries in the olfactory bulb but not the cortex are highly susceptible to virus-induced vascular leak and promote viral neuroinvasion. Acta Neuropathol 130:233–245
- Xagorari A, Chlichlia K (2008) Toll-like receptors and viruses: induction of innate antiviral immune responses. The Open Microbiol J 2:49–59