

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**Resposta imune humoral em bovinos induzida pela
glicoproteína D recombinante de herpesvírus bovino
tipo 5**

Itauá Leston Araujo

Pelotas, 2014

ITAUÁ LESTON ARAUJO

**Resposta imune humoral em bovinos induzida pela glicoproteína D
recombinante de herpesvírus bovino tipo 5**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do Conhecimento: Biologia Celular e Imunologia).

Orientador: Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite
Coorientador (a): Dr^a. Luana Alves Dummer

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:
Maria Beatriz Vagheti Vieira – CRB-10/1032

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

A663r Araujo, Itauá Leston

Resposta imune tumoral em bovinos induzida pela glicoproteína D recombinante de herpesvírus bovino tipo 5 / Itauá Leston Araujo. – 58f. : il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Área de concentração: Biologia celular e Imunologia. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2014. – Orientador Fábio Pereira Leivas Leite; co-orientador Luana Alves Dummer.

1. Biotecnologia. 2. Bovinos. 3. *Pichia pastoris*. 4. Herpes.
I. Leite, Fábio Pereira Leivas. II. Dummer, Luana Alves. III.
Título.

CDD: 636.2083

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fabrício Souza Campos (Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

Prof. Dr. Fabricio Rochedo Conceição (Universidade Federal de Pelotas)

Prof. Dr. Geferson Fischer (Universidade Federal de Pelotas)

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (Universidade Federal de Pelotas)

Agradecimentos

Aos meus pais, Rosa Meri Leston Araujo e Tibiriçá Almada Araujo, pelo amor; e aos meus irmãos, Barthira, Mahinã e Júnior pela amizade;

A minha namorada, Mônica Silveira Wagner, pelo amor e por ter aguentado meus finais de semana no laboratório;

Ao meu orientador, Prof. Fábio Pereira Leivas Leite, por todo o incentivo, pela paciência e amizade;

A agora Dra. Luana Alves Dummer que me ensinou ser possível fazer 22 placas de ELISA em apenas 1 dia e é claro por toda a amizade e voluntariedade de sempre;

Ao professor Geferson Fischer por sempre estender a mão em todas as vezes que pedi material do seu laboratório;

Ao Paulo Ricardo Centeno Rodrigues do Laboratório de Virologia e Imunologia da Faculdade de Veterinária, pela ajuda na SN de quase 1000 soros;

Aos amigos, Matheus Costa da Rosa e Alceu Gonçalves dos Santos Junior, que sempre me ajudaram em todas as 46 coletas, nas vacinações dos 267 bovinos nas 5 fazendas durante o mestrado;

A Luciana Ávila por toda a ajuda e principalmente pela calma na hora de explicar sobre o que fosse;

A Helena Strelow Thurow do laboratório 9 pelas noites de RT-PCR na semana que mais teve queda de luz;

Agradecer a Patrícia (Bilica), Paula Finger, Michele Pepe, Régis, Livia, Renan, pela amizade;

Ao pessoal da secretaria, o Wilson, a Michele e a Carol Lopes pela boa vontade e educação de sempre em ajudar;

A Capes pelo apoio financeiro.

Resumo

ARAÚJO, Itauá. **Resposta imune humoral em bovinos induzida pela glicoproteína D recombinante de herpesvírus bovino tipo 5**. 2014. 58f. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A glicoproteína D (gD) é essencial para ligação e penetração de herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) em células suscetíveis, e é um alvo importante do sistema imune do hospedeiro, induzindo respostas imunes humoral e celular. A imunogenicidade da glicoproteína D recombinante de BoHV-5 (rgD5) expressa em *Pichia pastoris* foi avaliada em bovinos. Vacinas formuladas com 100 µg de rgD5 por dose e adjuvante a base de óleo (Montanide ISA50V2) ou hidróxido de alumínio, com ou sem adição de BoHV-5 inativado foram administradas via intramuscular, e uma vacina comercial utilizada como controle. A vacina rgD5 + ISA50V2 estimulou resposta imune humoral após duas doses, e os mais elevados títulos de anticorpos neutralizantes foram obtidos em todas as três formulações de adjuvantes à base de óleo quando comparado com a formulação de vacinas de adjuvante de hidróxido de alumínio e vacina comercial. A vacina BoHV-5 + rgD5 + ISA50V2 estimulou títulos de anticorpos neutralizantes aproximadamente a $8 \log^2$, demonstrando correlação significativa com o ELISA indireto. Em conjunto, os resultados sugerem que a rgD5 conservou epítomos neutralizantes e foi capaz de estimular uma resposta imune humoral eficiente em bovinos.

Palavras-chave: adjuvante oleoso, *Pichia pastoris*, ELISA, alfa herpesvírus, vacina de subunidade

Abstract

ARAÚJO, Itauá. **Induced humoral immune responses in bovines to recombinant glycoprotein D of bovine herpesvirus type 5**. 2014. 58f. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Glycoprotein D (gD) is essential for attachment and penetration of *bovine herpesvirus type 5* (BoHV-5) into susceptible cells, and is a major target of host immune systems, inducing strong humoral and cellular immune responses. The immunogenicity of recombinant BoHV-5 (rgD5) expressed in *Pichia pastoris* was evaluated in bovines. Vaccines formulated with 100 µg rgD5 dose and adjuvants (Montanide ISA50V2 or Aluminum Hydroxide) with or without inactivated BoHV-5 or rgD5 without adjuvants were administered intramuscularly. A commercial vaccine was also used as control. The vaccine formulation rgD5 + ISA50V2 stimulated humoral immune responses after two doses, and higher titer of neutralizing antibodies were obtained in all three oil-based adjuvants formulations when compared to Hydroxide Aluminium adjuvant or the commercial vaccine. The vaccine BoHV-5 + rgD5 + ISA50V2 stimulated titers of neutralizing antibodies approximately $8 \log^2$, which demonstrated higher correlations on the Indirect ELISA. Together, the results suggest that the recombinant gD5 conserved neutralizing epitopes and was able to stimulate a efficient humoral immune response in bovines.

Key Words: oil adjuvant, *Pichia pastoris*, ELISA, Alphaherpesviruses, subunit vaccine

Lista de Abreviaturas

- 1
- 2
- 3
- 4 AA – Amino Acid (aminoácido)
- 5 ABIEC – Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes
- 6 ADCC – Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity (Citotoxicidade Celular
7 Dependente de Anticorpos)
- 8 ASC – *Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD*
- 9 BIR – *Baculovirus Inhibitor of Apoptosis Repeat*
- 10 BoHV-1 – *bovine herpesvirus type 1* (herpesvírus bovino tipo 1)
- 11 BoHV-5 – *bovine herpesvirus type 5* (herpesvírus bovino tipo 5)
- 12 BRD – Bovine Respiratory Disease (Doença Respiratória de Bovinos)
- 13 CARD – *C-terminal Caspase-Recruitment Domain*
- 14 CD4⁺ – *T helper cell cluster of differentiation 4*
- 15 CD8⁺ – *Cytotoxic T cells with cluster of differentiation 8 surface protein*
- 16 DAMPs – *Damage-Associated Molecular Pattern Molecules* (Padrões
17 Moleculares Associados ao Dano)
- 18 DICC₅₀ – Doses Infectantes para 50% dos Cultivos Celulares
- 19 DNA – Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)
- 20 D.O. – Densidade Óptica
- 21 ELISA – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (Ensaio de Adsorção
22 Imunoenzimático)
- 23 gB1 – glicoproteína B do herpesvírus bovino tipo 1
- 24 gC1 – glicoproteína C do herpesvírus bovino tipo 1
- 25 gD1 – glicoproteína D do herpesvírus bovino tipo 1
- 26 gD5 – glicoproteína D do herpesvírus bovino tipo 5
- 27 gH – glycoprotein H (glicoproteína H)
- 28 gL – glycoprotein L (glicoproteína L)
- 29 HSV – *Herpes Simplex Vírus*
- 30 HSV-1 – *Herpes Simplex Vírus 1*
- 31 HSV-2 – *Herpes Simplex Vírus 2*

- 1 HveB – *Herpesvirus entry mediator B*
- 2 HveC – *Herpesvirus entry mediator C*
- 3 IBR – *Infectious Bovine Rhinotracheitis* (Rinotraqueíte Infecciosa Bovina)
- 4 IgE – Immunoglobulin E (Imunoglobulina E)
- 5 IgG – Immunoglobulin G (Imunoglobulina G)
- 6 IPB – *Infectious Pustular Balanoposthitis* (Balanopostite Pustular Infecciosa)
- 7 IPV – *Infectious Pustular Vulvovaginitis* (Vulvovaginite Pustular Infecciosa)
- 8 LRR – *Leucine-Rich Repeat*
- 9 MDIC – Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior
- 10 K⁺ – Potassium (Potássio)
- 11 mAbs – *Monoclonal antibodies* (Anticorpo monoclonal)
- 12 MDBK – *Madin Darby Bovine Kidney Cells* (Célula de Rim Bovino)
- 13 MSU – Monosodium Urate (cristais de urato monossódico)
- 14 NAIP – *Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein*
- 15 NLR – Nod-Like Receptor (receptor do tipo NOD)
- 16 NLRP3 – *NOD-Like Receptors Domain 3* (nucleotídeo de ligação às proteínas
17 receptor-like domínio 3)
- 18 ORF – *Open Reading Frame* (Fase de Leitura Aberta)
- 19 PBS-T – *Phosphate Buffered Saline Tween-20* (Salina Tamponada com
20 Fosfato)
- 21 PEG – *Poly(Ethylene Glycol)*
- 22 PYD – *N-terminal PYRIN-PAAD-DAPIN Domain*
- 23 rgD1 – glicoproteína D recombinante do herpesvírus bovino tipo 1
- 24 rgD5 – glicoproteína D recombinante do herpesvírus bovino tipo 5
- 25 SNC – Sistema Nervoso Central
- 26 SNT – Serum Neutralization Test
- 27 Th1 – T auxiliar 1
- 28 Th2 – T auxiliar 2
- 29 TLR – *Toll Like Receptor*
- 30 TNE – *Tailorable Nanosized Emulsion*

Sumário

1		
2		
3		
4	1 INTRODUÇÃO GERAL	10
5	2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
6	2.1 Bovinocultura	13
7	2.2 Herpesvírus bovino tipo 1 e 5	13
8	2.3 Glicoproteína D	14
9	2.4 Adjuvantes imunobiológicos.....	16
10	2.5 Classificação dos adjuvantes.....	17
11	2.6 Sais de alumínio.....	18
12	2.7 Emulsões de óleo em soluções aquosas	20
13	2.8 Vacinas contra BoHV-5.....	23
14	3 HIPÓTESE E OBJETIVO	25
15	3.1 Hipótese.....	25
16	3.2 Objetivo Geral	25
17	3.3 Objetivos Específicos.....	25
18	4 CAPÍTULO	26
19	4.1 Manuscrito 1 – Humoral responses in bovines to recombinant	
20	glycoprotein D of bovine herpesvirus type 5 as vaccine antigen	26
21	4.1.1 (1.) Introduction.....	28
22	4.1.2 (2.) Materials and methods.....	30
23	4.1.2.1 (2.1.) Expression of recombinant glycoprotein D	30
24	4.1.2.2 (2.2.) Cells and viruses	31
25	4.1.2.3 (2.3.) Vaccine preparations and inoculations	32
26	4.1.2.4 (2.4.) Total IgG kinetics against rgD5.....	33
27	4.1.2.5 (2.5.) IgG – isotyping against rgD5	33
28	4.1.2.6 (2.6.) Serum Neutralization Test (SNT)	34

1	4.1.2.7 (2.7.) <i>Statistical analysis</i>	35
2	4.1.3 (3.) Results	36
3	4.1.3.1 (3.1.) <i>Total IgG Kinetics against rgD5</i>	36
4	4.1.3.2 (3.2.) <i>IgG – isotyping against rgD5</i>	36
5	4.1.3.3 (3.3.) <i>Serum Neutralization Test (SNT)</i>	36
6	4.1.3.4 (3.4.) <i>Dynamics of serum IgG antibodies against rgD5, BoHV-1</i>	
7	<i>and BoHV-5</i>	37
8	4.1.4 (4.) Discussion	43
9	5 CONCLUSÃO GERAL.....	52
10	6 REFERÊNCIAS.....	53
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		

1 INTRODUÇÃO GERAL

O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*. Os isolados de BoHV-5 são classificadas em três subtipos baseados na análise de DNA viral por endonuclease de restrição (Metzler et al., 1986, D'Arce et al., 2002). Os subtipos a, b e c (não-a-não-b), correspondem respectivamente aos isolados australiano N569, argentino A663 e brasileiros (ISO 97/45 e ISO 97/87) (Pidone et al., 1999, D'Arce et al., 2002, Souza, 2002). Surtos de meningoencefalite podem chegar a uma taxa de mortalidade de 70-100% quando associado com o BoHV-5 (Vogel et al., 2003). A doença afeta bovinos jovens e é responsável por perdas econômicas importantes na América do Sul (Weiblen et al., 1989). Em um primeiro momento avaliado como uma variante neuropatogênica de BoHV-1 (French, 1962), devido a sua biologia, morfologia e as propriedades antigênicas, o BoHV-5 foi reconhecido em 1992 como um vírus distinto (Roizmann et al., 1992).

Estudos moleculares e imunológicos com base no mapeamento de restrição do DNA viral e a reatividade de anticorpos monoclonais (D9, C6, CI 1, F2, G2, H2 (Collins et al., 1984); 4407, 4807, 5106, 5606, 1507, 1808, 2905, 3002, 1808, 1102, 1106, 3402, 4906, 5006 (Marshall et al., 1986); 1EII, 1F8, 1F10, 3C7, 3F3, 5G2, 5GII, 3H7, 3E3, 3F12, 1E2, 3G8, 1D6, 2AII, 1FII (van Drunen Littel-van den Hurk et al., 1985); 136, 4C1, 10C2, 3C1, 3E7, 9D6 (Hughes et al., 1988); 3D9S (van Drunen Littel-van den Hurk and Babiuk, 1986) indicaram que os vírus diferem nas suas propriedades antigênicas, apesar de ter 85 % de identidade de DNA (Delhon et al., 2003). Embora o BoHV-5 e o BoHV-1 sejam genética e antigenicamente relacionados, eles diferem em suas capacidades neuroinvasiva e neurovirulência. A neuroinvasividade do BoHV-1 geralmente não ultrapassa mais do que o neurônio de primeira ordem localizado no gânglio trigeminal, onde a infecção latente é estabelecida, enquanto o BoHV-5 é capaz de infectar diferentes regiões do cérebro (Carrillo et al., 1983, Perez et al., 2002, Vogel et al., 2003).

Os sinais característicos do BoHV-5 incluem depressão, dificuldade de ingestão de água e apreensão de alimentos, bruxismo (rangir de dentes),

sialorréia, opistótono e andar cambaleante, cegueira, convulsões (muitas vezes confundidos com outras doenças, como poliencefalomalácia) e agravamento progressivo da situação, atingindo altas taxas de mortalidade. O neurotropismo e neuroinvasividade são propriedades importantes deste vírus. O BoHV-5 após a infecção primária nos locais da penetração (células epiteliais), invade as terminações nervosas e são transportados no sentido retrógrado até o sistema nervoso central (SNC) de bovinos, espalhando e destruindo neurônios e outras células durante a infecção aguda ou o estabelecimento da infecção latente. O caminho olfativo é preferencialmente utilizado pelo BoHV-5 durante a infecção aguda (Chowdhury et al., 1997, Lee et al., 1999). A via trigeminal também pode ser utilizada, mas esta parece ser mais importante para o estabelecimento de infecções latentes (Lee et al., 1999, Rissi et al., 2008). Diferentes tipos e subtipos de BoHV-1 e BoHV-5 exibem extensa reatividade sorológica cruzada, que pode ser evidenciada em testes de soroneutralização (SN). Tais reatividades cruzadas impedem o uso de SN para distinguir tipos específicos de respostas imunes ou para discriminar as infecções de vírus de diferentes tipos (Campos et al., 2009).

No entanto, o grau real de reatividade cruzada sorológica entre estes vírus não foi avaliada em detalhe. Além disso, estudos com SN foram em sua maioria realizados sem levar em conta a proposta de subdivisão de herpesvírus bovino tipo / subtipo (Kramps et al., 1996). Embora a vacinação anterior de bovinos com BoHV-1 resultou em proteção contra a doença neurológica causada pelo BoHV-5, devido à reatividade cruzada induzida por BoHV-1 (Vogel et al., 2003) os anticorpos neutralizantes não impediram a infecção e estabelecimento de latência por BoHV-5 (Cascio et al., 1999).

Vacinas de subunidades são novas estratégias contra os herpesvírus e estão baseadas nas principais glicoproteínas do envelope viral, devido as suas importantes funções biológicas e imunológicas (van Drunen Littel-van den Hurk et al., 1992, Chowdhury, 1995, Abdelmagid et al., 1995, Gupta et al., 2001, Okazaki et al., 2006). Estas proteínas atuam sobre a adsorção e a penetração do vírus na célula e, medeiam as respostas imunitárias do hospedeiro a infecção (Babiuk et al., 1996). Três glicoproteínas do BoHV-1, gB1, gC1 e gD1 foram testadas individualmente como potenciais antígenos, e embora elas

tenham conferido proteção contra a doença (Babiuk et al., 1987), a gD1 tem melhor capacidade de induzir uma resposta imunológica celular forte quando comparada com as induzidas pelas outras glicoproteínas mencionadas (Hutchings et al., 1990, Geraghty et al., 2000). A gD e a gB são as únicas glicoproteínas que podem induzir resposta imune que resulta em redução significativa da replicação e excreção viral (Israel et al., 1992, van Drunen Littel-van den Hurk et al., 1993). Entretanto, a gD do BoHV-1 induz uma resposta imune mais forte e mais consistente que a gB e gC (Hutchings et al., 1990). AcMs contra a gD demonstraram os maiores títulos neutralizantes na ausência de complemento e inibiram a adsorção e penetração viral (Hughes et al., 1988, van Drunen Littel-van den Hurk et al., 1990, Dubuisson et al., 1992). A gD1 tem sido usada como antígeno para a imunização de bovinos desde décadas passadas, aplicada em estratégias de vacinas de subunidade ou de DNA, sendo eficiente na redução da replicação viral, excreção viral e sinais clínicos (Ioannou et al., 2002).

A gD1 e gD5 tem 79,9% de identidade de aminoácidos e a gD5 fornece a capacidade desse vírus em infectar células que não são acessíveis para BoHV-1, uma vez que é sugerido que a gD5 pode interagir ou se ligar a todas as quatro nectinas (1-4) aumentando sua virulência (Gabev et al., 2010). As glicoproteínas também diferem em um sítio de glicosilação ligado a região N-terminal, que está ausente no BoHV-5 (Abdelmagid et al., 1995). Nosso grupo já havia relatado sua expressão em *Pichia pastoris* e sua caracterização antigênica (Dummer et al., 2009). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a resposta imune em bovinos vacinados com o gD5 recombinante.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bovinocultura

Um dos mais tradicionais segmentos da atividade produtiva e industrial do País, a criação de gado, de corte ou de leite, impulsiona a economia em praticamente todas as regiões. Com cerca de 212 milhões de cabeças bovinas, o rebanho é um dos maiores do mundo, e em torno dele os índices de desempenho têm crescido ano a ano. Em 2012, a cadeia produtiva retomou a condição de maior exportadora de carne de gado do mundo, recuperando o posto que havia sido perdido para a Austrália no ano anterior. Os embarques resultaram em receita de US\$ 5,769 bilhões, recorde absoluto, 6,8% superior ao melhor faturamento registrado até então, em 2008. As vendas envolveram volume de 1,134 milhão de toneladas, com crescimento de 13,39% em relação ao ano anterior (POLL et al., 2013).

No primeiro trimestre de 2013, o Brasil acelerou o passo rumo a novo recorde. O Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC) registrou que as exportações de carne bovina *in natura* no primeiro trimestre de 2013 somaram 325,8 mil toneladas equivalente carcaça, volume 33,9% maior do que o do mesmo período de 2012. As vendas somaram US\$ 1,46 bilhão, com aumento de 19,7%. Para 2013, a Abiec espera por crescimento de aproximadamente 10% nas divisas obtidas com a carne, devendo alcançar a US\$ 6,35 bilhões (POLL et al., 2013). No entanto, o país ainda possui perdas econômicas relacionadas a doenças que atingem os rebanhos e que podem prejudicar o ganho de peso, índices reprodutivos ou até mesmo ocasionar a perda de animais.

2.2 Herpesvírus bovinos tipo 1 e 5

A família *Herpesviridae* engloba um grande e diversificado número de vírus envelopados e é composta por três subfamílias, Alpha, Beta e *Gammaherpesvirinae*. Os vírus são classificados dentro de características

importantes da subfamília *Alphaherpesvirinae*: um ciclo reprodutivo rápido e, em pelo menos três gêneros desta subfamília, a capacidade de invasão neuronal e o estabelecimento de latência em gânglios nervosos sensoriais (Meyer et al., 2001). O herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) é um patógeno de bovinos associado com grandes síndromes, chamadas de rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), vulvovaginite pustular infecciosa (IPV) e Balanopostite pustular infecciosa (IPB) (Meyer et al., 2001). É um dos patógenos envolvidos no Complexo Respiratório Bovino (BRD), também chamado de "febre do transporte", afetando economicamente produtores, reduzindo o ganho de peso diário, a eficiência alimentar, e o desempenho geral de bezerros.

A infecção pelo BoHV-5 ocorre nos mesmos locais de entrada potenciais para o BoHV-1, ou seja, cavidade nasal, olhos, orofaringe e o trato genital. Após a penetração a replicação geralmente ocorre nas células epiteliais e, em seguida, o vírus pode se disseminar para os neurônios. Apesar de BoHV-5 e BoHV-1 serem genética e antigenicamente relacionados, compartilhando em média 85% de identidade em suas seqüências de aminoácidos (Delhon et al., 2003), eles diferem em sua neuroinvasividade e capacidade de neurovirulência. A neuroinvasão por BoHV-1 geralmente não vai além do neurônio de primeira ordem localizado no gânglio trigeminal em que a infecção latente esteja estabelecida, ao passo que o BoHV-5 é capaz de infectar diferentes regiões do cérebro, causando encefalite potencialmente letal em animais jovens (Del Medico Zajac et al., 2010).

2.3 Glicoproteína D

A gD é uma glicoproteína essencial para a ligação com os receptores em muitos alfa herpesvírus (Jogger et al., 2004, Campadelli-Fiume, 2007), principalmente receptores das famílias do fator de necrose tumoral, como o mediador de entrada de herpesvírus (HveA), e do poliovírus (HveB ou nectin 2 e HveC ou nectin 1) (Montgomery et al., 1996, Warner et al., 1998, Geraghty et al., 2000). Além de uma forma modificada do sulfato heparan (Shukla et al., 2000, Stiles et al., 2008). A região N-terminal da gD é importante na

neutralização viral durante a geração de resposta imune. A maioria dos anticorpos reage com a região 5' da ORF da gD (entre os resíduos 1 a 216), correspondendo à região N-terminal. Alguns anticorpos monoclonais (mAbs) estudados podem impedir a penetração do BoHV-1 na célula, ou seja, neutralizam o BoHV-1, mas não neutralizam o BoHV-5 (Abdelmagid et al., 1995). Além disso, a gD induz resposta imune celular de maior magnitude que a gB ou a gC (Hutchings et al., 1990, Thiry et al., 2006). A gD também é alvo de células *Natural Killer*, uma vez que é uma das primeiras proteínas virais a serem expostas na face externa da membrana da célula infectada. Anticorpos contra essa glicoproteína também podem estimular a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) (Babiuk, 2003).

O gene da gD codifica 417 aa distribuídos em um peptídeo sinal de 18 aa, um domínio extracelular, uma região transmembrana (361-389 aa) e uma cauda citoplasmática de 28 aa (Tikoo et al., 1990). A sequência de aa da gD entre o BoHV-1 e BoHV-5 foi relatada como tendo 98% de similaridade (Delhon et al., 2003). No entanto Gabev et al., 2010 relatou um nível de identidade de aa de 79,9% entre as gD dos dois vírus, com diferenças maiores mapeadas em uma região rica em glicina no ectodomínio da molécula, entre os aa 280 e 330 da gD do BoHV-5, próxima a região transmembrana. As maiores diferenças na gD entre o BoHV-1 e -5 estão na região C-terminal, entre os aa 283 e 354 do BoHV-5 (Abdelmagid et al., 1995). Essa região pode ser importante nas interações da proteína e a região entre 245 a 320 aa é importante no processamento e transporte da gD até a superfície celular (Tikoo et al., 1993). Essas diferenças podem contribuir para a determinação das propriedades biológicas do BoHV-5, inclusive a neuroinvasividade. Sabe-se que a gD do herpesvírus simplex humano (HSV) está envolvida na patogênese da doença neurológica (Izumi and Stevens, 1990). No entanto, em estudo utilizando mutantes do BoHV-1 e BoHV-5 contendo a gD da espécie heteróloga, a gD do BoHV-5 conferiu um amplo espectro celular de hospedeiros para o BoHV-1 e pode ser considerada como um fator de virulência, mas não contribui para a invasão do cérebro (Gabev et al., 2010).

A glicoproteína D atua na fusão entre as membranas, permitindo, após unir-se ao receptor celular, a formação de um complexo composto por outras 3 glicoproteínas (gH/gL, gB). Apenas após a formação deste complexo o capsídeo viral é internalizado (Geraghty et al., 2000). Portanto, a ligação gD-receptor é essencial para a infecção e disseminação viral entre as células do hospedeiro. Anticorpos desenvolvidos contra a gD impedem a fusão do envelope evitando a infecção das células permissivas pelos alfa herpesvírus (Csellner et al., 2000, Geraghty et al., 2000).

Estudos com a gD do BoHV-5 (gD5) demonstram associação com a virulência do BoHV-5. Essa glicoproteína liga-se a quatro diferentes tipos de nectinas (Nectin 1-4), enquanto a gD do BoHV-1 (gD1) liga-se apenas as nectinas 1 e 2. A substituição da gD1 pela gD5 no BoHV-1 aumentou a capacidade de infectar células permissivas deste vírus. A menor glicosilação da gD de BoHV-5 pode tornar sua estrutura tridimensional ainda mais flexível, facilitando a ligação a uma gama mais ampla de receptores celulares (Gabev et al., 2010). Estas evidências apoiam o envolvimento de mecanismos diferentes dos já explorados para justificar neurovirulência, também sugerindo que a gD do BoHV-5 pode ser o principal imunógeno alvo para uma vacina recombinante (Gabev et al., 2010).

2.4 Adjuvantes Imunológicos

Os adjuvantes são moléculas, compostos ou complexos macromoleculares que aumentam, mantem e potencializam a resposta imunitária específica ao antígeno (Douce et al., 1995). Um adjuvante ideal deverá enquadrar-se dentro de alguns critérios, como: 1) ser composto de material barato, simples e de fácil manuseio; 2) ser estável após longos períodos de armazenamento (preferencialmente, o adjuvante deve permitir a liofilização); 3) ser biodegradável; 4) não ser tóxico ou ter toxicidade insignificante; 5) possuir a habilidade de eleger tanto a imunidade mediada por células como a imunidade humoral para antígenos administrados por várias vias; 6) prover imunidade longa e memória imunológica duradoura; 7) sinergia

com outros adjuvantes, se necessário; 8) não induzir autoimunidade; 9) não ser carcinogênico, mutagênico ou teratogênico; 10) não ser pirogênico; 11) ter potencial para selecionar interações entre as populações de células imunocompetentes (Marciani, 2003).

Os adjuvantes podem ser usados para aperfeiçoar a resposta imune de vacinas de várias formas, incluindo: 1) aumentar a imunogenicidade de antígenos (altamente purificado ou recombinante); 2) aumentar a velocidade e a duração da resposta imune; 3) modular a atividade dos anticorpos e sua especificidade; 4) estimular os linfócitos T citotóxicos; 5) promover a indução de imunidade nas mucosas; 6) aumentar a resposta imune em indivíduos imaturos imunologicamente ou senescentes; 7) diminuir a dose de antígeno nas vacinas, reduzindo assim os custos da mesma; 8) ajudar a superar a competição entre antígenos em vacinas combinadas (Singh and O'Hagan, 2003). Outro importante fator pode ser representado pelo fato de que nem todos adjuvantes atuam da mesma maneira com as vacinas. A rota de imunização da vacina, a resposta imunológica a ser desencadeada, a eficácia a ser atingida em animais e humanos e a reatogenicidade dos compostos utilizados, também constituem fatores de grande importância para a seleção de um adjuvante (Del Giudice et al., 2001).

O uso de um adjuvante impróprio pode ter consequências negativas no desenvolvimento de vacinas que o utilizam quanto à convencional seleção de antígenos, ou quanto à abordagem genômica. Considerando que o uso de adjuvantes pode influenciar fortemente a quantidade e a qualidade da resposta imune a uma vacina e a eficácia da mesma, é crucial entender quais os limites que podem afetar a ação dos adjuvantes (Del Giudice et al., 2001).

2.5 Classificação dos Adjuvantes

Há vários critérios diferentes para agrupar as substâncias adjuvantes, permitindo uma comparação racional entre si. Um deles é a sua alocação em dois grandes grupos: particulados e não-particulados (Cox and Coulter, 1997). Além disso, os adjuvantes podem ser separados em duas classes, baseadas

no seu mecanismo de ação: sistemas de transferência e adjuvantes imunoestimulatórios. Os sistemas de transferência geralmente são particulados (emulsões, micropartículas e lipossomas). Os adjuvantes imunoestimulatórios, por sua vez, são derivados predominantemente de patógenos e frequentemente representam padrões moleculares conservados à patógenos (PAMPs) como os lipopolissacarídeos (LPS) ou peptideoglicanos, que ativam células do sistema imune inato (Singh and O'Hagan, 2002).

Adjuvantes particulados são aqueles encontrados sob a forma de partículas microscópicas e que devem algumas de suas propriedades adjuvantes a esta característica. Geralmente os benefícios dos adjuvantes particulados só são percebidos completamente quando um imunógeno pode ser incorporado ou se pelo menos se associou com a partícula. Adjuvantes não particulados são adjuvantes cuja atividade não depende de nenhuma partícula. Normalmente são imunomoduladores (Cox and Coulter, 1997).

2.6 Sais de Alumínio

Compostos de alumínio têm a história mais longa e o registro mais abrangente de adjuvantes utilizados na vacinação humana. Sais de alumínio ativam o nucleotídeo de ligação às proteínas receptor-like domínio 3 (NLRP3) através de dois modelos diferentes. Os dois modelos propostos envolvem a fagocitose, no modelo de ativação direta, células fagocíticas envolvem diretamente e englobam partículas de sal de alumínio (Hornung et al., 2008). O segundo modelo propõe que a citotoxicidade do sal de alumínio é responsável pelo recrutamento celular potencializando a resposta imune. O sal aumenta a liberação por dano endógeno de padrões moleculares associados por células fagocíticas, tais como o ácido úrico, o que por sua vez ativa o inflamassoma NLRP3 (Hornung et al., 2008).

O ácido úrico é um produto catabólico de nucleotídeos e é solúvel em concentrações elevadas no interior das células. Dano ou morte celular causa a liberação de ácido úrico no meio extracelular em que é muito menos solúvel formando cristais MSU (Martinon and Glimcher, 2006). Os NLRs são um grupo

de complexos proteicos que reconhecem diversos estímulos indutores da inflamação chamados inflamassomas, os quais compreendem uma grande família de proteínas intracelulares com uma organização em domínios que geralmente inclui: (i) um domínio de inserção proteína-proteína aminoterminal efetor tipo CARD (*caspase recruitment domain*) ou pirina (exceto para a proteína inibitória de apoptose neuronal NAIP: *neuronal apoptosis inhibitory protein*) a qual tem motivos de repetição do tipo BIR (*baculovirus inhibitor of apoptosis repeat*); (ii) um domínio intermediário NOD, o qual é necessário para ligação a nucleotídeo e auto-oligomerização e (iii) um número variável de motivos de repetição ricos em leucina (LRR: *leucine-rich repeat*) na porção carboxiterminal (Lamkanfi and Dixit, 2009). Os inflamassomas são importantes reguladores da inflamação e são necessários para a ativação proteolítica da caspase-1. A caspase-1 por sua vez é necessária para o processamento proteolítico e secreção de citocinas pro-inflamatórias tais como IL-1 β e IL-18, como também para a indução de um tipo de morte celular denominada piroptose (Fink and Cookson, 2005). As principais características da piroptose são a ruptura da membrana plasmática e a liberação do conteúdo intracelular pró-inflamatório (Bergsbaken et al., 2009).

Acredita-se que múltiplos inflamassomas podem existir, cada um contendo uma proteína chave da “superfamília” dos NLRs que confere especificidade de reconhecimento para um particular produto microbiano. Por exemplo, a proteína NLRP3 (também conhecida como NALP3 ou criopirina) tem sido relacionada ao reconhecimento de uma vasta gama de estímulos incluindo DNA viral (Muruve et al., 2008), cristais de ácido úrico (Martinon et al., 2006), sílica (Cassel et al., 2008) e adjuvantes de alumínio (Eisenbarth et al., 2008, Hornung et al., 2008). A citotoxicidade do sal de alumínio conduz à liberação de DAMPs (*Damage-associated molecular pattern molecules*) tais como o ácido úrico pela morte ou dano celular. Em altas concentrações, o ácido úrico forma cristais de urato monossódico que são fagocitados por células residentes. Adicionalmente, ou em alternativa, os adjuvantes de alumínio são diretamente fagocitados pelas células residentes. Os MSU ou sais de alumínio perturbam os lisossomos, liberando catepsina B que pode, direta

ou indiretamente induzir efluxo de K^+ que co-ativa o inflamassoma NLRP3. Um sinal desconhecido induz a produção de pró-IL-1 β , pró-IL-18 e pró-IL-33. Caspase-1, em seguida à ativação pelo inflamassoma NLRP3, cliva pró-IL-1 β , pró-IL-18 e pro-IL-33 nas suas formas ativas, promovendo assim a sua secreção (Li et al., 2007, Marrack et al., 2009).

Estudos têm aumentado o nosso conhecimento dos eventos biológicos que ocorrem após a administração de sais de alumínio (Kool et al., 2008a, Kool et al., 2008b), no entanto, os mecanismos necessários para a indução de respostas imunes adaptativas ainda são debatidos (Exley et al., 2010). Para algumas vacinas, a utilização de novos adjuvantes implicaria novos ensaios clínicos para testar a eficácia e novos efeitos secundários. Rumo a uma compreensão da ação adjuvante do alumínio, nas últimas duas décadas ou mais, o interesse em sais de alumínio reacendeu, e, desde 2007, tem havido uma onda de atividade com objetivo de compreender a ação adjuvante destes compostos. Em adição ou em contraste com o efeito de depósito, sais de alumínio insolúveis ativam células do sistema imune inato de um modo que, finalmente, resultam em uma resposta imune baseada em linfócitos T auxiliares 2 (T helper 2, Th2).

O hidróxido de alumínio forma agregados porosos que irão adsorver o antígeno em seus espaços intersticiais promovendo imunopotenciação e justificando seu efeito de depósito (Romero Mendez et al., 2007). A imunização com compostos a base de alumínio pode formar depósitos dentro dos macrófagos do tecido muscular produzindo “miofascite macrofágica” que pode estar ligada a sintomas como dor e fadiga, em associação com outras condições, incluindo as de natureza autoimune (Gherardi et al., 2001). Outros efeitos atribuídos aos sais de alumínio como adjuvantes incluem a indução de eosinófilos e a ativação do sistema complemento. Estas atividades contribuem para os efeitos qualitativos destes adjuvantes sobre o sistema imunológico, incluindo, sobretudo, a indução de anticorpos das subclasses de IgG e IgE e a indução, apesar de pequena, de resposta imune mediada por células.

2.7 Emulsões de óleo em soluções aquosas

As emulsões de óleo em água são excelentes apresentadoras de antígeno, baratas, bastante fluídas e seguras, induzem uma forte resposta imune em curto prazo e possuem uma formulação básica excelente, onde imunomoduladores lipofílicos podem ser incorporados (Cox and Coulter, 1997). A proporção da fase oleosa é bem baixa, ficando entre 15-25%. Entretanto, quando o óleo for mineral, as proporções de água e óleo devem estar em torno de 50%, pois percentuais menores do óleo provocam reações locais indesejáveis. Estas emulsões à base de óleo mineral podem ser utilizadas seguramente visando o aumento da resposta humoral contra infecções bacterianas ou vírus (Li et al., 2012). Em vacinas para pequenos animais e equinos, no entanto, não devem induzir nenhum tipo de reação no local da injeção; assim as vacinas a base de emulsões de óleo não mineral e água são as mais indicadas (Aucouturier et al., 2006).

Dois tipos diferentes de emulsões foram desenvolvidos: água-em-óleo e óleo-em-água. Ambos os tipos de emulsões induzem altas respostas por anticorpos, mas as emulsões de óleo-em-água tendem a ter melhores perfis de reatogenicidade. As emulsões óleo-em-água têm sido utilizadas com sucesso em vacinas licenciadas. Embora pareçam ser muito eficazes, o mecanismo de ação destes dois adjuvantes acima mencionados, combinados, difere. Não está claro se as citocinas secretadas são responsáveis pelo recrutamento de células apresentadoras de antígeno ou o adjuvante se promoveu englobando e apresentando o antígeno. O perfil de baixa toxicidade do adjuvante pode favorecer a última hipótese (Garcia and De Sanctis, 2013).

Ao longo das últimas décadas muitos esforços têm sido feitos para o desenvolvimento de vacinas contra o herpes genital humano e um número de vacinas candidatos atingiram os ensaios clínicos de fase avançada. Apesar de progressos significativos neste esforço, nenhuma vacina eficaz contra a infecção por herpes genital foi licenciada até o presente momento. Duas vacinas de subunidade contra o HSV-2 tiveram concluído seus estudos de fase III. A primeira vacina continha as duas principais glicoproteínas do HSV-2 do

envelope, a glicoproteína B e glicoproteína D (gB e gD), com a emulsão de adjuvante MF59 óleo-em-água. Não foi mostrada proteção contra a doença de herpes genital, apesar dos elevados títulos de anticorpo neutralizante (Corey et al., 1999). A segunda vacina continha a gD em combinação com o adjuvante AS04 (o receptor Toll-like (TLR) 4 agonista monofosforil lipídio A mais alumínio). Apesar dos resultados promissores em um ensaio de fase III com esta vacina candidata em mulheres HSV soronegativas, um ensaio clínico multicêntrico de acompanhamento não mostrou proteção significativa (Stanberry et al., 2002).

Atualmente adjuvantes aprovados em vacinas licenciadas são em grande parte restritos a promover a estimulação da resposta imunológica aos antígenos vacinais e às rotas parenterais de imunização. No entanto, é agora amplamente reconhecido que a nova geração de vacinas exigirá a inclusão de adjuvantes que também promovam a geração de uma resposta celular forte baseada em linfócitos T auxiliares 1 (T helper 1, Th1) e linfócitos T citotóxicos, o que pode contribuir significativamente para a imunidade contra as infecções por agentes patogênicos intracelulares. As estratégias de vacinação contra tais agentes infecciosos devem incluir adjuvantes que permitam a estimulação de respostas da mucosa e sistêmica, idealmente através de diferentes vias de imunização (Wizel et al., 2012).

Outro tipo de nanopartículas utilizado como adjuvante em vacinas são as nanoemulsões como sistema de liberação seletiva de antígeno (Aucouturier et al., 2001, Aguilar and Rodriguez, 2007, Shah P, 2010). Estas nanopartículas podem existir como formas de óleo-em-água ou água-em-óleo, em que o tamanho das gotículas pode variar de 50 a 600 nm. Estas emulsões podem transportar antígenos dentro de seu núcleo para uma eficiente distribuição da vacina (Shah P, 2010) ou também podem ser simplesmente misturadas com o antígeno. Uma nanoemulsão muito utilizada é o MF59, na forma de óleo-em-água composta por 5% Squaleno, 0.5% Tween 80, 0.5% Span 85 (Sigma, St. Louis, MO) que foi licenciada como um adjuvante de vacina segura e eficaz em mais de 20 países (O'Hagan, 2007, Peek et al., 2008). Ela tem sido amplamente estudada para uso em vacinas contra a gripe (De Donato et al., 1999, Nicholson et al., 2001, O'Hagan, 2007). Outra nanoemulsão é o

MontanideTM, uma grande família de óleo-em-água e emulsões água-em-óleo , incluindo o ISA 50 V , 51 , 201 , 720 e 206 (Aucouturier et al., 2001, Peek et al., 2008). O Montanide ISA 51 e 720 são utilizados em vacinas de malária (Kumar et al., 2004, Oliveira et al., 2005) e o Montanide ISA 201 e 206 em vacinas contra a febre aftosa (Dar et al., 2013).

Recentemente, a emulsão TNE (*tailorable nanosized emulsion*) foi desenvolvida utilizando um sistema de automontagem não-covalente para a entrega de um antígeno (Chuan et al., 2012, Zeng et al., 2013). Uma nanoemulsão de óleo-em-água é formada utilizando biossurfactante misturados com peptídeos e proteínas. Este trabalho demonstra uma maneira nova e simples de fazer nanoemulsões biocompatíveis usando um sistema de automontagem não-covalente por adição sequencial de reagentes de cima para baixo (Zeng et al., 2013).

2.8 Vacinas contra BoHV-5

Apesar de existirem no mercado muitas vacinas contra infecções pelo BoHV-1, até o presente existem poucas vacinas contra infecções pelo BoHV-5 (Campos et al., 2011). O nível de proteção cruzada fornecido por vacinas contra BoHV-1 parece não ser suficiente para conferir proteção clínica satisfatória para BoHV-5. Em trabalhos que analisaram a proteção conferida por uma vacina de BoHV-1 gE-, ficou demonstrado que não foi alcançada a proteção satisfatória em coelhos nem em bovinos frente ao desafio com BoHV-5 (Spilki et al., 2004, Silva et al., 2006). A imunogenicidade e a eficácia de vacinas oleosas inativadas de BoHV-1 e de BoHV-5 frente a um desafio com BoHV-5 foram analisadas e ambas as vacinas induziram uma resposta imune humoral e celular similares. Entretanto, apesar dos animais demonstrarem uma proteção parcial, um terço deles apresentou sinais clínicos de encefalite, demonstrando que a proteção conferida por tais vacinas foi insatisfatória. Estes achados ressaltam a necessidade de se continuar buscando vacinas eficazes contra infecções por BoHV-5, seja através da proteção cruzada de vacinas anti-BoHV-1, seja pelo desenvolvimento de vacinas específicas anti-BoHV-5, para

viabilizar alternativas de controle mais eficazes em áreas endêmicas (Del Medico Zajac et al., 2006).

Assim, o uso da glicoproteína D recombinante de BoHV-5 busca uma imunidade humoral capaz de diminuir uma infecção primária a partir de uma expressão quantitativa e qualitativa de anticorpos neutralizantes, impedindo o BoHV-5 de acessar os sítios de latência. Buscando um produto capaz de aumentar o tempo de proteção com o mínimo de administrações possível.

3 HIPÓTESE E OBJETIVO

3.1 Hipótese

A glicoproteína D de herpesvírus bovino tipo 5 expressa em levedura *Pichia pastoris* é capaz de induzir resposta imunológica humoral em bovinos.

3.2 Objetivo Geral

Avaliar a resposta imunológica da glicoproteína D de herpesvírus bovino tipo 5 expressa em *Pichia pastoris* em bovinos.

3.3 Objetivos Específicos

Vacinar bovinos com a rgD5, associada ou não a diferentes adjuvantes (ISA50V2 e Al (OH)₃), para avaliar sua utilização como imunobiológico contra o herpesvírus bovino tipo 5;

Avaliar a resposta imune humoral induzida com as vacinações através de ELISA indireto, isotipagem e Soroneutralização.

4 CAPÍTULO

4.1 Manuscrito

Humoral immune responses in bovines to recombinant glycoprotein D of bovine herpesvirus type 5 as vaccine antigen

Itauá Leston Araujo ^a, Luana Alves Dummer ^a, Alceu Gonçalves do Santos Junior ^a, Matheus Costa da Rosa ^a, Geferson Fischer ^b, Paulo Ricardo Centeno Rodrigues ^b, Fábio Pereira Leivas Leite* ^a

^a Laboratório de Bacteriologia, Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 96010-900, Brazil; ^b Laboratório de Virologia e Imunologia Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, 96010-900, Brazil.

* Corresponding author at: Laboratório de Bacteriologia, Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, CP 354, CEP, 96010-900, Pelotas, RS, Brazil. Phone: +55 53 32272770; fax: +55 53 3275-7350. E-mail address: fabio_leite@ufpel.edu.br (F. P. L. Leite).

Abstract

Glycoprotein D (gD) is essential for attachment and penetration of *bovine herpesvirus type 5* (BoHV-5) into susceptible cells, and is a major target of host immune systems, inducing strong humoral and cellular immune responses. The immunogenicity of recombinant BoHV-5 (rgD5) expressed in *Pichia pastoris* was evaluated in bovines. Vaccines formulated with rgD5 with/without inactivated BoHV-5, adjuvanted with Montanide ISA50V2 or Aluminum Hydroxide and administered intramuscularly. Higher titers of neutralizing antibodies were obtained in all three oil-based adjuvants formulations when compared to Hydroxide Aluminum adjuvant and commercial vaccine. The rgD5+ISA50V2 vaccine formulation stimulated humoral immune responses after two doses, and the formulation BoHV-5+rgD5+ISA50V2 stimulated the higher titers of neutralizing antibodies ($\geq 1/128$ dilution), which demonstrated significant correlations on the indirect ELISA. Together, the results suggest that the recombinant gD5 conserved neutralizing epitopes and was able to stimulate an efficient humoral immune response in bovines.

Key Words: adjuvants; *Pichia pastoris*; BoHV-5; gD; subunit vaccine

1. Introduction

Bovine encephalitis herpesvirus or bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) is a member of the order *Herpesvirales*, family *Herpesviridae*, subfamily *Alphaherpesvirinae*, genus *Varicellovirus* [1]. BoHV-5 is closely related to bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) [2]. BoHV-5 strains are classified into three subtypes based on viral DNA analysis by restriction endonuclease fingerprinting [3, 4]. Type strains for subtypes a, b and non-a-non-b (or “c”), are the Australian strain N569, the Argentinean strain A663 and Brazilian strains (ISO 97/45 and ISO 97/87), respectively [4, 5].

Outbreaks of meningoencephalitis can reach a mortality rate of 70-100% when associated with BoHV-5 [6]. The disease affects young cattle and is responsible for important economic losses in South America [7, 8]. First reported as a neuropathogenic variant of BoHV-1 [9], due to its biologic, morphologic, and antigenic properties, the BoHV-5 was recognized in 1992 as distinct virus [10]. Molecular and immunological studies based on restriction sites mapping of viral DNA and monoclonal antibody reactivity indicated that the viruses differ in their antigenic properties, despite having 85% DNA identity [11].

Although BoHV-5 and BoHV-1 are genetically and antigenically related, they differ in their neuroinvasion and neurovirulence capacities. BoHV-1 neuroinvasion usually does not go further than the first order neuron located in the trigeminal ganglion, where the latent infection is established, whereas BoHV-5 is able to infect different regions of the brain [6, 12, 13]. However, a few cases of BoHV-1 associated encephalitis have been reported [14, 15]. The

characteristic signs of BoHV-5 include depression, difficulty in water intake, bruxism, propulsion movements, blindness, seizures (often confused with other neurological diseases, such as poliomyelomalacia), and progressive worsening of the situation, reaching high mortality rates [8, 9, 16]. The neurotropism and neuroinvasiveness are important properties of this virus. The BoHV-5 infects and replicates in epithelial cells, retrogradely invades the central nervous system (CNS) of cattle, spreading and destroying neurons and other cells during acute infection or establishing latent infection [17]. The olfactory pathway is preferentially used by BoHV-5 during acute infection. Trigeminal pathway may also be used, but this seems to be more important for the establishment of latent infections [18]. Different BoHV-1 and BoHV-5 types and subtypes display extensive serological cross reactivity which can be evidenced in serum neutralization tests – SNT; such cross-reactivity precludes the use of SN to distinguish type-specific immune responses or to discriminate infections with viruses of distinct types [19].

However, the actual degree of serologic cross-reactivity between such viruses has not been evaluated in detail. Besides, SN studies were mostly carried out without taking into account the proposed bovine herpesvirus type/subtype subdivision [20]. Although previous vaccination of cattle with BoHV-1 resulted in protection against neurological disease caused by the BoHV-5, due to cross-reactivity induced by BoHV-1 neutralizing antibodies [21].

Novel subunit vaccine strategies against herpesviruses have been based on the viral major envelope glycoproteins owing to their important biological and immunological functions. Since these proteins act on the attachment and

penetration of the virus into the cell and, mediate the host immune responses to the infection [22]. Three BoHV-1 glycoproteins, the gC1, gB1 and gD1 have been tested as potential antigens individually, and although they conferred protection from disease [23]. The gD1 has been used as antigen for bovine immunization since past decades, applied in subunit or DNA vaccines strategies, being efficient in reduction of viral replication, virus shedding and clinical signs [24].

The gD1 and gD5 has 79.9% amino acid identity and the gD5 provide the ability of this virus to infect cells that are not accessible to BoHV-1, once is suggested that gD5 can attach to all four nectins (1-4) increasing its virulence [25]. The glycoproteins also differ in one N-linked glycosylation site, which is absent in the BoHV-5 [26]. Our group has previously reported its recombinant expression in *Pichia pastoris* and its antigenic characterization [27]. Thus, the aim of this study was evaluate the immune response in bovine vaccinated with the recombinant gD5 expressed in *P. pastoris*.

2. Materials and methods

2.1. Expression of recombinant glycoprotein D

The BoHV-5 glycoprotein D (gD5) was cloned into *Pichia pastoris* expression system strain KM71H Mut^S and the recombinant glycoprotein D (rgD5) was expressed as described previously [27]. Cells were then harvested and the collected supernatant concentrated with Centriprep 50YM (Millipore,

MA, USA) device at 1500 x g for 10 min at 20 °C. Recombinant gD5 was then purified by affinity chromatography using both HisTrap™ HP 1 mL columns pre-packed with pre-charged Ni Sepharose™ and the ÄKTA prime™ Automated Liquid Chromatography system (GE Healthcare, WI, USA). Purified rgD5 was assayed by Western blot and the protein concentration determined by BCA protein assay (Pierce, IL, USA) method according with the manufacture instructions.

2.2. *Cells and viruses*

Virus stock of BoHV-5 (strain Riopel – RP), supplied by the Virology and Immunology Laboratory, UFPel (Pelotas, Brazil), were propagated in MDBK cells until a 90% cytophatic effect was visible, and then stored in liquid nitrogen tank. Madin Darby bovine kidney cells (MDBK, ATCC CCL22) were grown in Eagle's Minimal Essential Medium (Life Technologies, SP, Brazil) supplemented with antibiotics (200 I.U./mL streptomycin and penicillin, 5 µg/mL enrofloxacin and 2.5 µg/mL amphotericin B) and 10% fetal bovine serum (CultiLab, SP, Brazil) at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Prior serum neutralization test, the virus stock was tittered and stored at -70 °C. For vaccine formulations, BoHV-5 with 10^{5.5}CCID₅₀/mL (cell culture infections dose 50% mL⁻¹) were inactivated [28] and identified as BoHV-5.

2.3. Vaccine preparations and inoculations

All procedures were performed in accordance with the Brazilian Committee for animal care and use (COBEA) guidelines and approved by the UFPel Ethics Committee for animal research (project number 002129). Animals were kindly provided by a producer from a local farm (before vaccination was performed neutralization of all animals confirming the negative history of outbreaks of IBR) located at the city of Capão do Leão and Pedro Osório – RS, Brazil and were not submitted to food or water restrictions. A number of 110 Female Braford calves with 12 to 36-month-old were randomly allotted into five groups of 22 animals which were vaccinated three times through the intramuscular route (i.m.) (0.80 x 25 mm needle attached to a 5 mL syringe) as follows (Table 1). First two doses (3 mL/dose) were administrated in a 26 days interval and the third after 357 days from *primo* vaccination. Blood for serum assessment was collected on days 0, 26, 33, 56, 111, 160, 186, 357 and 367, through jugular vein puncture (BD Vacutainer® Eclipse™ Needle 0.80 x 25 mm needle attached to BD Vacutainer® Blood Collection – Tubes Gel BD SST® Advance® for 8.5 mL). During the experiment serologically unvaccinated animals for the purpose of the antibodies generated were the result only of immunizations were followed.

Table 1. Vaccines formulations

BoHV-5* + ISA50V2 [†] 50% v/v
BoHV-5** + 100µg rgD5 + ISA50V2 [†] 50% v/v
100µg rgD5 + ISA50V2 50% v/v diluted in PBS 1 x (pH 7.4)
100µg rgD5 + Al (OH) ₃ [‡] diluted in PBS 1 x (pH 7.4)
Commercial Vaccine [©]
*=BoHV-5 inactivated 10 ⁸ CCID ₅₀ /dose; [†] =Seppic Adjuvants, France; **=BoHV-5 inactivated 10 ^{6.7} CCID ₅₀ /dose; [‡] =13µg.mL ⁻¹ de Al (OH) ₃ ; [©] =BoHV-1 and BoHV-5 and Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV-1 and BVDV-2) + mineral oil)

2.4. Total IgG kinetics against rgD5

In this study, an in-house indirect ELISA analyses were performed with individual animal serum from each collection. Sera were assayed for rgD5 specific total IgG. Ninety-six-well microtiter plates were coated overnight at 4 °C either with 50 ng de rgD5 per well and 2 mL de BoHV-1 or BoHV-5 with a titer of 10^{5.5} CCID₅₀/mL was diluted in 8mL of carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6). Plates were then washed 3 x with PBS-T (Phosphate Buffered Saline with Tween[®] 20), blocked for 1 h at 37 °C with PBS-T plus 0.5% skim powered milk and 0.3% casein. The plates were washed 3 x and incubated 1 h at 37 °C with serum samples serially diluted with PBS-T, beginning at 1:10 (day 0) or 1:100 (days 26 and 33), and continuing in a 2-fold dilutions. After three washes, HRP-conjugated goat anti-bovine IgG whole molecule antibodies (Sigma-Aldrich, SP, Brazil) diluted 1:10.000 were added, followed by incubation at 37 °C for 1.5 h and five washes. Reaction were visualized with o-Phenylenediamine dyhydrochloride (OPD) (Sigma-Aldrich, SP, Brazil), stopped with 2 NH₂SO₄, and analyzed at O.D 492 nm using ELISA TP-Reader plate spectrophotometer (Thermo Plate, SP, Brazil). Results were expressed as the reciprocal of the

highest dilution resulting in a reading of three standard deviations above the value of the negative control serum.

2.5. *IgG – isotyping against rgD5*

The IgG1 and IgG2 isotype levels were evaluated by in-house indirect ELISA using pooled sera from sample collections at days 26 and 33 post primo vaccination. Briefly, the plates were coated as described above with 50 ng de rgD5 per well. Results were expressed as the reciprocal of the highest dilution resulting in a reading of three standard deviations above the value of the negative control serum. To assay the IgG isotype, serum was diluted 1:5.000 and ELISA was performed according with the instructions for isotyping from Abcam for IgG1 and IgG2 detection.

2.6. *Serum Neutralization Test (SNT)*

Serum neutralization test was used to assess the neutralizing antibodies against BoHV-5 [28] at day 33, seven days after second inoculation. Briefly, each serum was serially diluted (2-fold) in 96 well microtiter plate (TPP, Switzerland) in quadruplicate, beginning at 1:2 until 1:256 in MEM (no FBS). BoHV-5 virus suspension containing 100 CCID₅₀% was added following incubation for 1 h at 37 °C in a 5% CO₂ environment. Approximately 3x10⁴ MDBK cells were then added per well and the microplates were incubated until 100 CCID₅₀% was observed in the control cells. The absence of cytopathic effect (CPE) was indication of serum neutralization, while its presence resulted

from absence of neutralizing antibodies. Antibodies titers were calculated by the Behrens & Kärber method [29] and expressed as the reciprocal of the highest dilution.

2.7. *Dynamics of serum IgG antibodies against rgD5, BoHV-1 and BoHV-5*

In this study, an in-house indirect ELISA analyses were performed with individual animal serum from each collection. Sera were assayed for rgD5 specific total IgG. Briefly, the plates were coated as described above. Results of collections 0, 26, 33, 56, 111, 160, 186, 357 and 367 were performed individually and expressed as the mean absorbance obtained from each sample in triplicate at a dilution of 1:400 of the primary serum.

2.8. *Statistical analysis*

Statistical analyzes were performed using GraphPad prism 5.03 software (GraphPad Software, CA, USA). Analysis of differences in Indirect ELISA and in the serum neutralization tests between treatment groups was performed by one-way and two-way ANOVA and Bonferroni post-hoc tests were used to compare data between all groups. To assess the degree of correlation as the results between SNT and ELISA for linear regression was performed using all sera concerning the collection of day 33. A value of $p < 0.05$ denotes statistical significance.

3. Results

3.1. Total IgG kinetics against rgD5

Total IgG anti-rgD from animals vaccinated with BoHV-5+ISA50V2 or rgD5+ISA50V2 showed high levels of antibodies 33 days after second administration which was only overcome by the combination of the two antigens (rgD5+BoHV-5+ISA50V2). The vaccine formulation rgD5+Al(OH)₃ and the commercial vaccine did not increase the antibody levels, which was similar to the levels observed before the *primo* vaccination, at day 0 (Fig. 1).

3.2. IgG – isotyping against rgD5

The IgG isotype kinetics of IgG1 and IgG2 anti-rgD5 were observed at day 33. Vaccines BoHV-5+ISA50V2; BoHV-5+rgD5+ISA50V2 and rgD5+ISA50V2 increased the levels of IgG1 and IgG2 (Fig. 2 A and 2 B). However, the BoHV-5+ISA50V2 formulation showed low levels of IgG2 (Fig. 2 A and 2 B). The vaccine formulation rgD5+Al(OH)₃ and the commercial vaccine increased the IgG1 levels (Fig. 2 A) while the IgG2 levels did not change (Fig. 2 B).

3.3. Serum Neutralization Test (SNT)

Animals vaccinated with BoHV-5+ISA50V2; BoHV-5+rgD5+ISA50V2 and rgD5+ISA50V2 stimulated higher levels of neutralizing antibodies, while the rgD5+Al(OH)₃ formulation and the commercial vaccine stimulated lower levels

of neutralizing antibodies, as observed in Figure 3. The correlation between the neutralization antibodies and the results of isotype IgG2 with anti-rgD5 in the linear regression was $r^2 = 0.9031$ corresponding a significant correlation between tests. While the linear regression correlation with isotype IgG2 anti-BoHV-5 was $r^2 = 0.5383$ corresponding a low correlation between booths tests.

3.4. *Dynamics of serum IgG antibodies against rgD5, BoHV-1 and BoHV-5*

Groups vaccinated with BoHV-5+ISA50V2 and BoHV-5+rgD5+ISA50V2 showed an increase in the IgG levels against all tested antigens after the first dose. The levels of IgG observed remained stable during the one-year follow-up of the animals. Eight days after the third dose at day 357 demonstrate an increase in the antibody levels than those observed after the first boost (Fig. 4 A, B and C). The rgD5+ISA50V2 and rgD5+Al(OH)₃ vaccines demonstrated similar immune response when the level of IgG anti-rgD5 were studied (Fig. 4 A and B). Only the vaccine formulated with ISA50V2 adjuvant maintained the high levels of IgG (Fig. 4 C). When the whole viruses were used as ELISA antigen (Fig. 4A and 4B), the O.D. readings were low during the whole experiment, even after the boosts. The commercial vaccine display low O.D. readings to all antigens used in the ELISA (Fig. 4 A, 4 B and 4 C), with exception, observed after the third vaccination at day 357 (Fig. 4 C).

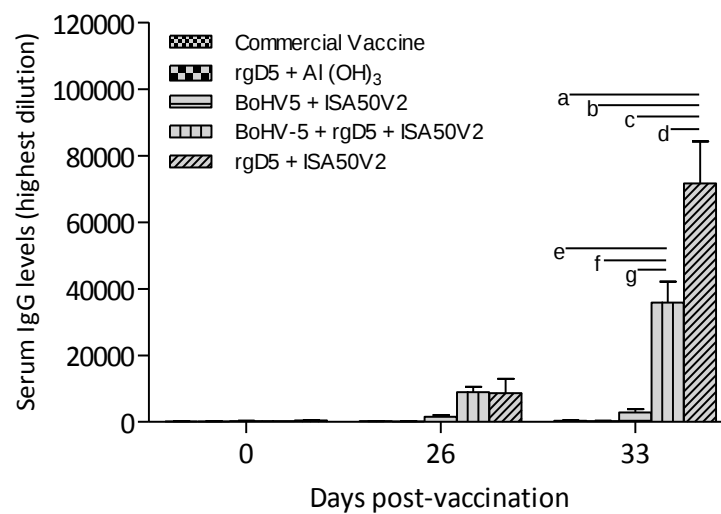


Figure 1. Dynamic of Total serum IgG levels of bovine vaccinated at days 0 and 26. The data represents the mean $\pm$ S.E.M expressed as serum dilution in Indirect ELISA of sera collected at days 0, 26 and 33, as the reciprocal of the highest dilution whereas the absorbance at 492 nm was higher than the reading of three standard deviations above the value of the negative control serum. The a, b, c, d, e, f and g represents the value de $p < 0.001$ in the test two-way anova, corresponding respectively, vaccine rgD5+ISA50V2 is different the vaccines commercial **(a)**; rgD5+Al(OH)₃ **(b)**; BoHV-5+ISA50V2 **(c)**; BoHV-5+rgD5+ISA50V2 **(d)**. The vaccine BoHV-5+rgD5+ISA50V2 is different the vaccines commercial **(e)**; rgD5+Al(OH)₃ **(f)**; BoHV-5+ISA50V2 **(g)**.

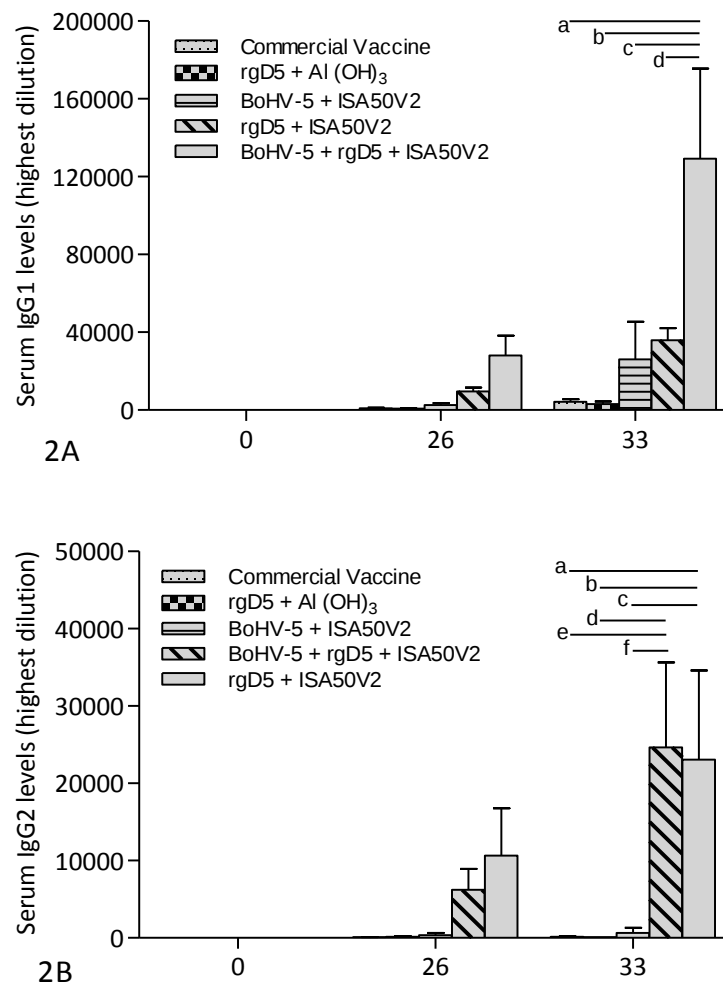


Figure 2. Immunoglobulin isotype profiles of animals vaccinated twice at days 0 and 26 (i.m.). Samples were collected at days 26 and 33. The data represents the mean $\pm$ S.E.M. **A-** IgG1 isotype response: The a, b, c and d represents the value de $p < 0.001$ in the test two-way anova, corresponding respectively, vaccine BoHV-5+rgD5+ISA50V2 is different the vaccines commercial **(a)**; rgD5+Al(OH)₃ **(b)**; BoHV-5+ISA50V2 **(c)**; rgD5+ISA50V2 **(d)**. **B-** IgG2 isotype response: The a ($p < 0,001$); b, c and d ($p < 0.01$); e and f ($p < 0.05$) represents in the test two-way anova, corresponding respectively, vaccine rgD5+ISA50V2 is different the vaccines commercial **(a)**; rgD5+Al(OH)₃ **(b)**; BoHV-5+ISA50V2 **(c)**. The vaccine BoHV-5+rgD5+ISA50V2 is different the vaccines commercial **(d)**; rgD5+Al(OH)₃ **(e)**; BoHV-5+ISA50V2 **(f)**.

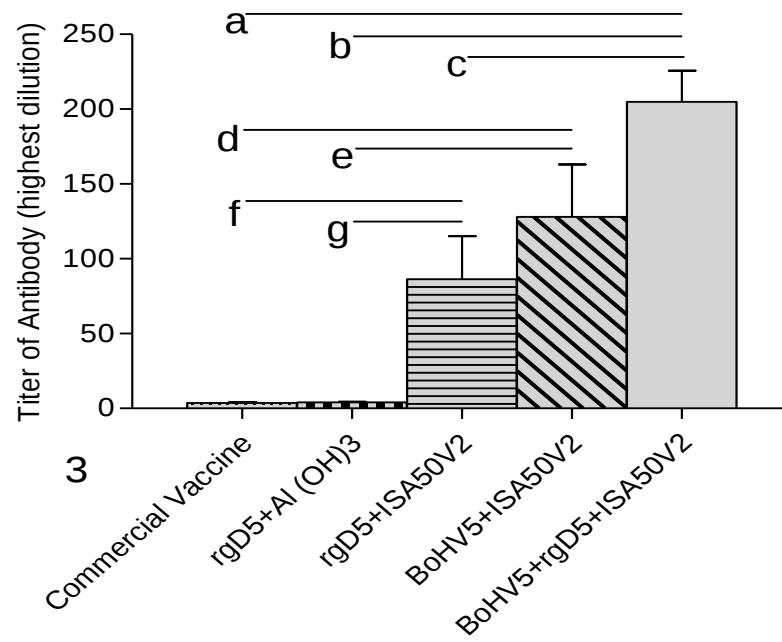


Figure 3. Neutralizing antibody titer of bovine. The titer was determined by serum neutralization test at day 33, from the third collection. The data represents the mean $\pm$ S.E.M. The a and b ($p < 0.001$); c, d and e ($p < 0.01$); f and g ($p < 0.05$) represents in the test one-way anova, corresponding respectively, vaccine BoHV-5+rgD5+ISA50V2 is different the commercial vaccine **(a)**; rgD5+Al(OH)₃ **(b)**; rgD5+ISA50V2 **(c)**. The vaccine BoHV-5+ISA50V2 is different the commercial vaccine **(d)**; rgD5+Al(OH)₃ **(e)**; and the vaccine rgD5+ISA50V2 is different the commercial vaccine **(f)**; rgD5+Al(OH)₃ **(g)**.

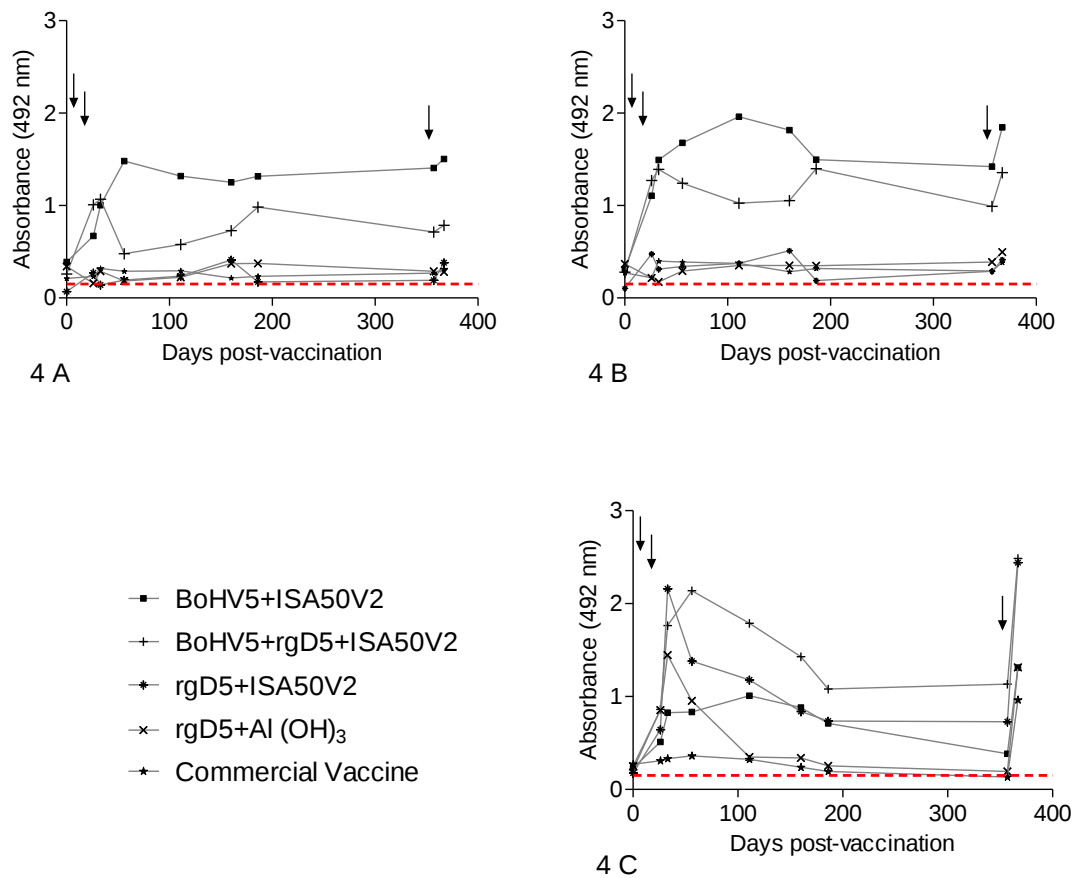


Figure 4. Total serum IgG levels of bovines vaccinated thrice at days 0, 26 and 357 (arrows) with 100 µg rgD5 associated or not with BoHV-5. Indirect ELISA of sera collected during 367 days of experiment. **(4 A)** BoHV-1, **(4 B)** BoHV-5 or **(4 C)** rgD5 used as ELISA antigen. The red dashed line indicates the absorbance of the control group. The data represent the mean $\pm$ S.E.M. of the absorbance readings at 492 nm to three antigens.

4. Discussion

The present study reports the humoral immune response of bovines vaccinated with the recombinant glycoprotein D from bovine herpesvirus type 5 (rgD5), expressed in the *Pichia pastoris* yeast. To our knowledge, the rgD5 was never tested in bovines before, despite of its important role in cell attachment and viral penetration. We observed that the rgD elicit humoral immune responses, suggesting that the heterologous expression system *Pichia pastoris* were able to produce a recombinant protein with antigenicity and immunogenicity, with similar structure of the native glycoprotein D [27, 30].

The indirect ELISA performed during the experiment showed that both BoHV-1 and BoHV-5 recognize IgG antibodies developed in the animals vaccinated against rgD5 (Fig. 4). The similarity of approximately 85% between BHV-1 and BHV-5 genomes and some similar biological properties might explain these results [11, 31]. Still, ~80 % identity between amino acids [25] among the gD1 and gD5 ratify the results. The rgD5 as antigen in the ELISA was recognized by anti-rgD5 IgG antibodies and those antibodies generated against native gD5 as well gD1. The increase in the antibody levels when animals were vaccinated with rgD5 associated with inactivated virus and adjuvanted ISA50V2 resulted in a significant increase in the levels of IgG anti-rgD5 (Fig.1 and Fig. 4 A, B and C) during experiment follow-up. However, the antibody levels, when BoHV-1 or BoHV-5 were used as ELISA antigen for the same vaccine (Fig.4 A and B) were significantly lower. A possible explanation for this observation is the difference in the amount of antigen in the vaccine formulation. The vaccine formulated with rgD5 complemented with inactivated

BoHV-5 had a viral concentration of $10^{6.7}$ CCID₅₀/dose, whereas the vaccine formulated with the inactivated virus alone had an antigenic load of 10^8 CCID₅₀/dose of virus. Also the ELISA antigen virus strain used, serum dilution, incubation time, might play a role in the results, however we did not explore any of this possible factor in this study. The presence of gD5 and addition of rgD5 might be a factor that benefited the predominant expression of anti-gD5 antibodies that resulted in high titers of neutralizing antibodies, explained by the characteristic of immunodominant antigen.

Only the use of rgD5 associated in adjuvant ISA50V2 shown to be capable of generating more levels of IgG2 antibodies than the others formulations (Fig.2B). These results, when compared with titers of neutralizing antibodies (Fig. 3), showed the same dynamics of antibodies production, suggesting that rgD5 is able to generate an efficient response, even higher than the inactivated whole virus, BoHV-5+ISA50V2, and the addition of rgD5 may represent a more effective response against BoHV-5 and BoHV-1. This might be happening by the fact that, once it is a conserved protein between subfamily Alphaherpesvirinae [25].

Previous studies with gD1 expressed in *Pichia pastoris* showed their recognition by mAbs important in neutralizing epitopes that were capable of generating neutralizing activity [32], but there are no studies showing efficient neutralizing activity against BoHV-5. The gD5, *in vivo*, is able to bind to four nectins (Nectin 1-4), while the gD1 only binds to nectins 1 and 2, which may be explained by the reduced glycosylation in the gD5, increasing its tridimensional structure flexibility, allowing its binding to a wider range of cellular receptors

[25]. This characteristic and the response IgG2 (Fig. 2 B) and SNT (Fig. 3) suggest that increased stimulation of antibodies anti-rgD5 by the recombinant protein promoted a more efficient neutralization. Thus, reducing the ability of the virus to penetrate into susceptible cells and cause infection.

The rgD1, expressed in the vector MVA system (Modified Vaccinia Virus Ankara) demonstrated that the recombinant protein was able to promote an efficient humoral immune response against the BoHV-1. The antibodies dynamics against the rgD1 in the ELISA showed correlation with the neutralizing antibodies and it was able to reduce the BoHV-1 replication in challenged mice [33]. The chimera composed by the truncated form of gD1 and the interleukin 6 (IL-6) expressed in *Pichia pastoris* was tested in mice shown that the antigenic and immunogenic characteristics of the recombinant gD1 was not affected by its expression in the heterologous system, which also maintained the biological activity of the IL-6. This study also indicated the possibility to increase the mucosal immunity when administrating the chimeric protein directly at the mucosal site in bovines [34]. Another study has addressed the mucosal immunity in the respiratory tract directed against BoHV-1 approaching the efficiency of the immune response generated against gD1 replication of BoHV-1 and against the establishment of latency in cattle, which although effective response generated showed short duration (6 weeks) multiple immunizations are required and that a more effective adjuvants required [35]. Also, it was shown that a subunit vaccine formulated with the truncated form of the gD1 was as efficient as the native gD for protection against clinical effects of BoHV-1 [24, 36]. Our research group has already

demonstrated that the rgD5, used as a vaccine in mice, generated similar results [37].

The vaccines rgD5+ISA50V2 e rgD5+Al(OH)₃ differ in its adjuvancity effect. The administration of oil-in-water emulsions as a particle immunestimulant has been showing results toward recruitment and interaction with antigen-presenting cells at the local of injection. During the draining movement around the lymphatic ganglia, which increase the efficiency of antigen presentation to T-cells [38]. The aluminum hydroxide, in the other hand, is an adjuvant that may be directly phagocytized by the phagocytic cells and also its cytotoxicity is responsible to the cellular recruitment, which potentiating the immune response, increasing the release of patterns associated molecules to phagocytic cells, such as uric acid, which activate the inflammassome NLRP3 [39]. These characteristics stimulate the antibody production to both adjuvants to develop a balance Th1/Th2 response.

We did not observed an increase in the antibody levels to none of the tested antigens (Fig. 4 A, 4 B and 4 C) or a different patterns in the IgG2 levels before or after the vaccination with a commercial vaccine (Fig. 2 B), also low levels of neutralizing antibodies (Fig. 3). One might suggest that insufficient amount of specific antigens, dosage and differences to the strains used in the vaccine, or those used at ELISA and serum neutralization test may explain the low efficiency of this vaccine observed in this study [40]. Also, the efficiency of the serum neutralization test may have an intrinsic correlation factor between the vaccine strain and the diagnosis strain used in the test.

Together, our results, combined to our previous findings, suggests that the rgD5 can be applied in the development of vaccines against the BoHV-5, due to its immunogenicity and its capability to stimulate neutralizing antibodies in the target species, when associated or not with the whole inactivated virus. Despite showing an increase in neutralizing antibody titers

Even so, the study revealed that only rgD5 as vaccine antigen against BoHV-5 generated neutralizing antibody titers considered protective. Thus, rgD5 is an alternative to improve existing vaccines against BoHV-5. Confirming the use of recombinant technology for production of vaccine antigens using deemed production tools faster and cheaper.

References

- [1] Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, et al. The order Herpesvirales. *Archives of virology*. 2009;154:171-7.
- [2] Del Medico Zajac MP, Ladelfa MF, Kotsias F, Muylkens B, Thiry J, Thiry E, et al. Biology of bovine herpesvirus 5. *Veterinary journal*. 2010;184:138-45.
- [3] Metzler AE, Schudel AA, Engels M. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. *Archives of virology*. 1986;87:205-17.
- [4] D'Arce RC, Almeida RS, Silva TC, Franco AC, Spilki F, Roehe PM, et al. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. *Veterinary microbiology*. 2002;88:315-24.

- [5] Pidone CL, Galosi CM, Echeverria MG, Nosetto EO, Etcheverrigaray ME. Restriction endonuclease analysis of BHV-1 and BHV-5 strains isolated in Argentina. Zentralblatt fur Veterinarmedizin Reihe B Journal of veterinary medicine Series B. 1999;46:453-6.
- [6] Vogel FS, Caron L, Flores EF, Weiblen R, Winkelmann ER, Mayer SV, et al. Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. Journal of clinical microbiology. 2003;41:4512-20.
- [7] Weiblen R, de Barros CS, Canabarro TF, Flores IE. Bovine meningoencephalitis from IBR virus. The Veterinary record. 1989;124:666-7.
- [8] Riet-Correa F VT, Schild AL & Méndez MC. . Meningoencephalitis and necrosis of the cerebral cortex in cattle caused by Herpes vírus bovine-1 Pesquisa Veterinária Brasileira. 1989;9:13-6.
- [9] French EL. A SPECIFIC VIRUS ENCEPHALITIS IN CALVES: ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE CAUSAL AGENT. Australian Veterinary Journal. 1962;38:216-21.
- [10] Roizmann B, Desrosiers RC, Fleckenstein B, Lopez C, Minson AC, Studdert MJ. The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Archives of virology. 1992;123:425-49.
- [11] Delhon G, Moraes MP, Lu Z, Afonso CL, Flores EF, Weiblen R, et al. Genome of bovine herpesvirus 5. Journal of virology. 2003;77:10339-47.
- [12] Carrillo BJ, Pospischil A, Dahme E. Pathology of a bovine viral necrotizing encephalitis in Argentina. Zentralblatt fur Veterinarmedizin Reihe B Journal of veterinary medicine Series B. 1983;30:161-8.

- [13] Perez SE, Bretschneider G, Leunda MR, Osorio EA, Flores EF, Odeon AC. Primary infection, latency, and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. *Veterinary pathology*. 2002;39:437-44.
- [14] Roels S, Charlier G, Letellier C, Meyer G, Schynts F, Kerkhofs P, et al. Natural case of bovine herpesvirus 1 meningoencephalitis in an adult cow. *The Veterinary record*. 2000;146:586-8.
- [15] Silva MS, Brum MC, Loreto EL, Weiblen R, Flores EF. Molecular and antigenic characterization of Brazilian bovine herpesvirus type 1 isolates recovered from the brain of cattle with neurological disease. *Virus research*. 2007;129:191-9.
- [16] Franco A, Rijsewijk, F, Flores, EF, Weiblein, R, Roehe, PM. Construction and characterization of a glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus type 1.2 strain isolated in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2002;33:274-8.
- [17] Chowdhury SI, Lee BJ, Mosier D, Sur JH, Osorio FA, Kennedy G, et al. Neuropathology of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) meningo-encephalitis in a rabbit seizure model. *Journal of comparative pathology*. 1997;117:295-310.
- [18] Lee BJ, Weiss ML, Mosier D, Chowdhury SI. Spread of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in the rabbit brain after intranasal inoculation. *Journal of neurovirology*. 1999;5:474-84.
- [19] Campos FS, Franco AC, Hubner SO, Oliveira MT, Silva AD, Esteves PA, et al. High prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. *Veterinary microbiology*. 2009;139:67-73.

- [20] Kramps JA, Perrin B, Edwards S, van Oirschot JT. A European inter-laboratory trial to evaluate the reliability of serological diagnosis of bovine herpesvirus 1 infections. *Veterinary microbiology*. 1996;53:153-61.
- [21] Vogel FSF FE, Weiblen R, Kunrath CF. . Neutralizing activity to bovine herpesvirus types 1 (BHV-1) and 5 (BHV-5) in sera of cattle immunized with vaccines against BHV-1. *Ciência Rural*. 2002;32:881-3.
- [22] Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S, Tikoo SK. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Veterinary microbiology*. 1996;53:31-42.
- [23] Babiuk LA, L'Italien J, van Drunen Littel-van den Hurk S, Zamb T, Lawman JP, Hughes G, et al. Protection of cattle from bovine herpesvirus type I (BHV-1) infection by immunization with individual viral glycoproteins. *Virology*. 1987;159:57-66.
- [24] Ioannou XP, Griebel P, Hecker R, Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S. The immunogenicity and protective efficacy of bovine herpesvirus 1 glycoprotein D plus Emulsigen are increased by formulation with CpG oligodeoxynucleotides. *Journal of virology*. 2002;76:9002-10.
- [25] Gabev E, Tobler K, Abril C, Hilbe M, Senn C, Franchini M, et al. Glycoprotein D of bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) confers an extended host range to BoHV-1 but does not contribute to invasion of the brain. *Journal of virology*. 2010;84:5583-93.
- [26] Abdelmagid OY, Minocha HC, Collins JK, Chowdhury SI. Fine mapping of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) glycoprotein D (gD) neutralizing epitopes by type-specific monoclonal antibodies and sequence comparison with BHV-5 gD. *Virology*. 1995;206:242-53.

- [27] Dummer LA, Conceicao FR, Nizoli LQ, de Moraes CM, Rocha AR, de Souza LL, et al. Cloning and expression of a truncated form of envelope glycoprotein D of Bovine herpesvirus type 5 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Journal of virological methods*. 2009;161:84-90.
- [28] Fischer G, Conceicao FR, Leite FP, Dummer LA, Vargas GD, Hubner Sde O, et al. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. *Vaccine*. 2007;25:1250-6.
- [29] Mayr A BP, Bibrack BM, Withmann G. *Virologische Arbeitsmethoden - Band IV - Sicherheit bei virologischen arbeiten*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. 1982;666.
- [30] Daly R, Hearn MT. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of molecular recognition : JMR*. 2005;18:119-38.
- [31] Del Medico Zajac MP, Puntel M, Zamorano PI, Sadir AM, Romera SA. BHV-1 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle. *Research in veterinary science*. 2006;81:327-34.
- [32] Zhu X, Wu S, Letchworth GJ, 3rd. Yeast-secreted bovine herpesvirus type 1 glycoprotein D has authentic conformational structure and immunogenicity. *Vaccine*. 1997;15:679-88.
- [33] Ferrer MF, Del Medico Zajac MP, Zanetti FA, Valera AR, Zabal O, Calamante G. Recombinant MVA expressing secreted glycoprotein D of BoHV-1 induces systemic and mucosal immunity in animal models. *Viral immunology*. 2011;24:331-9.

- [34] Zhu X, Wu S, Letchworth GJ. A chimeric protein comprised of bovine herpesvirus type 1 glycoprotein D and bovine interleukin-6 is secreted by yeast and possesses biological activities of both molecules. *Vaccine*. 1999;17:269-82.
- [35] Zhu X, Letchworth GJ, 3rd. Mucosal and systemic immunity to bovine herpesvirus-1 glycoprotein D confer resistance to viral replication and latency in cattle. *Vaccine*. 1996;14:61-9.
- [36] van Drunen Littel-van den Hurk S, Van Donkersgoed J, Kowalski J, van den Hurk JV, Harland R, Babiuk LA, et al. A subunit gIV vaccine, produced by transfected mammalian cells in culture, induces mucosal immunity against bovine herpesvirus-1 in cattle. *Vaccine*. 1994;12:1295-302.
- [37] LA D. Application of recombinant glycoprotein D of bovine herpesvirus 5 as antigen in immunodiagnostic testing and subunit vaccine. [Thesis]: Federal University of Pelotas - RS - Brazil.; 2013.
- [38] Dupuis M, Murphy TJ, Higgins D, Ugozzoli M, van Nest G, Ott G, et al. Dendritic cells internalize vaccine adjuvant after intramuscular injection. *Cellular immunology*. 1998;186:18-27.
- [39] Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nature immunology*. 2008;9:847-56.
- [40] Varela AP, Holz CL, Cibulski SP, Teixeira TF, Antunes DA, Franco AC, et al. Neutralizing antibodies to bovine herpesvirus types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) and its subtypes. *Veterinary microbiology*. 2010;142:254-60.

5 CONCLUSÃO GERAL

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

A gD nativa do BoHV-1 e BoHV-5 é reconhecida pelos anticorpos anti-rgD5;

As vacinas de subunidade utilizando a rgD5 induziram a produção de anticorpos neutralizantes em bovinos;

A vacinação com rgD5 e adjuvante ISA50V2 estimulou uma resposta celular Th1/Th2 balanceada.

6 REFERÊNCIAS

- ABDELMAGID, O. Y., MINOCHA, H. C., COLLINS, J. K. & CHOWDHURY, S. I. 1995. Fine mapping of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) glycoprotein D (gD) neutralizing epitopes by type-specific monoclonal antibodies and sequence comparison with BHV-5 gD. *Virology*, 206, 242-53.
- AGUILAR, J. C. & RODRIGUEZ, E. G. 2007. Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine*, 25, 3752-62.
- AUCOUTURIER, J., ASCARATEIL, S. & DUPUIS, L. 2006. The use of oil adjuvants in therapeutic vaccines. *Vaccine*, 24 Suppl 2, S2-44-5.
- AUCOUTURIER, J., DUPUIS, L. & GANNE, V. 2001. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine*, 19, 2666-72.
- BABIUK, L. A., L'ITALIEN, J., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., ZAMB, T., LAWMAN, J. P., HUGHES, G. & GIFFORD, G. A. 1987. Protection of cattle from bovine herpesvirus type I (BHV-1) infection by immunization with individual viral glycoproteins. *Virology*, 159, 57-66.
- BABIUK, L. A., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. & TIKOO, S. K. 1996. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Vet Microbiol*, 53, 31-42.
- BABIUK, S. 2003. Delivery of polynucleotides and oligonucleotides for improving immune responses to vaccines.
- BERGSBAKEN, T., FINK, S. L. & COOKSON, B. T. 2009. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol*, 7, 99-109.
- CAMPADELLI-FIUME, G. 2007. The egress of alphaherpesviruses from the cell. In: ARVIN, A., CAMPADELLI-FIUME, G., MOCARSKI, E., MOORE, P. S., ROIZMAN, B., WHITLEY, R. & YAMANISHI, K. (eds.) *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge.
- CAMPOS, F. S., DEZEN, D., ANTUNES, D. A., SANTOS, H. F., ARANTES, T. S., CENCI, A., GOMES, F., LIMA, F. E., BRITO, W. M., FILHO, H. C., BATISTA, H. B., SPILKI, F. R., FRANCO, A. C., RIJSEWIJK, F. A. & ROEHE, P. M. 2011. Efficacy of an inactivated, recombinant bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) vaccine. *Vet Microbiol*, 148, 18-26.
- CAMPOS, F. S., FRANCO, A. C., HUBNER, S. O., OLIVEIRA, M. T., SILVA, A. D., ESTEVES, P. A., ROEHE, P. M. & RIJSEWIJK, F. A. 2009. High prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. *Vet Microbiol*, 139, 67-73.
- CARRILLO, B. J., POSPISCHIL, A. & DAHME, E. 1983. Pathology of a bovine viral necrotizing encephalitis in Argentina. *Zentralbl Veterinarmed B*, 30, 161-8.
- CASCIO, K. E., BELKNAP, E. B., SCHULTHEISS, P. C., AMES, A. D. & COLLINS, J. K. 1999. Encephalitis induced by bovine herpesvirus 5 and protection by prior vaccination or infection with bovine herpesvirus 1. *J Vet Diagn Invest*, 11, 134-9.
- CASSEL, S. L., EISENBARTH, S. C., IYER, S. S., SADLER, J. J., COLEGIO, O. R., TEPHLY, L. A., CARTER, A. B., ROTHMAN, P. B., FLAVELL, R. A. & SUTTERWALA, F. S. 2008. The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 9035-40.
- CHOWDHURY, S. I. 1995. Molecular basis of antigenic variation between the glycoproteins C of respiratory bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurovirulent BHV-5. *Virology*, 213, 558-68.
- CHOWDHURY, S. I., LEE, B. J., MOSIER, D., SUR, J. H., OSORIO, F. A., KENNEDY, G. & WEISS, M. L. 1997. Neuropathology of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) meningo-encephalitis in a rabbit seizure model. *J Comp Pathol*, 117, 295-310.

- CHUAN, Y. P., ZENG, B. Y., O'SULLIVAN, B., THOMAS, R. & MIDDELBERG, A. P. 2012. Co-delivery of antigen and a lipophilic anti-inflammatory drug to cells via a tailorable nanocarrier emulsion. *J Colloid Interface Sci*, 368, 616-24.
- COLLINS, J. K., BUTCHER, A. C., RIEGEL, C. A., MCGRANE, V., BLAIR, C. D., TERAMOTO, Y. A. & WINSTON, S. 1984. Neutralizing determinants defined by monoclonal antibodies on polypeptides specified by bovine herpesvirus 1. *J Virol*, 52, 403-9.
- COREY, L., LANGENBERG, A. G., ASHLEY, R., SEKULOVICH, R. E., IZU, A. E., DOUGLAS, J. M., JR., HANDSFIELD, H. H., WARREN, T., MARR, L., TYRING, S., DICARLO, R., ADIMORA, A. A., LEONE, P., DEKKER, C. L., BURKE, R. L., LEONG, W. P. & STRAUS, S. E. 1999. Recombinant glycoprotein vaccine for the prevention of genital HSV-2 infection: two randomized controlled trials. Chiron HSV Vaccine Study Group. *JAMA*, 282, 331-40.
- COX, J. C. & COULTER, A. R. 1997. Adjuvants--a classification and review of their modes of action. *Vaccine*, 15, 248-56.
- CSELLNER, H., WALKER, C., WELLINGTON, J. E., MCLURE, L. E., LOVE, D. N. & WHALLEY, J. M. 2000. EHV-1 glycoprotein D (EHV-1 gD) is required for virus entry and cell-cell fusion, and an EHV-1 gD deletion mutant induces a protective immune response in mice. *Arch Virol*, 145, 2371-85.
- D'ARCE, R. C., ALMEIDA, R. S., SILVA, T. C., FRANCO, A. C., SPILKI, F., ROEHE, P. M. & ARNS, C. W. 2002. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. *Vet Microbiol*, 88, 315-24.
- DAR, P., KALAIVANAN, R., SIED, N., MAMO, B., KISHORE, S., SURYANARAYANA, V. V. & KONDABATTULA, G. 2013. Montanide ISA 201 adjuvanted FMD vaccine induces improved immune responses and protection in cattle. *Vaccine*, 31, 3327-32.
- DE DONATO, S., GRANOFF, D., MINUTELLO, M., LECCHI, G., FACCINI, M., AGNELLO, M., SENATORE, F., VERWEIJ, P., FRITZELL, B. & PODDA, A. 1999. Safety and immunogenicity of MF59-adjuvanted influenza vaccine in the elderly. *Vaccine*, 17, 3094-101.
- DEL GIUDICE, G., PODDA, A. & RAPPUOLI, R. 2001. What are the limits of adjuvanticity? *Vaccine*, 20 Suppl 1, S38-41.
- DEL MEDICO ZAJAC, M. P., LADELFA, M. F., KOTSIAS, F., MUYLKENS, B., THIRY, J., THIRY, E. & ROMERA, S. A. 2010. Biology of bovine herpesvirus 5. *Vet J*, 184, 138-45.
- DEL MEDICO ZAJAC, M. P., PUNTEL, M., ZAMORANO, P. I., SADIR, A. M. & ROMERA, S. A. 2006. BHV-1 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle. *Res Vet Sci*, 81, 327-34.
- DELHON, G., MORAES, M. P., LU, Z., AFONSO, C. L., FLORES, E. F., WEIBLEN, R., KUTISH, G. F. & ROCK, D. L. 2003. Genome of bovine herpesvirus 5. *J Virol*, 77, 10339-47.
- DOUCE, G., TURCOTTE, C., CROPLEY, I., ROBERTS, M., PIZZA, M., DOMENGHINI, M., RAPPUOLI, R. & DOUGAN, G. 1995. Mutants of *Escherichia coli* heat-labile toxin lacking ADP-ribosyltransferase activity act as nontoxic, mucosal adjuvants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 1644-8.
- DUBUISSON, J., ISRAEL, B. A. & LETCHWORTH, G. J., 3RD 1992. Mechanisms of bovine herpesvirus type 1 neutralization by monoclonal antibodies to glycoproteins gI, gIII and gIV. *J Gen Virol*, 73 (Pt 8), 2031-9.
- DUMMER, L. A., CONCEICAO, F. R., NIZOLI, L. Q., DE MORAES, C. M., ROCHA, A. R., DE SOUZA, L. L., ROOS, T., VIDOR, T. & LEITE, F. P. 2009. Cloning and expression of a truncated form of envelope glycoprotein D of Bovine herpesvirus type 5 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J Virol Methods*, 161, 84-90.
- EISENBARTH, S. C., COLEGIO, O. R., O'CONNOR, W., SUTTERWALA, F. S. & FLAVELL, R. A. 2008. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature*, 453, 1122-6.

- EXLEY, C., SIESJO, P. & ERIKSSON, H. 2010. The immunobiology of aluminium adjuvants: how do they really work? *Trends Immunol*, 31, 103-9.
- FINK, S. L. & COOKSON, B. T. 2005. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun*, 73, 1907-16.
- FRENCH, E. L. 1962. A SPECIFIC VIRUS ENCEPHALITIS IN CALVES: ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE CAUSAL AGENT. *Australian Veterinary Journal*, 38, 216-221.
- GABEV, E., TOBLER, K., ABRIL, C., HILBE, M., SENN, C., FRANCHINI, M., CAMPADELLI-FIUME, G., FRAEFEL, C. & ACKERMANN, M. 2010. Glycoprotein D of bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) confers an extended host range to BoHV-1 but does not contribute to invasion of the brain. *J Virol*, 84, 5583-93.
- GARCIA, A. & DE SANCTIS, J. B. 2013. An overview of adjuvant formulations and delivery systems. *APMIS*.
- GERAGHTY, R. J., JOGGER, C. R. & SPEAR, P. G. 2000. Cellular expression of alphaherpesvirus gD interferes with entry of homologous and heterologous alphaherpesviruses by blocking access to a shared gD receptor. *Virology*, 268, 147-58.
- GHERARDI, R. K., COQUET, M., CHERIN, P., BELEC, L., MORETTO, P., DREYFUS, P. A., PELLISSIER, J. F., CHARIOT, P. & AUTHIER, F. J. 2001. Macrophagic myofasciitis lesions assess long-term persistence of vaccine-derived aluminium hydroxide in muscle. *Brain*, 124, 1821-31.
- GUPTA, P. K., SAINI, M., GUPTA, L. K., RAO, V. D., BANDYOPADHYAY, S. K., BUTCHIAH, G., GARG, G. K. & GARG, S. K. 2001. Induction of immune responses in cattle with a DNA vaccine encoding glycoprotein C of bovine herpesvirus-1. *Vet Microbiol*, 78, 293-305.
- HORNUNG, V., BAUERNFEIND, F., HALLE, A., SAMSTAD, E. O., KONO, H., ROCK, K. L., FITZGERALD, K. A. & LATZ, E. 2008. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol*, 9, 847-56.
- HUGHES, G., BABIUK, L. A. & VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. 1988. Functional and topographical analyses of epitopes on bovine herpesvirus type 1 glycoprotein IV. *Arch Virol*, 103, 47-60.
- HUTCHINGS, D. L., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. & BABIUK, L. A. 1990. Lymphocyte proliferative responses to separated bovine herpesvirus 1 proteins in immune cattle. *J Virol*, 64, 5114-22.
- IOANNOU, X. P., GRIEBEL, P., HECKER, R., BABIUK, L. A. & VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. 2002. The immunogenicity and protective efficacy of bovine herpesvirus 1 glycoprotein D plus Emulsigen are increased by formulation with CpG oligodeoxynucleotides. *J Virol*, 76, 9002-10.
- ISRAEL, B. A., HERBER, R., GAO, Y. & LETCHWORTH, G. J., 3RD 1992. Induction of a mucosal barrier to bovine herpesvirus 1 replication in cattle. *Virology*, 188, 256-64.
- IZUMI, K. M. & STEVENS, J. G. 1990. Molecular and biological characterization of a herpes simplex virus type 1 (HSV-1) neuroinvasiveness gene. *J Exp Med*, 172, 487-96.
- JOGGER, C. R., MONTGOMERY, R. I. & SPEAR, P. G. 2004. Effects of linker-insertion mutations in herpes simplex virus 1 gD on glycoprotein-induced fusion with cells expressing HVEM or nectin-1. *Virology*, 318, 318-26.
- KOOL, M., PETRILLI, V., DE SMEDT, T., ROLAZ, A., HAMMAD, H., VAN NIMWEGEN, M., BERGEN, I. M., CASTILLO, R., LAMBRECHT, B. N. & TSCHOPP, J. 2008a. Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *J Immunol*, 181, 3755-9.
- KOOL, M., SOULLIE, T., VAN NIMWEGEN, M., WILLART, M. A., MUSKENS, F., JUNG, S., HOOGSTEDEN, H. C., HAMMAD, H. & LAMBRECHT, B. N. 2008b. Alum adjuvant boosts

- adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J Exp Med*, 205, 869-82.
- KRAMPS, J. A., PERRIN, B., EDWARDS, S. & VAN OIRSCHOT, J. T. 1996. A European inter-laboratory trial to evaluate the reliability of serological diagnosis of bovine herpesvirus 1 infections. *Vet Microbiol*, 53, 153-61.
- KUMAR, S., JONES, T. R., OAKLEY, M. S., ZHENG, H., KUPPUSAMY, S. P., TAYE, A., KRIEG, A. M., STOWERS, A. W., KASLOW, D. C. & HOFFMAN, S. L. 2004. CpG oligodeoxynucleotide and Montanide ISA 51 adjuvant combination enhanced the protective efficacy of a subunit malaria vaccine. *Infect Immun*, 72, 949-57.
- LAMKANFI, M. & DIXIT, V. M. 2009. The inflammasomes. *PLoS Pathog*, 5, e1000510.
- LEE, B. J., WEISS, M. L., MOSIER, D. & CHOWDHURY, S. I. 1999. Spread of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in the rabbit brain after intranasal inoculation. *J Neurovirol*, 5, 474-84.
- LI, H., NOOKALA, S. & RE, F. 2007. Aluminum hydroxide adjuvants activate caspase-1 and induce IL-1 β and IL-18 release. *J Immunol*, 178, 5271-6.
- LI, Y., XIE, F., CHEN, J., FAN, Q., ZHAI, L. & HU, S. 2012. Increased humoral immune responses of pigs to foot-and-mouth disease vaccine supplemented with ginseng stem and leaf saponins. *Chem Biodivers*, 9, 2225-35.
- MARCIANI, D. J. 2003. Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. *Drug Discov Today*, 8, 934-43.
- MARRACK, P., MCKEE, A. S. & MUNKS, M. W. 2009. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat Rev Immunol*, 9, 287-93.
- MARSHALL, R. L., RODRIGUEZ, L. L. & LETCHWORTH, G. J., 3RD 1986. Characterization of envelope proteins of infectious bovine rhinotracheitis virus (bovine herpesvirus 1) by biochemical and immunological methods. *J Virol*, 57, 745-53.
- MARTINON, F. & GLIMCHER, L. H. 2006. Gout: new insights into an old disease. *J Clin Invest*, 116, 2073-5.
- MARTINON, F., PETRILLI, V., MAYOR, A., TARDIVEL, A. & TSCHOPP, J. 2006. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*, 440, 237-41.
- METZLER, A. E., SCHUDEL, A. A. & ENGELS, M. 1986. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. *Arch Virol*, 87, 205-17.
- MEYER, G., LEMAIRE, M., ROS, C., BELAK, K., GABRIEL, A., CASSART, D., COIGNOUL, F., BELAK, S. & THIRY, E. 2001. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. *Arch Virol*, 146, 633-52.
- MONTGOMERY, R. I., WARNER, M. S., LUM, B. J. & SPEAR, P. G. 1996. Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell*, 87, 427-36.
- MURUVE, D. A., PETRILLI, V., ZAISS, A. K., WHITE, L. R., CLARK, S. A., ROSS, P. J., PARKS, R. J. & TSCHOPP, J. 2008. The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature*, 452, 103-7.
- NICHOLSON, K. G., COLEGATE, A. E., PODDA, A., STEPHENSON, I., WOOD, J., YPMA, E. & ZAMBON, M. C. 2001. Safety and antigenicity of non-adjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 (H5N3) vaccine: a randomised trial of two potential vaccines against H5N1 influenza. *Lancet*, 357, 1937-43.
- O'HAGAN, D. T. 2007. MF59 is a safe and potent vaccine adjuvant that enhances protection against influenza virus infection. *Expert Rev Vaccines*, 6, 699-710.
- OKAZAKI, K., FUJII, S., TAKADA, A. & KIDA, H. 2006. The amino-terminal residue of glycoprotein B is critical for neutralization of bovine herpesvirus 1. *Virus Res*, 115, 105-11.
- OLIVEIRA, G. A., WETZEL, K., CALVO-CALLE, J. M., NUSSENZWEIG, R., SCHMIDT, A., BIRKETT, A., DUBOVSKY, F., TIERNEY, E., GLEITER, C. H., BOEHMER, G., LUTY, A. J., RAMHARTER, M.,

- THORNTON, G. B., KREMSNER, P. G. & NARDIN, E. H. 2005. Safety and enhanced immunogenicity of a hepatitis B core particle Plasmodium falciparum malaria vaccine formulated in adjuvant Montanide ISA 720 in a phase I trial. *Infect Immun*, 73, 3587-97.
- PEEK, L. J., MIDDAUGH, C. R. & BERKLAND, C. 2008. Nanotechnology in vaccine delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 60, 915-28.
- PEREZ, S. E., BRETSCHNEIDER, G., LEUNDA, M. R., OSORIO, E. A., FLORES, E. F. & ODEON, A. C. 2002. Primary infection, latency, and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. *Vet Pathol*, 39, 437-44.
- PIDONE, C. L., GALOSI, C. M., ECHEVERRIA, M. G., NOSETTO, E. O. & ETCHEVERRIGARAY, M. E. 1999. Restriction endonuclease analysis of BHV-1 and BHV-5 strains isolated in Argentina. *Zentralbl Veterinarmed B*, 46, 453-6.
- RISSI, D. R., PIEREZAN, F., SA E SILVA, M., FLORES, E. F. & DE BARROS, C. S. 2008. Neurological disease in cattle in southern Brazil associated with Bovine herpesvirus infection. *J Vet Diagn Invest*, 20, 346-9.
- ROIZMANN, B., DESROSIERS, R. C., FLECKENSTEIN, B., LOPEZ, C., MINSON, A. C. & STUDDERT, M. J. 1992. The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol*, 123, 425-49.
- ROMERO MENDEZ, I. Z., SHI, Y., HOGENESCH, H. & HEM, S. L. 2007. Potentiation of the immune response to non-adsorbed antigens by aluminum-containing adjuvants. *Vaccine*, 25, 825-33.
- SHAH P, B. D., SHELAT P 2010. Nanoemulsion: A pharmaceutical review. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 1, 24-32.
- SHUKLA, D., DAL CANTO, M. C., ROWE, C. L. & SPEAR, P. G. 2000. Striking similarity of murine nectin-1alpha to human nectin-1alpha (HveC) in sequence and activity as a glycoprotein D receptor for alphaherpesvirus entry. *J Virol*, 74, 11773-81.
- SILVA, A. D., SPILKI, F. R., FRANCO, A. C., ESTEVES, P. A., HUBNER, S. O., DRIEMEIER, D., OLIVEIRA, A. P., RIJSEWIJK, F. & ROEHE, P. M. 2006. Vaccination with a gE-negative bovine herpesvirus type 1 vaccine confers insufficient protection to a bovine herpesvirus type 5 challenge. *Vaccine*, 24, 3313-20.
- SINGH, M. & O'HAGAN, D. T. 2002. Recent advances in vaccine adjuvants. *Pharm Res*, 19, 715-28.
- SINGH, M. & O'HAGAN, D. T. 2003. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *Int J Parasitol*, 33, 469-78.
- SOUZA, V. F., MELO, S.V., ESTEVES, P.A., SCHMIDT, C.S., GONCALVES, D.A., SCHAEFER, R., SILVA, T.C., ALMEIDA, R.S., VICENTINI, F., FRANCO, A.C., OLIVEIRA, E.A., SPILKI, F.R., WEIBLEIN, R., FLORES, E.F., LEMOS, R.A., ALFIERI, A.A., PITUCO, E.M., ROEHE, P.M. 2002. Monoclonal antibody characterization of bovine herpesviruses types 1 (BHV-1) and 5 (BHV-5). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 22, 13-18.
- SPILKI, F. R., SILVA, A. D., HUBNER, S., ESTEVES, P. A., FRANCO, A. C., DRIEMEIER, D. & ROEHE, P. M. 2004. Partial protection induced by a BHV-1 recombinant vaccine against challenge with BHV-5. *Ann N Y Acad Sci*, 1026, 247-50.
- STANBERRY, L. R., SPRUANCE, S. L., CUNNINGHAM, A. L., BERNSTEIN, D. I., MINDEL, A., SACKS, S., TYRING, S., AOKI, F. Y., SLAOUI, M., DENIS, M., VANDEPAPELIERE, P., DUBIN, G. & GLAXOSMITHKLINE HERPES VACCINE EFFICACY STUDY, G. 2002. Glycoprotein-D-adjuvant vaccine to prevent genital herpes. *N Engl J Med*, 347, 1652-61.
- STILES, K. M., MILNE, R. S., COHEN, G. H., EISENBERG, R. J. & KRUMMENACHER, C. 2008. The herpes simplex virus receptor nectin-1 is down-regulated after trans-interaction with glycoprotein D. *Virology*, 373, 98-111.

- THIRY, J., KEUSER, V., MUYLKENS, B., MEURENS, F., GOGEV, S., VANDERPLASSCHEN, A. & THIRY, E. 2006. Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. *Vet Res*, 37, 169-90.
- TIKOO, S. K., FITZPATRICK, D. R., BABIUK, L. A. & ZAMB, T. J. 1990. Molecular cloning, sequencing, and expression of functional bovine herpesvirus 1 glycoprotein gIV in transfected bovine cells. *J Virol*, 64, 5132-42.
- TIKOO, S. K., PARKER, M. D., VAN DEN HURK, J. V., KOWALSKI, J., ZAMB, T. J. & BABIUK, L. A. 1993. Role of N-linked glycans in antigenicity, processing, and cell surface expression of bovine herpesvirus 1 glycoprotein gIV. *J Virol*, 67, 726-33.
- VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. & BABIUK, L. A. 1986. Synthesis and processing of bovine herpesvirus 1 glycoproteins. *J Virol*, 59, 401-10.
- VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., HUGHES, G. & BABIUK, L. A. 1990. The role of carbohydrate in the antigenic and immunogenic structure of bovine herpesvirus type 1 glycoproteins gI and gIV. *J Gen Virol*, 71 (Pt 9), 2053-63.
- VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., PARKER, M. D., FITZPATRICK, D. R., VAN DEN HURK, J. V., CAMPOS, M., BABIUK, L. A. & ZAMB, T. 1992. Structural, functional, and immunological characterization of bovine herpesvirus-1 glycoprotein gI expressed by recombinant baculovirus. *Virology*, 190, 378-92.
- VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., PARKER, M. D., MASSIE, B., VAN DEN HURK, J. V., HARLAND, R., BABIUK, L. A. & ZAMB, T. J. 1993. Protection of cattle from BHV-1 infection by immunization with recombinant glycoprotein gIV. *Vaccine*, 11, 25-35.
- VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., VAN DEN HURK, J. V. & BABIUK, L. A. 1985. Topographical analysis of bovine herpesvirus type-1 glycoproteins: use of monoclonal antibodies to identify and characterize functional epitopes. *Virology*, 144, 216-27.
- VOGEL, F. S., CARON, L., FLORES, E. F., WEIBLEN, R., WINKELMANN, E. R., MAYER, S. V. & BASTOS, R. G. 2003. Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. *J Clin Microbiol*, 41, 4512-20.
- WARNER, M. S., GERAGHTY, R. J., MARTINEZ, W. M., MONTGOMERY, R. I., WHITBECK, J. C., XU, R., EISENBERG, R. J., COHEN, G. H. & SPEAR, P. G. 1998. A cell surface protein with herpesvirus entry activity (HvE) confers susceptibility to infection by mutants of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2, and pseudorabies virus. *Virology*, 246, 179-89.
- WEIBLEN, R., DE BARROS, C. S., CANABARRO, T. F. & FLORES, I. E. 1989. Bovine meningoencephalitis from IBR virus. *Vet Rec*, 124, 666-7.
- WIZEL, B., PERSSON, J., THORN, K., NAGY, E. & HARANDI, A. M. 2012. Nasal and skin delivery of IC31((R))-adjuvanted recombinant HSV-2 gD protein confers protection against genital herpes. *Vaccine*, 30, 4361-8.
- ZENG, B. J., CHUAN, Y. P., O'SULLIVAN, B., CAMINSCHI, I., LAHOUD, M. H., THOMAS, R. & MIDDELBERG, A. P. 2013. Receptor-specific delivery of protein antigen to dendritic cells by a nanoemulsion formed using top-down non-covalent click self-assembly. *Small*, 9, 3736-42.