

RAQUEL ALEXANDRA MACHADO MARQUES

**DOENÇA HEMORRÁGICA DO COELHO: MECANISMOS QUE  
CONFEREM RESISTÊNCIA OU SUSCETIBILIDADE À INFECÇÃO  
POR CALICIVÍRUS**

Tese de Candidatura ao grau de Doutor em  
Ciências Veterinárias submetida ao Instituto de  
Ciências Biomédicas Abel Salazar da  
Universidade do Porto.

Orientadora – Prof.<sup>a</sup> Doutora Paula Ferreira  
Proença

Categoria – Professora Associada

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas  
Abel Salazar da Universidade do Porto.



## **Preceitos legais**

De acordo com o Artigo 34º do Decreto-Lei n.º 115/2013, foram utilizados para esta tese resultados contidos nos seguintes trabalhos publicados ou a submeter a publicação internacional:

### *Artigos publicados*

Marques, R.M., Teixeira, L., Águas, A.P., Ribeiro, J.C., Costa-e-Silva, A., Ferreira, P.G. (2014) Immunosuppression abrogates resistance of young rabbits to rabbit haemorrhagic disease (RHD). *Vet Res* 45 (14).

Marques, R.M., Costa-e-Silva, A., Águas, A.P., Teixeira, L., Ferreira, P.G. (2012) Early inflammatory response of young rabbits attending natural resistance to calicivirus (RHDV) infection. *Vet Immunol Immunopathol* 150 (3-4), 181–188.

Teixeira, L., Marques, R.M., Águas, A.P., Ferreira, P.G. (2012) Regulatory T cells are decreased in acute RHDV lethal infection of adult rabbits. *Vet Immunol Immunopathol* 148 (3-4), 343-347.

Teixeira L., Marques, R.M., Águas, A.P., Ferreira, P.G. (2011) A simple and rapid method for isolation of caliciviruses from liver of infected rabbits. *Res Vet Sci* 91 (1), 164-166.

Marques, R.M., Costa-e-Silva, A., Águas, A.P., Teixeira, L., Ferreira, P.G. (2010) Early acute depletion of lymphocytes in calicivirus-infected adult rabbits. *Vet Res Commun* 34 (8), 659-668.

### *Artigos a submeter a publicação*

Marques, R.M., Teixeira, L., Águas, A.P., Costa-e-Silva, A., Ferreira, P.G., Is the expression of the calicivirus (RHDV) receptor on hepatocytes different in young and adult rabbits?



## **Agradecimentos**

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), projeto n.º PTDC/CVT/66656/2006 já cessado e o projeto corrente n.º PTDC/CVT/122905/2010, pela COMPETE e FEDER. Eu fui financiada pela FCT e COMPETE, bolsa n.º BI-1, PEst-OE/SAU/UI0215/2011.

Durante estes 4 anos de tese de doutoramento tive a oportunidade de trabalhar com pessoas extraordinárias que muito contribuíram para a realização deste trabalho. Foi uma caminhada árdua, cheia de desafios, alegrias e alguns reveses, passada num departamento que eu considero uma segunda casa. Como já dizia o poeta, “Nenhum homem é uma ilha, isolado em si mesmo...”, acredito, por isso, que o sucesso reside na cooperação, e o meu, em consonância, resultou não só do meu trabalho, mas da ajuda de todos aqueles que me acompanharam.

Assim agradeço...

Em primeiro lugar, à minha orientadora, Paula Ferreira, pela ajuda incondicional, pelo conhecimento transmitido, pela amizade e, por ser para mim, um exemplo de profissionalismo e dedicação. Efetivamente, não podia ter escolhido melhor orientadora!

Ao Professor Águas, um profissional ímpar, que eu tenho como referência, por me ter aceitado como aluna de doutoramento no departamento de anatomia, pelos incentivos e pelas críticas construtivas que me ajudaram a ser melhor profissional.

À Luzia, pelo apoio incondicional no laboratório, pelas “discussões” proveitosas, por sempre me ouvir e incentivar. Obrigado, és uma grande amiga!

*Ao restante Departamento de Anatomia, nomeadamente...*

À Maria João pela disponibilidade, pela ajuda nas questões burocráticas e pela amizade.

À “equipa maravilha” Sr. Costa e D. Manuela pela ajuda incondicional que prestaram, quer na realização dos ensaios *in vivo* como na acomodação e tratamento dos coelhos.

À Madalena e à Ana pela ajuda incondicional prestada no laboratório, tanto na realização das técnicas histológicas como no processamento dos órgãos nos ensaios de citometria de fluxo. Obrigado, pela vossa amizade.

Ao Duarte pelas conversas, ensinamentos e, acima de tudo, pela grande amizade.

Ao Gil, o “nosso faz tudo”, por estar sempre disponível para ajudar a resolver os problemas técnicos no laboratório.

À D. Alexandrina, que apesar de já não estar entre nós, deu-me uma ajuda preciosa no início deste trabalho, principalmente, na realização das técnicas histológicas.

A todos os estagiários que acompanharam este trabalho, nomeadamente, à Telma, ao Martinho, à Sara, à Joana e agora à Ana, obrigado pela ajuda, pela paciência e pelo apoio.

À Sofia, à Ângela e ao Tiago pelo apoio, pelos conselhos e pela amizade.

À Maria pela amizade.

*Ao Departamento de Imunologia nomeadamente...*

À Professora Paula Ferreira por me ter apresentado à minha atual orientadora e, por no fundo, ter contribuído para a minha ida para o departamento de Anatomia.

Ao Pedro Madureira pela ajuda e transmissão de conhecimento sobre a técnica de citometria de fluxo.

Ao Professor Manuel Vilanova pelos conselhos.

À Adília pela amizade e por me ter ajudado na compra de material de laboratório.

À Alexandra pelas conversas produtivas e por me ter cedido os ratos que precisei para a produção de anticorpos anti-VDHC.

Ao Pedro Ferreirinha pela ajuda, pelos conselhos e pelos reagentes cedidos.

À D. Conceição por toda a atenção e cuidado que teve em fornecer o material que eu precisava (antes de termos o autoclave no departamento).

*Ao Departamento de Química nomeadamente...*

À D. Julia pela disponibilidade, pela ajuda que me deu no protocolo de isolamento dos recetores virais e pelo material cedido.

*Ao Laboratório de Fisiologia nomeadamente...*

Ao Professor Baldaia pela amizade e por me ter autorizado a utilizar o leitor de placas de ELISA e o liofilizador.

Ao Sr. Andrade pela disponibilidade e pela ajuda que me deu na resolução de questões técnicas associadas à liofilização.

*Ao Laboratório de Bioquímica nomeadamente...*

À Engenheira Ana Maria pela disponibilidade e pela ajuda que me deu na utilização da ultracentrifuga.

*Outros elementos do ICBAS nomeadamente...*

À Madalena da reprografia pelas sugestões gráficas e pelas impressões, quer dos *posters* como desta tese; à Ana Paula Pereira do gabinete de pós-graduação por me ter ajudado na resolução de problemas burocráticos; à Joana dos serviços audiovisuais pela ajuda na impressão da capa dos CDs utilizados na gravação desta tese; aos elementos do serviço de informática (Rui, Nuno, Nuno, João) pela disponibilidade e por todo o apoio informático; por fim, aos restantes elementos do

ICBAS que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Às minhas amigas Sara e Vanessa pelo apoio incondicional.

Obrigado à minha família por sempre me apoiar, especialmente, aos meus avós e à minha tia Bela.

Agradeço aos meus pais, sem os quais nada disto seria possível, pelo apoio incondicional, por me ouvirem, pelos sábios conselhos e, acima de tudo, por sempre acreditarem em mim. Obrigado por serem os melhores pais do mundo!

À minha irmã, Joana, pelas conversas, pelos conselhos e por sempre me incentivar a seguir os meus sonhos.

Ao Bruno, simplesmente, por existir!



## ÍNDICE

|                                                                                                                                               |             |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Agradecimentos .....</b>                                                                                                                   | <b>v</b>    |
| <b>Índice de tabelas.....</b>                                                                                                                 | <b>xi</b>   |
| <b>Índice de figuras .....</b>                                                                                                                | <b>xii</b>  |
| <b>Sumário .....</b>                                                                                                                          | <b>xiii</b> |
| <b>Abstract.....</b>                                                                                                                          | <b>xv</b>   |
| <b>Abreviaturas .....</b>                                                                                                                     | <b>xvii</b> |
| <b>Capítulo 1 .....</b>                                                                                                                       | <b>1</b>    |
| 1. Introdução .....                                                                                                                           | 3           |
| 1.1. Doença Hemorrágica do Coelho (DHC) .....                                                                                                 | 3           |
| 1.1.1. Origem, Dispersão Geográfica e Importância Económica .....                                                                             | 3           |
| 1.1.2. Agente Etiológico .....                                                                                                                | 5           |
| 1.1.2.1. Morfologia, Genoma e Proteínas .....                                                                                                 | 5           |
| 1.1.2.2. Origem e Filogenia do VDHC.....                                                                                                      | 7           |
| 1.1.2.2.1. Estirpes Patogénicas do VDHC.....                                                                                                  | 8           |
| 1.1.2.2.2. Estirpes Não-patogénicas do VDHC .....                                                                                             | 11          |
| 1.1.2.3. Propriedades do VDHC .....                                                                                                           | 13          |
| 1.1.3. Transmissão da DHC .....                                                                                                               | 14          |
| 1.1.4. Sinais Clínicos .....                                                                                                                  | 15          |
| 1.1.5. Lesões Macroscópicas e Microscópicas Características da DHC .....                                                                      | 16          |
| 1.1.6. Métodos de Diagnóstico .....                                                                                                           | 19          |
| 1.1.7. Patogenia da DHC .....                                                                                                                 | 20          |
| 1.1.8. Mecanismos de Resistência à DHC .....                                                                                                  | 25          |
| 1.1.9. Controlo e Prevenção .....                                                                                                             | 27          |
| 1.2. Estrutura da tese .....                                                                                                                  | 29          |
| 1.3. Referências Bibliográficas .....                                                                                                         | 31          |
| <b>Capítulo 2.....</b>                                                                                                                        | <b>45</b>   |
| A simple and rapid method for isolation of caliciviruses from liver of infected rabbits [publicado em <i>Research in Veterinary Science</i> ] |             |
| <b>Capítulo 3.....</b>                                                                                                                        | <b>51</b>   |
| Early acute depletion of lymphocytes in calicivirus-infected adult rabbits [publicado em <i>Veterinary Research Communications</i> ]          |             |

|                                                                                                                                                                            |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Capítulo 4.....</b>                                                                                                                                                     | <b>63</b>  |
| Early inflammatory response of young rabbits attending natural resistance to calicivirus (RHDV) infection [publicado em <i>Veterinary Immunology and Immunopathology</i> ] |            |
| <b>Capítulo 5.....</b>                                                                                                                                                     | <b>73</b>  |
| Regulatory T cells are decreased in acute RHDV lethal infection of adult rabbits [publicado em <i>Veterinary Immunology and Immunopathology</i> ]                          |            |
| <b>Capítulo 6.....</b>                                                                                                                                                     | <b>81</b>  |
| Immunosuppression abrogates resistance of young rabbits to rabbit haemorrhagic disease (RHD) [publicado em <i>Veterinary Research</i> ]                                    |            |
| <b>Capítulo 7.....</b>                                                                                                                                                     | <b>89</b>  |
| Is the expression of the calicivirus (RHDV) receptor on hepatocytes different in young and adult rabbits? [estudo original não publicado]                                  |            |
| <b>Capítulo 8.....</b>                                                                                                                                                     | <b>105</b> |
| 8. Discussão Geral .....                                                                                                                                                   | 107        |
| 8.1. Caraterização de Populações Leucocitárias após Infecção com VDHC .....                                                                                                | 108        |
| 8.2. Produção de Citocinas após Infecção com VDHC .....                                                                                                                    | 112        |
| 8.3. Mecanismos de Evasão do VDHC à Resposta do Hospedeiro .....                                                                                                           | 114        |
| 8.4. Infecção do Hepatócito em Coelhos Adultos e Jovens.....                                                                                                               | 118        |
| 8.5. Comentários Gerais à Resistência Natural dos Coelhos Jovens à DHC.....                                                                                                | 119        |
| 8.6. Conclusões e Perspetivas Futuras.....                                                                                                                                 | 121        |
| 8.7. Referências Bibliográficas .....                                                                                                                                      | 125        |

## Índice de tabelas

|               |    |
|---------------|----|
| Tabela 1..... | 17 |
|---------------|----|

## Índice de figuras

|               |   |
|---------------|---|
| Figura 1..... | 6 |
| Figura 2..... | 9 |

## Sumário

O vírus da doença hemorrágica do coelho (VDHC) é um calicivírus do género *Lagovirus*, responsável por causar a morte a cerca de 90% dos coelhos adultos infetados, como resultado de uma hepatite necrótica fulminante e de uma diátese hemorrágica. Estranhamente há resistência completa dos coelhos jovens à doença hemorrágica do coelho (DHC), sendo que pouco se sabe sobre os mecanismos que poderão conferir resistência ou suscetibilidade à infeção. O trabalho desenvolvido nesta tese teve como principal objetivo contribuir para um melhor entendimento desses mecanismos e, consequentemente, para um melhor conhecimento da patogenia da DHC.

Para a concretização dos vários estudos experimentais apresentados nesta tese foram utilizados coelhos jovens (4 semanas) e coelhos adultos (8-10 semanas), bem como um inóculo purificado de VDHC (estirpe patogénica Ast89), obtido a partir de um novo método de isolamento descrito nesta tese.

Este programa de investigação foi inaugurado com uma caracterização detalhada das subpopulações leucocitárias intervenientes na infeção por VDHC, tanto no fígado como no baço, de coelhos adultos infetados intramuscularmente (i.m.) com o vírus. Foi concluído que a infeção por VDHC induz precocemente a depleção dos linfócitos T e B, tanto no fígado como no baço, estando esta depleção associada a apoptose. Foi também evidenciado que essa linfopenia precedia ou acompanhava o desenvolvimento da lesão hepatocelular. Partimos depois para a investigação da cinética de subpopulações leucocitárias, no fígado e baço e para a determinação do nível de citocinas no soro de coelhos jovens infetados com o VDHC. Os coelhos jovens desenvolvem uma resposta inflamatória rápida e eficaz, caracterizada pelo aumento precoce (6 horas) e moderado de várias citocinas pró-inflamatórias e pelo aumento sustentado, quer no fígado como no baço, de linfócitos B e T. Esta resposta está associada à presença de anticorpos específicos para o VDHC, 7 dias após infeção. Em contraste com os animais jovens, os coelhos adultos infetados desenvolvem uma resposta inflamatória exacerbada, evidenciada pelo aumento marcado de citocinas pro e anti-inflamatórias poucas horas antes da morte do hospedeiro, especialmente de TNF- $\alpha$  ("tempestade de citocinas"). Estudámos depois a dinâmica das células T reguladoras em ambos os grupos etários de coelhos

infetados, dado que estas têm um papel crucial na modulação da resposta inflamatória, que quando exacerbada pode ser deletéria para o animal. Nos coelhos jovens observámos que estas células não sofrem alterações, contrariamente ao determinado em coelhos adultos que apresentam uma diminuição significativa desta população celular, a qual pode contribuir para o fenómeno de “tempestade de citocinas” registado nestes animais. Concluímos nesta fase das nossas investigações que os coelhos adultos apresentam uma desregulação da resposta imune inata e supressão da resposta adaptativa e os coelhos jovens desenvolvem uma resposta precoce e adequada à infeção. Julgámos então pertinente investigar o efeito da imunossupressão em coelhos jovens que são naturalmente resistentes à DHC. Descobrimos que os coelhos jovens imunossuprimidos e infetados desenvolvem um quadro clínico e histopatológico de DHC, igual ao dos coelhos adultos, que culmina na sua morte 1 a 3 dias após infeção. Curiosamente, nos hepatócitos (célula alvo da replicação viral) dos coelhos imunossuprimidos e infetados era possível observar uma marcação imunohistoquímica para o VDHC, equivalente à documentada nos animais adultos que são vítima de DHC. Outro mecanismo que pode contribuir para a resistência dos coelhos jovens ou suscetibilidade dos coelhos adultos à infeção é a expressão diferencial do recetor viral no fígado. Assim, procedemos à caracterização bioquímica do recetor viral no fígado de coelhos, que se revelou de natureza lipídica, e à avaliação da sua expressão em coelhos jovens e adultos que se mostrou equivalente entre os dois grupos, favorecendo, deste modo, a interpretação de que são diferenças na resposta imunológica inata e não diferenças na densidade de recetores virais que fundamentam as distintas respostas ao vírus por coelhos adultos e jovens.

Em conclusão, esta tese propõe que a resposta imune inata tem um papel crucial na contenção da infeção e eliminação do vírus e, por conseguinte, na resistência demonstrada pelos coelhos jovens à infeção pelo VDHC. Opostamente, nos coelhos adultos será a desregulação da resposta imune inata que terá certamente um papel importante na patogenia da doença, ao permitir a replicação e disseminação viral, assim como contribuir diretamente para a ocorrência de lesão tecidular pelo efeito da “tempestade de citocinas”.

## Abstract

Rabbit Haemorrhagic Disease Virus (RHDV) is a calicivirus of the genus *Lagovirus*, responsible for causing the death of 90% of infected adult rabbits. Death is induced by a necrotic hepatitis and a haemorrhagic diathesis. Interestingly, there is complete resistance of young rabbits to RHD. However, little is known about the pathogenic mechanisms that confer resistance or susceptibility to infection. This thesis had as its main objective to contribute to a better understanding of these mechanisms and hence to advance our current knowledge on the pathogenesis of RHD.

To achieve the several experimental investigations presented herein, we used young rabbits (4 weeks old) and adult rabbits (8-10 weeks old) as well as an inoculum of purified RHDV (Ast89, pathogenic strain), obtained by a new isolation method that is described in this thesis.

Our research program started the characterization of the leukocyte subpopulations in the liver and spleen of adult rabbits infected intramuscularly (i.m.) with RHDV. We detected an early depletion of T and B lymphocytes in both liver and spleen that was associated with apoptosis. This lymphopenia preceded or accompanied the hepatocellular lesion. We evaluated then the kinetics of leukocyte subpopulations in the spleen and liver, and also the level of serum cytokines in young rabbits infected intramuscularly with RHDV. These animals developed a rapid and efficient inflammatory response characterized by an early (6 hours) and moderate increase of several proinflammatory cytokines and a sustained increase of B and T lymphocytes, in both liver and spleen. This response was associated with the presence of specific antibodies to RHDV, 7 days after infection. In contrast, we have observed that infected adult rabbits develop an exacerbated inflammatory response, as evidenced by a sudden increase in pro and anti-inflammatory cytokines, hours before the death of the host, especially TNF- $\alpha$  (cytokine storm). Subsequently, we have decided to study the dynamics of regulatory T cells in both young and adult infected rabbits, since these cells have a crucial role in controlling inflammation, which could be deleterious for the host when exacerbated. We found that regulatory T cells were unchanged in young rabbits and were significantly decreased in adult rabbits, the latter change may contribute for the phenomenon of cytokine storm documented in

these animals after RHDV infection. Taken together, our data suggested that the immune response has an important role in the outcome of RHD, since adult rabbits exhibit an aberrant innate immune response and a suppressed adaptive immune response, and young rabbits develop an early and effective inflammatory response to the infection. Considering these differences, we have decided to evaluate the effect of immunosuppression in young rabbits that are naturally resistant to RHD. These immunosuppressed and infected young rabbits develop clinical and histopathological features of RHD, dying between 1-3 days after infection, just like adult rabbits do. Interestingly, in the hepatocytes of the immunosuppressed and infected rabbits, the specific labelling to RHDV was identical to that documented in adult rabbits that die from RHD. Another mechanism could be postulated to explain the resistance of young rabbits and susceptibility of adult rabbits to RHDV infection: a different expression of the viral receptor on the hepatocyte membrane. Thus, we have performed the biochemical characterization of the viral receptor that was revealed to be lipidic in nature, and also to evaluate its expression in young and adult rabbits. Viral receptor expression was similar in hepatocytes from both age groups.

In conclusion, the data presented in this thesis points to the innate immune response as the key factor for the resistance of young rabbits to RHDV infection, by controlling the infection and eliminating the virus. In contrast, in adult rabbits, the deregulation of the innate immune response may have an important role in the pathogenesis of the RHD, since it may favour viral replication and dissemination, as well as, for the direct tissue damage caused by a cytokine storm effect.



## Abreviaturas

|               |                                                            |
|---------------|------------------------------------------------------------|
| ADN           | Ácido desoxirribonucleico                                  |
| ALT           | Alanina aminotransferase                                   |
| ARNg          | Ácido ribonucleico genómico                                |
| ARNsg         | Ácido ribonucleico subgenómico                             |
| ARNm          | Ácido ribonucleico mensageiro                              |
| AST           | Aspartato aminotransferase                                 |
| BALT          | <i>Bronchus associated lymphoid tissue</i>                 |
| CID           | Coagulação intravascular disseminada                       |
| CVF           | Calicivírus felino                                         |
| DHC           | Doença hemorrágica do coelho                               |
| EBHSV         | <i>European Brown Hare syndrome virus</i>                  |
| ELISA         | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>                   |
| ERRO          | Espécies reativas de oxigénio                              |
| FADD          | <i>Fas associated protein with death domain</i>            |
| HGF           | <i>Hepatocyte growth factor</i>                            |
| IFN           | <i>Interferon</i>                                          |
| IL-1          | <i>Interleukin 1</i>                                       |
| IL-6          | <i>Interleukin 6</i>                                       |
| IL-8          | <i>Interleukin 8</i>                                       |
| IL-10         | <i>Interleukin 10</i>                                      |
| IL-1RA        | <i>Interleukin 1 receptor antagonist</i>                   |
| i.m.          | Intramuscular                                              |
| IRF-3         | <i>IFN regulatory factor 3</i>                             |
| JNK           | <i>c-Jun N-terminal kinase</i>                             |
| MIP- $\alpha$ | <i>Macrophage inflammatory protein <math>\alpha</math></i> |
| MIP- $\beta$  | <i>Macrophage inflammatory protein <math>\beta</math></i>  |

|               |                                                                      |
|---------------|----------------------------------------------------------------------|
| MRCV          | <i>Michigan rabbit calicivirus</i>                                   |
| nm            | nanómetros                                                           |
| NK            | <i>Natural Killer</i>                                                |
| ON            | Óxido nítrico                                                        |
| ONS           | Óxido nítrico sintetase                                              |
| ORF           | <i>Open reading frame</i>                                            |
| PARP          | <i>Poly ADP ribose polymerase</i>                                    |
| RCV           | <i>Rabbit calicivirus</i>                                            |
| RdRp          | <i>RNA-dependent RNA polymerase</i>                                  |
| RLH-MAVS      | <i>RIG-I-like helicase-mitochondrial antiviral signaling protein</i> |
| RT-PCR        | <i>Reverse transcriptase - polymerase chain reaction</i>             |
| sIL6R         | <i>Soluble interleukin 6 receptor</i>                                |
| SOCS3         | <i>Suppressor of cytokine signaling 3</i>                            |
| SOD           | Superóxido dismutase                                                 |
| STAT          | <i>Signal transducers and activators of transcription</i>            |
| sTNFR         | <i>Soluble tumor necrosis factor receptor</i>                        |
| TACMR         | Tempo do antepassado comum mais recente                              |
| TGF- $\alpha$ | <i>Transforming growth factor <math>\alpha</math></i>                |
| TGF- $\beta$  | <i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i>                 |
| THA           | Teste de hemaglutinação                                              |
| TIHA          | Teste de inibição da hemaglutinação                                  |
| TLRs          | <i>Toll-like receptors</i>                                           |
| TNF- $\alpha$ | <i>Tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>                     |
| TRAIL         | <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>                         |
| Treg          | T reguladoras                                                        |
| TUNEL         | <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>  |
| VDHC          | Vírus da doença hemorrágica do coelho                                |

|      |                                    |
|------|------------------------------------|
| VP10 | <i>Viral protein 10</i>            |
| VP24 | <i>Viral protein 24</i>            |
| VP35 | <i>Viral protein 35</i>            |
| VP60 | <i>Viral protein 60</i>            |
| VPg  | <i>Virus linked-genome protein</i> |



### **1. Introdução**

#### **1.1. Doença Hemorrágica do Coelho (DHC)**

##### **1.1.1. Origem, Dispersão Geográfica e Importância Económica**

##### **1.1.2. Agente Etiológico**

###### **1.1.2.1. Morfologia, Genoma e Proteínas**

###### **1.1.2.2. Propriedades do VDHC**

###### **1.1.2.3. Origem e Filogenia do VDHC**

###### **1.1.2.3.1. Estirpes Patogénicas do VDHC**

###### **1.1.2.3.2. Estirpes Não-patogénicas do VDHC**

##### **1.1.3. Transmissão da DHC**

##### **1.1.4. Sinais Clínicos**

##### **1.1.5. Lesões Macroscópicas e Microscópicas Características de DHC**

##### **1.1.6. Métodos de Diagnóstico**

##### **1.1.7. Patogenia da DHC**

##### **1.1.8. Mecanismos de Resistência à DHC**

##### **1.1.9. Controlo e Prevenção**

### **1.2. Estrutura da tese**

### **1.3. Referências Bibliográficas**



## **1. Introdução**

### **1.1. Doença Hemorrágica do Coelho (DHC)**

#### **1.1.1. Origem, Dispersão Geográfica e Importância Económica**

A Doença Hemorrágica do Coelho (DHC) é uma infeção viral, específica do coelho europeu (*Oryctolagus cuniculus*), caracterizada por ser altamente contagiosa, e quase sempre fatal para os animais adultos infetados. O primeiro surto da doença foi reportado em 1984 na província de Jiangsu, na República Popular da China [1]. Em menos de um ano foi responsável pela morte de 14 milhões de coelhos domésticos, tendo-se espalhado por uma área equivalente a 50 000 km<sup>2</sup> [2].

Apesar de a DHC ter sido reconhecida primeiramente na China, os primeiros casos foram registados em coelhos Angora importados da Alemanha Ocidental, poucos dias antes do primeiro surto, o que levou a postular uma possível origem Europeia para o agente etiológico da doença [3]. Este facto corroborado por dados serológicos [4] levaram a crer que o vírus da DHC pudesse ter resultado da mutação de uma estirpe não-patogénica, que circulava na Europa, décadas ou mesmo séculos antes do primeiro surto [4-6].

Em 1985, surgiram os primeiros casos de DHC na Coreia, possivelmente, devido à importação da China de carne de coelho contaminada [7]. A doença rapidamente se disseminou em direção ao ocidente, tendo alcançado a Europa, mais precisamente a Itália, em 1986 [8]. O facto da carne de coelho representar uma importante fonte alimentar e comercial na Europa levou a que se acreditasse que o comércio de carne contaminada pudesse estar na origem de muitos dos surtos registados [8, 9]. Deste modo, em 1987, surgiram casos de DHC na Polónia e na Checoslováquia, onde foi responsável pela morte de 30 milhões de coelhos entre o período de verão e outono [7, 10, 11]. Em 1988, foram detetados surtos na Alemanha [12], França [9], Bulgária [13], Hungria [7], Dinamarca [14] e Suíça [15]. No mesmo ano chegou à Península Ibérica, mais concretamente, a Espanha [16], e em 1989 a Portugal [17], países onde o coelho europeu é espécie nativa e desempenha um papel vital no ecossistema, uma vez que é presa direta de predadores endémicos em risco de extinção, como o lince ibérico (*Lynx pardinus*) e a águia imperial (*Aquila*

*adalberti*) [18, 19]. Em 1992, a DHC chegou ao Reino Unido, mais concretamente ao sul de Inglaterra. No entanto, a baixa taxa de mortalidade (15%) e dispersão não foram concordantes com o que se verificou na China e Europa continental, o que levou a sugerir a presença de uma estirpe menos virulenta no Reino Unido [20]. Tendo em conta a localização geográfica dos surtos especulou-se que o vírus tenha chegado à ilha por aerossóis, pássaros ou ferryboat [21].

Para além de se ter tornado endémica em quase todos os países da Europa, a DHC também foi detetada no Norte de África (Egito, Tunísia) [9], no México, presumidamente devido à importação da China de carne de coelho contaminada [22, 23], e em 2000 na América do Norte [24]. O México foi o único país que efetivamente conseguiu erradicar a DHC, isto devido à aplicação de medidas rígidas de controlo (vacinação) e abate sanitário dos animais infetados, mas também, possivelmente, devido ao facto de o coelho europeu não ser uma espécie endémica no país [23].

Contrariamente ao que acontece em muitos países, nomeadamente, do sul da Europa, onde a carne de coelho faz parte da dieta alimentar, e a indústria de peles e a caça representam setores económicos importantes, na Austrália e Nova Zelândia, o coelho é visto como uma praga para a agricultura e uma ameaça ecológica para a fauna e flora nativas [25]. O impacto que a DHC teve nas populações de coelhos, essencialmente na Europa, permitiu realçar a possível aplicação do vírus da DHC, como um agente biocontrolador nestes países da Oceânia, à semelhança do que já havia sido feito com o vírus da mixomatose [25]. Consequentemente, em 1991 foi iniciado na Austrália um programa de investigação em que se pretendia avaliar esse mesmo potencial. No entanto, em 1995, o vírus escapou acidentalmente de um laboratório na ilha de Wardang para o continente, onde se propagou rapidamente, tendo sido responsável pela morte de cerca de 95% da população de coelhos. Ao contrário das expectativas, a taxa de mortalidade não se manteve, tendo efetivamente diminuído numa fase mais tardia [26]. Em 1997, o agente etiológico da DHC foi ilegalmente introduzido na Nova Zelândia, depois do Ministério da Agricultura ter negado a importação e utilização deste como agente biocontrolador. Após este incidente a utilização do vírus foi regularizada e neste momento pode ser comercializado [27].



Em março de 2011, foi reportado o primeiro caso de DHC no Canadá, tendo sido inferida a sua origem nos Estados Unidos e a sua introdução por insetos ou fômites contaminados [28, 29].

### 1.1.2. Agente Etiológico

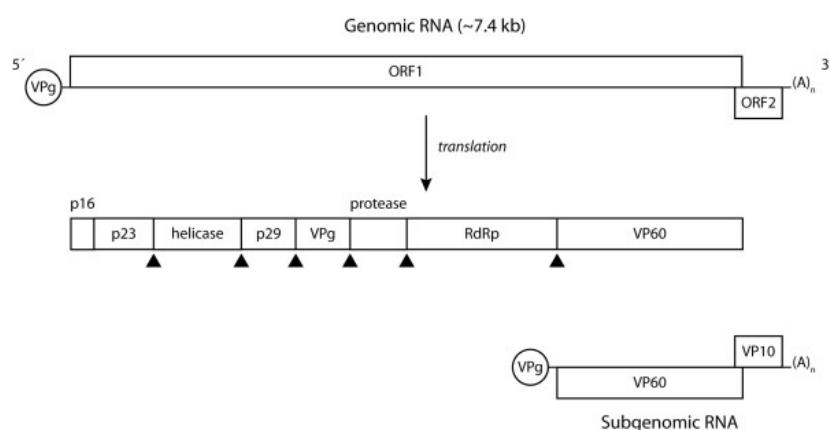
Apesar de em 1984 Liu ter identificado o agente etiológico da DHC como um vírus, a sua classificação foi durante muito tempo não consensual, tendo mesmo sido considerado um picornavírus [30], um parvovírus [22] e um *parvo-like* vírus [3]. Só no início dos anos 90 é que foi definitivamente identificado como membro da família *Caliciviridae*, com base na sua morfologia, tamanho, conteúdo genómico e peso molecular da principal proteína estrutural [31-34].

A família *Caliciviridae* está dividida em 4 géneros: *Norovirus* e *Sapovirus* responsáveis por gastroenterites em humanos; *Vesivirus*, que inclui vírus indutores de lesões vesiculares, infeções respiratórias e esterilidade (ex.: calicivírus felino, CVF); e *Lagovirus* que contém o vírus da Doença Hemorrágica do Coelho (VDHC) e o vírus que causa a síndrome da lebre europeia (*European Brown Hare Syndrome virus*, EBHSV) [27].

#### 1.1.2.1. Morfologia, Genoma e Proteínas

Os viriões do VDHC são de pequeno tamanho apresentando um diâmetro que pode variar entre 27-40 nm, tal como acontece com outros vírus da família *Caliciviridae* [31, 35, 36]. Não possui invólucro e apresenta uma cápside icosaédrica, formada por 32 capsómeros [37]. Estes viriões contêm ARN genómico (ARNg) de cadeia simples e positiva, constituída por 7437 nucleótidos (aproximadamente 7,4 kb) e um ARN subgenómico (ARNsg) com aproximadamente 2,2 kb, que é colinear à região 3' do ARNg [38, 39] (Figura 1). Este ARNsg codifica normalmente produtos necessários às fases, intermediária e final da infeção, como proteínas estruturais (ex.: VP60 e VP10) [27, 38]. No ARNg é possível detetar duas *Open Reading Frames* (ORF) que se sobrepõem ligeiramente, designadas ORF1, compreendida entre os nucleótidos 10 e 7044, e a ORF2, compreendida entre os nucleótidos 7025 e

7378 [38]. A ORF1 codifica uma poliproteína “precursora”, com 257 kDa, que após tradução é clivada por uma protéase (*trypsin-like cysteine protease*), em proteínas não estruturais [p16, p23, p29, helicase, *RdRp* (*RNA-dependent RNA polymerase*) e a *VPg* (*Virus linked-genome protein*, ligada covalentemente à extremidade 5’ do ARNg e ARNsg)] e na principal proteína estrutural da cápside viral, a VP60, com aproximadamente 64kDa [27]. Esta última, contudo, parece ser sintetizada maioritariamente pelo ARNsg [40]. A VP10 também é uma proteína estrutural da cápside e é codificada a partir da extremidade 3’ do ARNg (ORF2) e do ARNsg [27]. Esta proteína parece estar envolvida no aumento da replicação viral e na indução da apoptose, o que levou a se inferir que terá um papel importante na regulação da replicação viral e na libertação de novos viriões das células hospedeiras. A VP60, principal proteína da cápside viral [41], constitui, por conseguinte, o alvo principal do sistema imunitário do hospedeiro contra o VDHC, desempenhando também um papel importante no diagnóstico e vacinação contra a DHC [36, 42-44].



**Figura 1:** Organização genómica do VDHC [27]. Reimpresso com a permissão de *Biomed Central: Veterinary Research, Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review.*, 43 (12), 2012, Abrantes, J., van der Loo, W., Le Pendu, J., and Esteves, P.J., Figure 1.

#### 1.1.2.2. Origem e Filogenia do VDHC

Como referido anteriormente, o primeiro surto de DHC foi detetado na China em 1984 [1]. No entanto, o facto de este ter ocorrido em coelhos importados da Alemanha, levou a que a origem do vírus fosse questionada, nomeadamente, inquiriu-se sobre a possibilidade de os animais já terem vindo infetados do país de origem ou, por outro lado, terem sido, posteriormente, infetados na China. Efetivamente, quer a origem como a filogenia do VDHC são ainda pouco compreendidos. Todavia, vários são os estudos que contrariam a origem chinesa, já que os dados moleculares e serológicos apontam para que a forma patogénica do VDHC tenha surgido anteriormente a 1984 [4, 6], e para que a estirpe chinesa tenha origem na Europa [6, 45-47]. No seguimento destes estudos, várias hipóteses foram propostas para explicar a origem do VDHC. Uma delas sugere a transmissão do *EBHSV* ao coelho europeu; no entanto, esta foi descartada uma vez que o *EBHSV*, apesar de ser geneticamente próximo ao VDHC, não infeta o coelho europeu [45]. Outra das hipóteses propunha a existência de um vírus que tivesse migrado de uma outra espécie para o coelho europeu, tendo-se tornado patogénico neste hospedeiro [48]. Contudo, a hipótese mais consensual assenta na mutação de uma estirpe não patogénica, geneticamente semelhante ao VDHC e que já circulava na Europa durante um longo período de tempo, antes do primeiro surto ser detetado [5]. Como é evidente, só um conhecimento aprofundado do genoma do VDHC, complementado por dados serológicos, pode ajudar a compreender melhor a origem e a evolução da virulência do vírus. Consequentemente tem-se procedido à sequenciação e comparação de sequências completas, ou parciais, de nucleótidos da proteína da cápside viral, de vários isolados de VDHC [6, 39, 47, 49-52], tendo vários estudos revelado uma baixa variabilidade genética entre isolados [6, 45, 50, 53]. Nowotny e coautores (1997) [45] mostraram uma homologia entre 89,4-100% para isolados obtidos em 17 países diferentes. Guittre e colaboradores (1995) [50], por sua vez, mostraram que a homologia entre sequências de nucleótidos correspondente à porção N-terminal da proteína da cápside, de 3 estirpes geograficamente e temporalmente distintas, variava entre 96,6-98,7%, indicando que esta porção da proteína da cápside está bastante preservada. Estes resultados sugerem que a maior parte das estirpes de VDHC estão estreitamente relacionadas, registando-se,

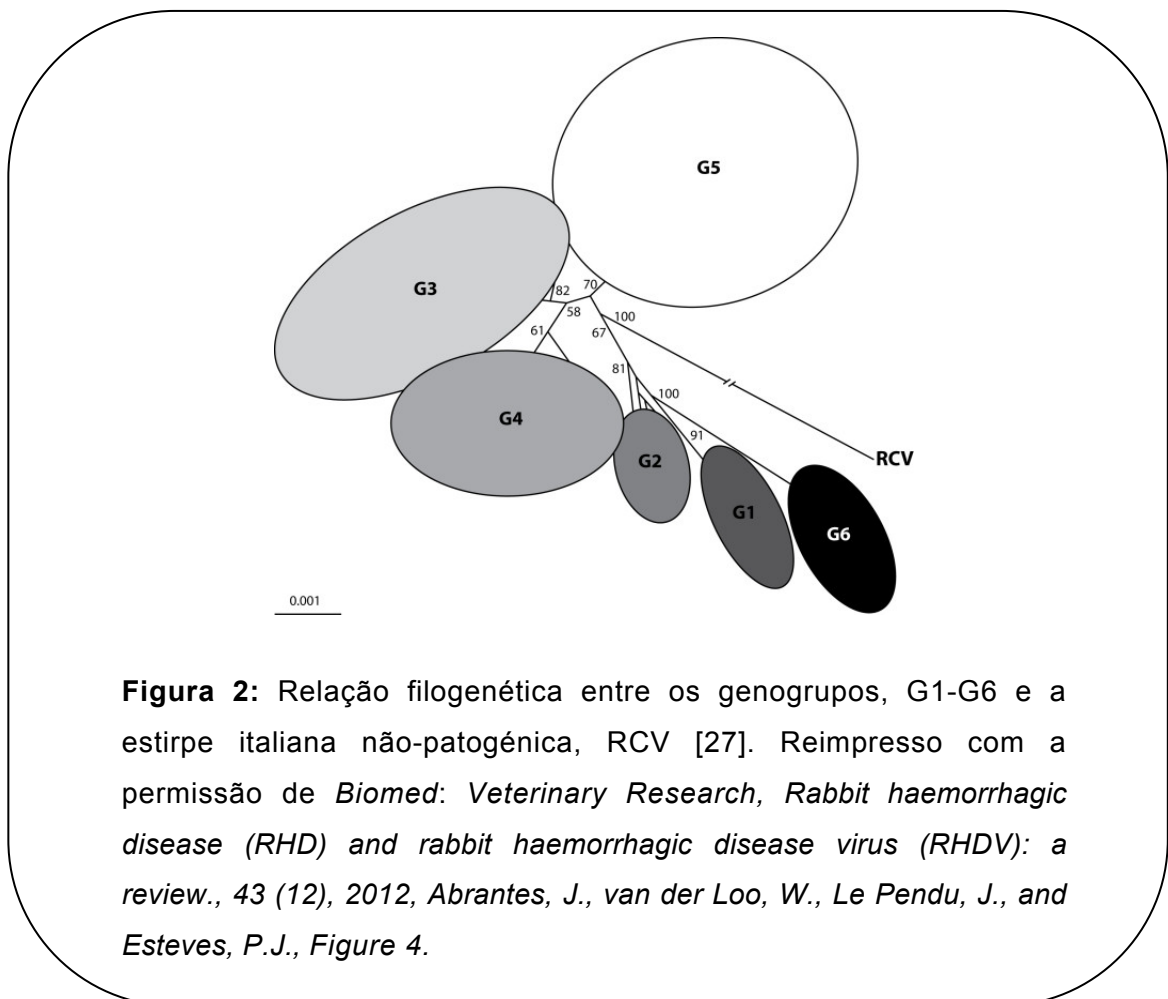
respetivamente, apenas diferenças de 10% e 6%, nos nucleótidos e aminoácidos [27]. Outros estudos mostraram ainda que a região com maior grau de variabilidade correspondia à porção C-terminal da proteína da cápside [54], a qual no vírus parece corresponder aos domínios C e E [53], onde a maior parte das diferenças entre isolados virais são detetadas e onde estão localizados os determinantes antigénicos mais relevantes [55-57].

#### **1.1.2.2.1. Estirpes Patogénicas do VDHC**

Em 1997, Nowotny publicou a primeira árvore filogenética, construída a partir de isolados de VDHC recolhidos entre 1981-1995 em 17 países. Esta análise mostrou que existe uma diferença clara entre o VDHC e o *EBHSV* como entidades filogenéticas e uma homologia entre 52,6-60%. Apesar da elevada homologia entre os vírus da DHC, foi possível identificar 3 ramos principais na árvore filogenética dos isolados de VDHC, que se associavam de acordo com o ano de recolha do isolado e não com o local geográfico do surto [45].

Em 1998, Le Gall, mostrou o mesmo padrão filogenético com isolados virais recolhidos de diferentes regiões francesas, durante o período de 1988 e 1995, tendo também estabelecido cronologicamente 3 genogrupos: G1, G2 e G3 [58]. Em estudos mais recentes (Figura 2) realizados com isolados recolhidos em 1993-2000, verificou-se que em França o G1 e o G2 haviam desaparecido e 3 novos genogrupos haviam surgido: o G4 que evoluiu do G3; G5, que aparece como um grupo independente, e o G6, o qual corresponde à primeira variante antigénica identificada por Capucci e coautores (1998) [57] e designada por VDHCa [53]. Apesar de mostrar a mesma patogenicidade que os outros isolados, esta variante apresenta alterações nas características genéticas e um perfil antigénico distinto. Esta aparece assim como um subtipo do VDHC comum, já tendo sido isolada em vários países e detetada em 1985 na China, onde se pensa ter surgido [53, 57, 59-61]. Em algumas regiões, estas variantes parecem estar a substituir as estirpes originais [61]. No caso da Península Ibérica, Muller e coautores (2009) identificaram 3 grupos de isolados de VDHC, designados ibéricos, IB1, IB2 e IB3. Curiosamente, estes

grupos estão agrupados separadamente, mas não se encontram longe das primeiras estirpes do G1. No entanto, são totalmente distintos das estirpes dos genogrupos, G2-G6, consolidando a hipótese de que o vírus evoluiu de uma forma independente desde a sua introdução na Península Ibérica, onde os Pirenéus constituem uma barreira natural à circulação dos coelhos e, subsequentemente, à dispersão do vírus [62]. Apesar do padrão de evolução do VDHC ser diferente dos outros países da Europa, as estirpes G1 encontradas na Península Ibérica parecem evoluir segundo um padrão temporal e não geográfico, tal como acontece com os outros genogrupos [62]. Esta estrutura temporal resulta provavelmente de marcada seleção positiva, imposta pelo reconhecimento do sistema imune adaptativo do hospedeiro. Tal foi confirmado pela deteção de codões selecionados positivamente e localizados nos determinantes antigénicos mais relevantes da cápside viral [5].



Interessantemente, em finais de 2010 foi detetada em França uma nova variante do VDHC com características de patogenicidade diferentes das classicamente descritas para a DHC [63], nomeadamente esta nova estirpe mostrava-se capaz de induzir morbilidade e mortalidade entre coelhos vacinados com o VDHC e coelhos jovens (idade inferior a 4 semanas). Outras características clínicas pareciam também diferir da DHC clássica, nomeadamente, em termos da duração da doença (ocorrência, frequente, da forma subaguda/crónica) e taxa de mortalidade (20-50% em cuniculturas; 80-90% no campo) [64, 65]. Esta nova variante disseminou-se rapidamente pelo país, tendo substituído quase completamente as estirpes clássicas de VDHC nas populações de coelhos selvagens e domésticos [64]. As análises filogenéticas mostraram que apesar de relacionado com o VDHC e a variante antigénica VDHCa, este vírus é distinto de ambos, apresentando uma homologia na sequência nucleotídica de 82,4%. Em relação, às estirpes não-patogénicas ou pouco patogénicas, esta variante apresentava uma homologia entre 80-82%. Esta nova variante do vírus foi, deste modo, designada por VDHC2 [64] e apesar de induzir mortalidade entre coelhos vacinados parece também induzir uma proteção cruzada parcial contra a infeção por VDHC [64, 65]. Em maio de 2011, foi detetada em Espanha [65] e em junho de 2011 em Itália. Curiosamente, em Itália, mais concretamente, na Sardenha, verificou-se que o VDHC2 não só foi responsável pela morte de coelhos europeus (*Oryctolagus cuniculus*) como também da lebre do cabo da Sardenha (*Lepus capensis mediterraneus*), evidenciando outra característica fenotípica do VDHC2 que difere do VDHC clássico, que apenas tem como hospedeiro o coelho europeu [66]. Em novembro de 2012 foi detetado em Portugal um surto de DHC, causado pela nova variante, já identificada em Espanha e França [67], o que mostra que na Península Ibérica os surtos epidémicos já não são causados apenas pelas estirpes do genogrupo 1, indicando que novas linhagens de VDHC estão a evoluir nesta área, contribuindo, consequentemente, para a diversidade viral.

#### 1.1.2.2.2. Estirpes Não-patogénicas do VDHC

Segundo a maior parte dos estudos, o VDHC terá resultado da mutação de uma estirpe não-patogénica, pré-existente, que já circulava na Europa antes da deteção do primeiro surto na China, em 1984 [5, 6, 45, 53]. A deteção de anticorpos específicos para o VDHC e de fragmentos de ARN em amostras de soro de coelho recolhidas entre 1955 a 1980 suportam essa hipótese [4, 6]. Provavelmente, esta estirpe não patogénica seria estreitamente relacionada ao VDHC, partilhando propriedades antigénicas e circulando assintomaticamente nas populações de coelhos. Efetivamente, vários autores já identificaram estirpes não-patogénicas relacionadas com o VDHC, mas com diferenças na patogenicidade, no tropismo do vírus e na sequência primária da proteína estrutural [6, 68-70]. Em 1996, Capucci e coautores identificaram uma estirpe não-patogénica de calicivírus de coelho e designaram-na de *rabbit calicivirus* (RCV). Estes autores verificaram que enquanto os isolados de VDHC apresentavam uma homologia de 98% entre si, o RCV apresentava 91,5% de homologia com os aminoácidos do VDHC. Adicionalmente, os coelhos infetados com o RCV eram aparentemente saudáveis, não apresentando lesões histopatológicas após a necropsia, sendo o intestino o órgão que mostrava maior carga viral [68]. Mostraram ainda, tal como outros autores, que algumas estirpes não-patogénicas são capazes de conferir proteção contra a DHC induzida pelo VDHC, o que pode explicar a baixa incidência da DHC em determinadas zonas da Austrália e Reino Unido [6, 68, 69, 71-75]. Em 2010, Strive e coautores confirmaram experimentalmente esta hipótese na Austrália, mostrando que ao infetar coelhos com a estirpe não patogénica, RCV-A1, estes eram capazes de produzir anticorpos que apresentavam uma reação cruzada com o VDHC e que os protegia da DHC, mas não da infeção [75]. Em 2013, a mesma autora mostrou que a proteção cruzada conferida pelo RCV-A1 não dependia do título de anticorpos específicos para o RCV-A1, mas do tempo que separa as duas infeções, demonstrando, deste modo, que a proteção cruzada contra a infeção causada por VDHC é transitória [76]. Esta proteção temporária concedida pelo RCV-A1 pode ainda ajudar a explicar a grande variabilidade observada no grau de

proteção que outras estirpes não-patogénicas conferem contra a infeção por VDHC [68, 75, 77].

Curiosamente, no Michigan (USA) foi encontrada uma nova variante do RCV, designada por *MRCV*, que apresentava uma patogenicidade de 32,5%, resultado que contrasta com os dados obtidos sobre as restantes estirpes não-patogénicas [78]. Esta apresentava uma homologia de 79% com o genoma do VDHC, estando filogeneticamente mais próxima das estirpes não-patogénicas do que das patogénicas [78, 79]. Todavia, não foi possível provar experimentalmente a patogenicidade desta variante [78]. É ainda relevante ser dito que para além da *RCV-A1* e *MRCV* já haviam sido detetadas mais duas variantes não-patogénicas, nomeadamente, a variante Ashington (Reino Unido) [6] e Lambay (Irlanda) [70].

Todos estes resultados evidenciam a importância do estudo das estirpes não-patogénicas na compreensão da história evolutiva e da origem do VDHC. No entanto, apesar de toda a informação recolhida, ainda não foi possível identificar uma mutação que pudesse explicar a mudança da forma não-patogénica para a patogénica. Sabe-se, contudo, que a recombinação do genoma do VDHC não é raro [80, 81], podendo ter desempenhado um papel na origem da estirpe virulenta. Efetivamente, em 2008, Forrester e coautores mostraram que a estirpe isolada em 1984, na China, evidenciava recombinação dos genes da cápside viral [81], o que sugere que este fenómeno esteve presente durante o momento de emergência das estirpes patogénicas de VDHC. No entanto, nem todas as estirpes patogénicas são descendentes desta estirpe [46], e apesar de a recombinação ocorrer com frequência, esta não parece ser transversal a todas as linhagens de VDHC [47]. Alguns estudos recentes têm tentado determinar, com base em análises filogenéticas, o momento em que as estirpes não-patogénicas e patogénicas surgiram [5, 47, 82]. No entanto, a informação recolhida não é consistente, provavelmente, porque nos vários estudos foram utilizados diferentes comprimentos de fragmentos da cápside. Deste modo, enquanto Kerr e coautores estabelecem o tempo do antepassado comum mais recente (TACMR) entre o VDHC e as estirpes não-patogénicas como sendo inferior a 550 anos e inferior a 150 anos para as estirpes patogénicas [47], Kinneer e Linde determinaram que o antepassado entre VDHC-estirpe não-patogénica



surgiu no final da década de 30s e o antecessor das estirpes patogénicas entre 1957-1976 [82]. Alda e coautores, tal como Kerr, posicionaram o TACMR para todas as estirpes do VDHC em 100 anos antes do surgimento do primeiro surto de DHC, ou seja, aproximadamente em 1884 [5]. O cenário mais plausível passa pelo surgimento do VDHC no início do século 20, tendo a doença sido documentada apenas em 1984, quando o comércio de coelhos se intensificou, e permitiu a dispersão do vírus [47]. Apesar de esta ser a explicação mais simplista, e que reflete os dados disponíveis, ainda é necessário explicar o facto de a doença só ter sido detetada em 1984. Recentemente, o surgimento da nova variante virulenta, VDHC2, [63, 65], com características genéticas e fenotípicas diferentes do VDHC clássico, reavivou a questão da emergência do vírus. De facto, os dados moleculares epidemiológicos recolhidos desde o surgimento do VDHC, não detetaram a ocorrência de tal alteração genética. Isto, aliado ao facto de ser pouco provável que um vírus de elevada virulência, como este, passasse despercebido durante tanto tempo numa espécie de interesse económico como o coelho, levou a que fosse proposta uma hipótese alternativa para o aparecimento do VDHC [64]. Esta aponta para a possibilidade do vírus ter evoluído numa outra espécie, que serviu de reservatório mas não era afetada pelo vírus, e que através de um salto de espécies, passou para o coelho [27, 64]. Para que esta hipótese seja, no entanto, validada é necessário confirmar a existência desta “espécie-reservatório” e, por conseguinte, identificá-la. Adicionalmente, não se pode excluir totalmente a hipótese do VDHC2 ter surgido de uma variante não-patogénica, uma vez que o conhecimento sobre as estirpes não-patogénicas continua a ser escasso.

#### **1.1.2.3. Propriedades do VDHC**

A capacidade do VDHC sobreviver em condições hostis no meio ambiente constitui um fator determinante na epidemiologia e controlo da doença. Este vírus resiste ao éter, clorofórmio e a soluções com pH 3 [3]. Não é inativado, após 2 horas de exposição, pelo Virkon<sup>®</sup> a 2% e pelo álcool a 70% [11], ou após exposição a 0,4% de formaldeído durante 1 hora a 37°C, ou durante 12

horas a 4°C [83]. No entanto, o vírus é inativado quando tratado com formaldeído a 0,4% durante 3h a 37°C ou durante 3 dias à temperatura ambiente [83]. Formaldeído a 1%, hipoclorito de sódio a 0,5% (ou lixívia comercial 10%), vanadina a 2%, hidróxido de sódio a 2% e hidróxido de cálcio a 4% [23, 83] mostraram-se também capazes de anular a atividade viral.

O VDHC é também resistente a uma gama alargada de temperaturas, conseguindo sobreviver sem perder infectividade em amostras de fígado durante 413 dias a -5°C, 560 dias a -20°C e 4,5 anos a -70°C [3]. É ainda resistente quando exposto a 50°C durante 1 hora, sendo também capaz de sobreviver à temperatura ambiente (20°C), em estado seco, durante 105 dias. Para além disso, é capaz de resistir em suspensão a 4°C, durante 225 dias (máximo testado) e a 60°C, durante 2 horas [84].

### **1.1.3. Transmissão da DHC**

A transmissão natural do VHDC pode ser feita pelas vias oral, nasal, conjuntival e parenteral, e ocorrer por contato direto ou indireto. Predominantemente acontece por contato direto com outros animais infetados ou suas excreções (fezes e urina), mas não é incomum acontecer por contato indireto com carcaças infetadas, água, comida ou qualquer outro material contaminado por secreções ou excreções de animais infetados [7, 41]. Esta também pode ser feita passivamente através de vetores de transmissão, nomeadamente, o homem e insetos, podendo estes últimos ter um papel importante na dispersão do vírus a longa distância [85].

No meio selvagem, a transmissão fecal-oral é provavelmente a mais importante. Acresce o facto de o vírus ser bastante resistente em ambiente hostil e ser capaz de manter a sua infectividade durante 1 mês em fezes e urina contaminadas [9, 23].

Nas cuniculturas, o contato com coelhos selvagens infetados parece ter alguma relevância na transmissão do vírus, já que muitas vezes os surtos de DHC em coelhos domésticos ocorrem em simultâneo com os surtos em coelhos selvagens. Adicionalmente, o papel dos insetos como veículo de transmissão do vírus entre cuniculturas, ou mesmo entre jaulas de coelhos

infetados e não infectados não deve ser descurado. Tal como Lenghaus e coautores evidenciaram, tanto o mosquito (*Culex annulirostris*) como as moscas (*Spilopsyllus cuniculi* e *Xenopsylla cunicularis*) são capazes de transmitir a doença aos coelhos [86]. McColl e coautores também provaram experimentalmente que a mosca (*Musca vetustissima*) é capaz de servir de vetor de transmissão do vírus entre coelhos infectados com VDHC e coelhos *naïve* [87]. O homem é igualmente um fator de transmissão importante quando não observa regras de manejo e biossegurança, como por exemplo, ao introduzir, animais infectados em jaulas onde o vírus não está presente, ou ao utilizar material ou equipamento contaminado. [7].

#### **1.1.4. Sinais Clínicos**

O coelho europeu é o hospedeiro natural do VDHC, sendo o único animal que morre de DHC [10]. Após a infecção, o tempo de incubação do vírus varia entre 24-48 horas ou no máximo 3 dias [88], podendo ser identificadas três formas distintas de doença, de acordo com o quadro clínico apresentado: hiperaguda, aguda e subaguda.

Na forma hiperaguda não existem sinais clínicos evidentes e os animais morrem repentinamente com a DHC, 6 a 36 horas após infecção, apresentando por vezes hematúria, hemorragias vaginais e nasais [88]. Normalmente, esta forma está presente no início de uma epidemia, em populações de coelhos domésticos ou selvagens *naïve*, isto é, que nunca tiveram contato com o VDHC [88].

Na forma aguda, altamente prevalente em áreas epidémicas, os sinais clínicos são visíveis pouco tempo antes da morte com DHC, que varia normalmente entre às 12 e 48 horas [41, 88]. Esses sinais clínicos incluem apatia, prostração, anorexia, febre (40-41°C), sinais neurológicos (convulsões, ataxia, paresia lateral e opistótono), não sendo incomum vocalizações antes da morte, bem como sinais respiratórios (dispneia e epistaxe), sinais oculares (lacrimação e hemorragias) e cianose das mucosas, orelhas e pálpebras [7, 41, 88]. Os animais que sobrevivem à fase aguda desenvolvem a forma subaguda ou crónica da DHC, exibindo frequentemente apatia, perda de peso

e icterícia severa. A morte pode ocorrer até poucas semanas depois da infecção ou os animais podem sobreviver à infecção. Estes animais são capazes de produzir anticorpos específicos para o VDHC que os protegem contra reinfeções [7, 88] e embora o título de anticorpos possa diminuir ao longo do tempo, é reforçado após uma nova infecção [89]. Este tipo de resposta clínica está normalmente associada à fase final das epidemias [12, 88].

Todos os coelhos, independentemente da idade, são passíveis de serem infectados pelo VDHC. Curiosamente, só os que apresentam idade superior a 4 semanas são suscetíveis de desenvolver doença [20, 41, 89]. Na verdade crias provenientes de fêmeas que não apresentam anticorpos anti-VDHC, são totalmente resistentes até às 4 semanas, havendo um aumento de suscetibilidade até às 8 semanas, idade a partir da qual os animais passam a ser totalmente suscetíveis à infecção viral [10, 89]. Estes coelhos muito jovens quando infectados desenvolvem uma forma subclínica de doença, ou seja não apresentam sinais clínicos, produzindo anticorpos anti-VDHC, que se revelam protetores contra a DHC em possíveis reinfeções [90].

#### **1.1.5. Lesões Macroscópicas e Microscópicas Caraterísticas da DHC**

Tipicamente a DHC é caraterizada por um quadro de hepatite aguda fulminante associada a coagulação intravascular disseminada (CID). A degenerescência hepatocelular grave, caraterística principal na patogenia da doença, deve-se, essencialmente, à infecção dos hepatócitos pelo vírus (o hepatócito é a célula-alvo de replicação viral), o qual também está presente nas células reticulo-epiteliais do fígado e baço, nos macrófagos da polpa vermelha e sinusoides do baço e nos macrófagos alveolares e intersticiais dos pulmões [91]. A falência hepática que se estabelece resulta em desequilíbrios diversos, nomeadamente em défice de fatores de coagulação (ex. V, VII, X) com consequente aumento do tempo da protrombina e trombina parcial ativada, níveis elevados de complexos de fibrina solúveis, entre outros, que poderá justificar, em parte, o desenvolvimento do quadro de coagulação intravascular disseminada, com estabelecimento de hemorragias petequiais ou difusas em vários órgãos, que culmina com a falência multiorgânica e,

consequentemente, morte dos coelhos com DHC [92, 93]. A tabela seguinte resume as lesões macroscópicas e microscópicas observadas nos coelhos mortos com a DHC (Tabela 1).

Tabela 1 – Lesões macroscópicas e microscópicas [7, 27, 41, 88, 92, 93]

| Órgão           | Macroscópicas                                                                                                                                                                                  | Microscópicas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Fígado</b>   | <p>Perda de consistência - friável</p> <p>Ligeiro aumento, com lobulação marcada</p> <p>Alterações de cor (amarelo pálido/acinzentado)</p> <p>Superfície, por vezes, ligeiramente granular</p> | <p>Degenerescência/necrose hepatocelular grave e generalizada (vacuolização extensa do citoplasma; núcleo – cariorréxis, picnose, cariólise)</p> <p>Infiltrado de granulócitos nos espaços porta, sinusoides e zonas interlobulares</p> <p>Ativação das células de Kupffer</p> <p>Esteatose microvascular</p> <p>Depleção dos grânulos de glicogénio</p> <p>Alterações graves na estrutura das mitocôndrias</p> |
| <b>Pulmões</b>  | <p>Congestão e edema pulmonar</p> <p>Hemorragias multifocais difusas e petequiais</p>                                                                                                          | <p>Hemorragias interalveolares e perivasculares</p> <p>Microtrombos nos capilares alveolares</p> <p>Edema alveolar</p> <p>Cariorréxis nos <i>BALT</i> (<i>Bronchus associated lymphoid tissue</i>)</p>                                                                                                                                                                                                          |
| <b>Traqueia</b> | <p>Hiperemia da mucosa</p> <p>Hemorragias difusas ou petequiais</p> <p>Lúmen com fluido espumoso e sanguinolento</p>                                                                           | <p>Hiperemia da mucosa traqueal</p> <p>Infiltrados leucocitários</p> <p>Calcificação da cartilagem traqueal</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

|                                |                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                      |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Baço</b>                    | <p>Coloração vermelho escuro matizado</p> <p>Esplenomegalia e hiperemia</p>                   | <p>Necrose hialina da polpa vermelha</p> <p>Ocasional cariorréxis nos folículos e linfopenia</p> <p>Hemossiderose</p> <p>Artérias foliculares com microtrombos hialinos</p>                                          |
| <b>Rins</b>                    | <p>Aumento e hiperemia</p> <p>Coloração vermelho escuro matizado</p>                          | <p>Microtrombos hialinos nos capilares glomerulares</p> <p>Hemorragias na medula renal e nos glomérulos</p> <p>Degenerescência do epitélio tubular</p> <p>Infiltrados linfocitários</p> <p>Dilatação dos túbulos</p> |
| <b>Trato gastro-intestinal</b> | <p>Gastrite catarral com lesões na mucosa</p> <p>Hemorragias – subserosa</p>                  | <p>Degenerescência das criptas do intestino delgado e consequente atrofia das vilosidades intestinais</p>                                                                                                            |
| <b>Coração</b>                 | <p>Petéquias no miocárdio</p>                                                                 | <p>Necrose focal do miocárdio</p> <p>Hemossiderose</p>                                                                                                                                                               |
| <b>Gânglios linfáticos</b>     | <p>Hiperplasia dos gânglios linfáticos mesentéricos</p> <p>Ocasionalmente, hiperemia</p>      | <p>Cariorréxis e depleção dos linfócitos, nos restantes gânglios linfáticos</p>                                                                                                                                      |
| <b>Timo</b>                    | <p>Hemorragias difusas ou petequias</p>                                                       | <p>Apoptose dos linfócitos</p>                                                                                                                                                                                       |
| <b>Sistema nervoso central</b> | <p>Congestão dos vasos corticais</p> <p>Hiperemia</p> <p>Hemorragias ocasionais no córtex</p> | <p>Edema intramielínico e microtrombos</p> <p>Ocasionalmente, encefalomielite não-purulenta com infiltrados linfocitários</p>                                                                                        |

### 1.1.6. Métodos de Diagnóstico

Normalmente, o diagnóstico presuntivo da DHC é baseado em observação clínica e nas lesões patológicas. No entanto, técnicas complementares podem ser usadas para confirmar a presença do VDHC nos animais infectados. A microscopia eletrônica (contraste negativo e imunodeteção) de homogeneizados de pulmão, baço e essencialmente fígado (o órgão-alvo de replicação onde se encontra a maior carga viral) foi utilizada, nos primeiros estudos, para detetar as partículas virais que apresentavam uma morfologia consistente com o VDHC, tendo tido um papel importante na caracterização morfológica do vírus [83, 94-96].

O primeiro teste desenvolvido para a deteção do VDHC foi o teste de hemaglutinação (THA), reportado inicialmente por Liu em 1984 [1, 31, 97]. Este baseia-se na capacidade que o vírus tem em aglutinar com os glóbulos vermelhos humanos do tipo “0”. Apesar de constituir um método de diagnóstico rápido, este revelou-se pouco sensível e específico [3, 7, 41, 97]. Por conseguinte, tornou-se necessário recorrer a técnicas imunológicas, que são manifestamente mais sensíveis na deteção do vírus, como é o caso da imunofluorescência direta/indireta, imunoprecipitação ou imunohistoquímica. Estas, contudo, apresentam por vezes alguma inespecificidade [7, 94, 98], o que levou a que muitos autores optassem pela *sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (sandwich-ELISA)* [10, 56, 99], embora, o método efetivamente mais sensível e específico para detetar o VDHC seja a *reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)*, que deteta ARN viral [6, 39, 100].

Para além da deteção do vírus é também possível avaliar indiretamente a sua passagem ou presença no organismo, nomeadamente através da deteção de anticorpos específicos para o VDHC no sangue ou em suspensões de fígado de animais mortos. Esta avaliação pode ser feita pelo teste de inibição da hemaglutinação (TIHA), *ELISA* indireta ou de competição (teste mais sensível e reproduzível que o TIHA), imunofluorescência, teste de imunodifusão ou *western blotting* [7, 10, 41].

### 1.1.7. Patogenia da DHC

A falta de um sistema de cultura eficaz na proliferação do VDHC tem limitado o estudo sobre a patogenia da doença. Consequentemente, toda a informação recolhida neste campo, nomeadamente, sobre os mecanismos patogénicos associados à DHC, tem sido obtida indiretamente através de ensaios *in vivo*.

Nos primeiros estudos feitos sobre a DHC houve autores que sugeriram que a viremia era responsável pelas lesões histopatológicas, e que estas por sua vez levavam à falência multiorgânica que terminava com a morte dos animais infetados. Estes também observaram que o vírus tinha preferência pelos endotélios vascular e reticular, já que este estava presente no citoplasma das células parenquimatosas e endoteliais degenerescentes do fígado e pulmão. O dano causado ao sistema vascular daria supostamente início à coagulação sanguínea intravascular e de um modo secundário à fibrinólise, resultando no desenvolvimento da CID [3].

Um conjunto de estudos seguintes evidenciou claramente o tropismo do VDHC pelos hepatócitos, identificando-os como a célula-alvo de replicação viral [42, 88, 94, 101-103]. O número de hepatócitos infetados, e a gravidade da lesão, aumenta claramente com o tempo da infeção o que levou a que fosse sugerido que a necrose hepática massiva desenvolvida pelos animais infetados fosse essencialmente resultado do efeito citopático direto da replicação viral [88, 102]. Efetivamente, a hepatite fulminante é uma característica consistente e transversal nesta doença, constituindo marca patognómica da DHC.

Para além de apresentarem um quadro de hepatite fulminante, os animais também desenvolvem coagulação intravascular disseminada. Plassiart e coautores [92] mostraram que 30 horas após a infeção experimental de coelhos com o VDHC, estes começavam a evidenciar sinais de CID, nomeadamente, redução do número de trombócitos associada ao aumento do tempo de protrombina e de trombina parcial ativada, diminuição da atividade dos fatores de coagulação (V, VII, X) e aumento dos níveis de complexos solúveis de fibrina. Mostraram ainda que estas alterações hematológicas surgiam em simultâneo com o início da degenerescência hepatocelular, o que



os levou a sugerir que a CID poderia ser despoletada pela libertação maciça de tromboplastina como resultado de lesões hepáticas severas (via extrínseca de ativação da coagulação). De facto, a CID não só era desencadeada pela hepatite, como intensificada por esta, já que apenas lesões hepáticas severas estavam associadas a alterações dramáticas da coagulação. Com base nestes dados, Plassiart e coautores propuseram a hipótese de que a degenerescência hepatocelular inicial seria causada pela replicação viral, e que esta por sua vez desencadearia a CID, a qual, a seu termo, acabaria por agravar as lesões hepáticas. Paralelamente, estes autores não excluíram a possibilidade de haver uma indução periférica adicional da CID, devido a lesões extensas do endotélio (via intrínseca de ativação da coagulação), resultantes da replicação viral, já que o vírus também havia sido detetado nas células endoteliais [94]. Também Ueda, assente em resultados histológicos e hematológicos obtidos após a infeção de coelhos com VDHC, sugeriu que a hepatite fulminante induz a CID e subsequentemente as hemorragias nos vários órgãos [93].

Alonso e coautores mostraram que a morte celular observada no fígado após infeção com o VDHC era resultado de apoptose celular, verificando que, apesar de afetar maioritariamente os hepatócitos, este processo também era visível em macrófagos e células endoteliais. Acresce o facto de os três tipos celulares apresentarem marcação para o VDHC. Isto é, a indução da apoptose parecia estar relacionada com a presença do vírus. Por outro lado, a apoptose dos monócitos intravasculares e células endoteliais foi observada juntamente com o aparecimento de trombos de fibrina nos vasos sanguíneos. Estes dados levaram-nos a inferir que a apoptose destas populações celulares poderia constituir o primeiro passo na patogenia da CID, já que zonas com elevado grau de apoptose celular são conhecidas por apresentar uma atividade procoagulante elevada [101]. Jung e colaboradores também avaliaram, por *TUNEL* (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*), a presença do VDHC e apoptose celular no fígado de animais infetados, tendo verificado que 12 horas após infeção já existiam células apoptóticas e infetadas com VDHC nas zonas centriacinares, as quais subsequentemente se espalharam para as zonas periacinares, aumentando em número. Contudo verificou-se que as células infetadas excediam em número as células

apoptóticas, corroborando assim a associação entre a infecção por VDHC e a apoptose dos hepatócitos [104].

Tal como Alonso, Ramiro-Ibáñez e coautores demonstraram (por imunohistoquímica/dupla marcação) que o VDHC não só tem tropismo para os hepatócitos, causando lesão hepática grave, como para os macrófagos, sendo detetado desde as 12 horas de infecção. Por conseguinte, foi possível detetarem vírus nas células de Kupffer, nos macrófagos alveolares e intersticiais do pulmão, macrófagos da polpa vermelha e sinusoides do baço e monócitos circulantes. No pulmão, os macrófagos infetados apresentavam lesões características de apoptose e localizavam-se, essencialmente, nos infiltrados inflamatórios, onde não era incomum observar trombos de fibrina nas arteríolas de médio e pequeno tamanho. Os monócitos intravasculares foram detetados em órgãos gravemente lesados mas também em órgãos não afetados, sendo que a presença do vírus nos monócitos circulantes foi associada a alterações na superfície do endotélio. Estes apareciam sistematicamente agregados às células endoteliais ou à parede dos vasos e, por vezes, próximos de vasos dilatados com trombos. Estes dados sugeriram que o VDHC também apresentava tropismo para os vasos sanguíneos, tal como evidenciado anteriormente, levando a que os autores propusessem duas possíveis explicações para o dano endotelial observado: o vírus rapidamente infeta as células endoteliais induzindo a apoptose, ou os danos no endotélio resultam de um mecanismo indireto relacionado com a agregação dos monócitos infetados à superfície endotelial dos vasos sanguíneos, podendo a secreção de citocinas pelos monócitos e a expressão de moléculas procoagulantes no endotélio serem os passos seguintes da patofisiologia da CID. A presença de monócitos intravasculares em apoptose associados a trombos de fibrina nos vasos sanguíneos também pode ter um papel importante no desenvolvimento da CID, tal como Alonso sugeriu [91, 101].

Kimura e coautores utilizando a técnica de hibridização *in situ* detetaram a presença de ARN de cadeia positiva e ARN de cadeia negativa não só no citoplasma dos hepatócitos, mas também nas células de *Kupffer*, nos macrófagos esplénicos e macrófagos alveolares. Estes resultados, não só corroboram os dados anteriores, como são sugestivos de replicação viral nestas células do sistema imune, até então não documentada [91, 101-103]. O

facto de a via de entrada natural do VDHC ser, em parte, nasal levou os autores a sugerirem que a presença do vírus nos macrófagos alveolares associada à sua proximidade com a corrente sanguínea podia ter um papel importante na disseminação inicial do vírus, sendo que, mais tarde, quando o vírus chega ao fígado, as células de *Kupffer* possam ter um papel importante na disseminação viral para os outros órgãos [102].

Mais recentemente, Ferreira e colaboradores mostraram que para além da degenerescência hepatocelular, a infeção de coelhos com VDHC induz também uma leucopenia severa, 6 horas antes da morte dos animais, que inclui diminuição de heterófilos e linfócitos circulantes [105].

Estudos mais recentes sobre os mecanismos moleculares patogénicos associados à hepatite fulminante mostraram que 24-36 horas após a infeção com VDHC os níveis das transaminases hepáticas, nomeadamente, aspartato aminotransferase (AST) e a alanina aminotransferase (ALT) aumentavam abruptamente, mantendo-se elevados até à morte dos animais com DHC [105-109], assim como foi observada colestase, expressa pelo aumento de bilirrubina, e hipoglicemia [105, 107]. Túñon e coautores sugeriram que a hipoglicemia podia dever-se ao défice de gliconeogénese e da degradação da insulina pelo fígado gravemente lesado [106]. Ferreira e coautores, por outro lado, mostraram que as alterações bioquímicas, nomeadamente das transaminases hepáticas, estavam correlacionadas com alterações ultraestruturais das mitocôndrias dos hepatócitos, e consequentemente, com o nível de lesão hepática [108]. Sánchez-Campos e coautores também verificaram desequilíbrios no estado redox do fígado de coelhos infetados com VDHC, uma vez que se registou uma diminuição da concentração de glutathione (antioxidante), um aumento do rácio glutathione oxidada e reduzida e ainda uma diminuição progressiva da enzima antioxidante, superóxido dismutase (SOD). Estes resultados sugeriram que a falta destas enzimas leva à acumulação de espécies reativas de oxigénio (ERO) que por sua vez provocam danos mitocondriais severos, com libertação de citocromo c para o citoplasma e ativação da apoptose celular por via das caspases [107]. Paralelamente, verificaram que 24 horas após infeção estes animais apresentavam um aumento significativo do fator de transcrição nuclear *NF-kB*, da enzima responsável pela produção de óxido nítrico (ON), a óxido nítrico

sintetase (ONS), e às 36 horas aumento dos níveis de *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (*TNF- $\alpha$* ). Foi também referido que o *stress* oxidativo gerado pelas ERO induz a ativação do fator de transcrição nuclear *NF- $\kappa$ B*, o qual por sua vez está envolvido na expressão de vários genes pró-inflamatórios, como a expressão de ONS e *TNF- $\alpha$*  (citocina pró-inflamatória conhecida por induzir apoptose celular). Paralelamente, estes autores verificaram ainda que após infeção com VDHC ocorre uma diminuição drástica do *hepatocyte growth factor* (*HGF*) e do seu recetor *c-met*, fatores que têm um papel importante na resposta regenerativa do fígado [107].

García-Lastra e coautores, por sua vez, mostraram que a infeção com o VDHC parece promover as vias de sinalização envolvidas na lesão hepática em detrimento das vias responsáveis pela regeneração tecidular. Mais concretamente mostraram que a apoptose dos hepatócitos estava associada ao aumento da atividade da caspase-3 e proteólise da *Poly ADP ribose polymerase* [*PARP*, enzima nuclear que é ativada quando há fragmentação do ácido desoxirribonucleico (ADN)]. Sugeriram ainda que a ativação e expressão continuada de *c-Jun N-terminal kinase* (*JNK*) podiam contribuir de forma determinante para a lesão hepática mediada pelo VDHC. Acresce o facto da expressão continuada de *JNK* contribuir para a apoptose celular mediada pelo *TNF- $\alpha$* , o qual apresentou um aumento significativo e continuado no fígado. Em contrapartida, foi sugerido que a falta de ativação do *signal transducers and activators of transcription 3*, *STAT3* (promove a resposta antiviral e regeneração, entre outras funções), provavelmente mediada pelo aumento da *suppressor of cytokine signaling 3* (*SOCS3*, inibidor endógeno da via de sinalização, *STAT*), pode contribuir para a inibição da resposta regenerativa [109].

Apesar destes resultados terem prestado um contributo importante na melhor compreensão da patogenia da DHC, muitos outros estudos são necessários para completar a informação e clarificar o papel do VDHC no desenvolvimento da doença.

### 1.1.8. Mecanismos de Resistência à DHC

Um dos aspetos interessantes da DHC prende-se com o facto dos coelhos jovens (menos de 4 semanas) serem totalmente resistentes ao mesmo calicivírus que é capaz de matar, em menos de 3 dias, cerca de 90% dos coelhos adultos infetados [20, 41, 110]. Esta resistência está descrita desde a ocorrência dos primeiros surtos da doença em 1984 [1]. Acresce ainda o facto da suscetibilidade à DHC aumentar com a idade, podendo distinguir-se 3 grupos: o grupo totalmente resistente (menos de 4 semanas), o grupo “janela” (4-8 semanas, com aumento progressivo da suscetibilidade) e o grupo totalmente suscetível (mais de 8 semanas) [89]. No entanto, apesar de conhecido há três décadas, o fenómeno não está bem caracterizado sob o ponto de vista dos seus mecanismos moleculares. Alguns dos estudos realizados neste âmbito mostraram que os coelhos jovens infetados não apresentam sinais clínicos e desenvolvem uma doença subclínica, caracterizada por uma diminuição abrupta e transitória dos heterófilos circulantes, e por lesões hepáticas moderadas e focais, associadas ao aumento moderado e transitório da AST e ALT e à presença de infiltrados inflamatórios [110-113]. Em contraste, os coelhos adultos desenvolvem uma leucopenia grave, que surge 12-18 horas após a infeção e acompanha a hepatite necrótica generalizada a qual conduz à morte do animal [105]. A resposta inflamatória presente no fígado dos coelhos adultos e dos jovens infetados também é diferente. Enquanto os coelhos jovens apresentam alguns focos inflamatórios constituídos inicialmente por heterófilos, e numa fase mais avançada por células mononucleares (linfócitos e macrófagos), os coelhos adultos apresentam infiltrados de heterófilos dispersos por todo o órgão e particularmente evidentes nas zonas de necrose [111, 114]. Os coelhos jovens infetados produzem anticorpos específicos contra o VDHC, os quais se revelaram protetores contra o vírus numa reinfeção; a transferência passiva desses anticorpos para coelhos adultos *naïve* confere proteção contra a infeção pelo VDHC [90]. A este propósito nós postulámos que o tipo de interação entre o VDHC e o sistema imune do hospedeiro pode condicionar a diferente forma de expressão clínica da DHC nos coelhos jovens e adultos. Ruvoën-Clouet e coautores propuseram que a resistência/suscetibilidade estará relacionada com a

diferente expressão do recetor viral nos tratos respiratório e intestinal do hospedeiro, já que as vias naturais de entrada do vírus são oral/nasal. Estes autores mostraram que o agente viral se liga aos antígenos dos grupos sanguíneos ABO, os quais estão presentes na mucosa do trato respiratório e intestinal dos coelhos adultos. Estes autores mostraram ainda que o vírus não aglutinava com células do cordão umbilical humano, sugerindo que o recetor do vírus nestas células estava ausente ou era pouco expresso. No caso dos coelhos jovens, foi aventada uma explicação semelhante, na medida em que foi detetada uma ligação mais fraca de partículas virais às mucosas, digestiva e respiratória, sugerindo que a ausência ou baixa expressão dos antígenos ABO fosse em parte responsável pela resistência dos coelhos jovens à DHC [115]. Resultados mais recentes revelaram que apesar dos carboidratos terem um papel facilitador na infeção das células epiteliais dos tratos respiratório e intestinal, outros fatores de ligação ou outros recetores podem estar a exercer um papel importante a nível epitelial, já que a baixa expressão destes recetores (carboidratos) nos tratos de entrada do vírus apenas confere proteção parcial contra a infeção [116]. Por outro lado, nós mostrámos que a resistência dos coelhos jovens não pode ser apenas explicada simplesmente por expressão diferencial do recetor viral nas mucosas, uma vez que os animais jovens inoculados por via intramuscular continuam a não mostrar sinais clínicos da doença [113]. Observámos ainda que coelhos inoculados vias intranasal e oral exibem um grau de lesão hepática equivalente ao observado após a infeção por via intramuscular. Acresce que os coelhos jovens infetados apresentam apenas alguns hepatócitos com lesões semelhantes à dos hepatócitos encontrados nos coelhos adultos infetados [113], o que sugere que a disparidade na resposta à infeção pelo VDHC, observada entre coelhos jovens e adultos, também poderá ser explicada pela fraca expressão de recetores virais na membrana dos hepatócitos dos coelhos, quando ainda são jovens. Estes recetores, no entanto, não pertencem ao grupo dos antígenos do sistema ABO tal como demonstrado por Ruvoën-Clouet [115].

### 1.1.9. Controlo e Prevenção

Numa situação de emergência, a inoculação de soro hiperimune (transferência passiva de anticorpos anti-VDHC) confere proteção a curto prazo (1 mês aproximadamente), evitando a morte dos coelhos com DHC [117]. No entanto, esta imunização passiva é ineficaz no caso de os animais já expressarem sinais clínicos de doença. Por conseguinte, o controlo e a prevenção através da aplicação de medidas de biossegurança e imunoprevenção, nomeadamente, vacinação, são de extrema importância. Contudo, estas medidas só podem ser aplicadas de forma eficaz em coelhos domésticos e coelhos selvagens em cativeiro, uma vez que a sua aplicação na vida selvagem é ainda economicamente e logisticamente impraticável [27, 41]. Devido ao facto de não existirem sistemas de cultura eficazes na produção do vírus, as vacinas comerciais disponíveis contra o VDHC são produzidas a partir de homogeneizados de tecidos de coelhos infetados experimentalmente, seguida pela inativação química do vírus ( $\beta$ -propiolactona, formaldeído, etilenodiamina) [84, 118]. Os coelhos podem ser vacinados após o desmame e a proteção dura normalmente 6 meses, sendo recomendável que os animais sejam vacinados 2 vezes ao ano [41, 117]. No entanto, este tipo de vacina apresenta riscos inerentes à sua produção (segurança biológica e resíduos contaminantes) e inconvenientes relacionados com o manuseamento dos animais, nomeadamente, com o bem-estar animal, que têm de ser levados em conta. Novos estudos têm, deste modo, sido desenvolvidos com o objetivo de utilizar a proteína estrutural do VDHC, VP60, como antígeno e criar uma vacina de subunidades contra o vírus. Vários sistemas de expressão heterogêneos ou de vírus recombinantes tem sido, desta forma, utilizados na produção de VP60 recombinante, como por exemplo, *Escherichia coli* [49], leveduras [119, 120], plantas [121, 122], larvas de insetos [123], cultura de células de inseto [40, 124, 125] e vírus recombinantes (p.e.: adenovírus) [126-128]. A maioria destes sistemas mostrou ser imunogénico e capaz de conferir proteção contra uma dose letal de VDHC. No entanto, o alto custo e baixo rendimento, associado à falta de imunogenicidade oral destes sistemas, tem limitado o seu uso na produção comercial de vacinas recombinantes contra o VDHC [129, 130]. Mais recentemente, uma nova geração de vacinas está a

ser estudada no combate à doença, nomeadamente, vacinas de ADN recombinante. Este tipo de imunização recorre à expressão do antígeno *in vivo*, o qual é apresentado ao sistema imune de forma a induzir imunidade contra o antígeno específico, neste caso a VP60. Comparativamente, às vacinas de subunidades e vacinas inativadas, as de ADN apresentam várias vantagens, tais como alta estabilidade, fácil preparação e mais segurança para hospedeiros imunossuprimidos [131]. Em ambos os estudos reportados por Qui [129] e Yuan [131] esta vacina mostrou imunogenicidade e conferiu proteção aos coelhos infetados com o VDHC. Apesar de ainda serem necessários mais estudos, os resultados preliminares realçam o potencial das vacinas ADN recombinantes e, consequentemente destacam a sua utilização como uma nova estratégia de imunização no controlo à DHC.

Paralelamente à vacinação é necessário aplicar medidas de biossegurança com a finalidade de evitar a introdução do VDHC nas cuniculturas e limitar a sua propagação. Estas medidas incluem a vigilância (evitar contato com coelhos selvagens; sacrificar animais moribundos e suspeitos de DHC, tendo o cuidado de eliminar as carcaças e material contaminado de forma adequada), higiene (lavagem regular das jaulas e recintos onde estão alojados os animais; usar ração e não erva/fenos), desinfecção (desinfetar as jaulas, material e recinto onde tenha havido um surto, com formaldeído a 10%, seguido de hidróxido de sódio a 2%) e quarentena (coelhos que cheguem a um novo local devem ser seronegativos para o VDHC e devem ser colocados em quarentena 2 semanas, aproximadamente; animais sentinela devem ser colocados no mesmo espaço) [41]. Deve-se ainda evitar o contato com insetos (vetores de transmissão), pela colocação de redes nas janelas, portas e entradas de ventilação [132].



## **1.2. Estrutura da tese**

O objetivo geral desta tese foi o de contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos que conferem resistência ou suscetibilidade à infecção por VDHC.

No presente capítulo foi dada uma visão global sobre o conhecimento científico acumulado e publicado internacionalmente sobre a DHC. Nos capítulos que se seguem (2 ao 7) é apresentado o trabalho experimental desenvolvido para atingir o objetivo da tese, bem como, as respectivas discussões. No último capítulo (8) é apresentada uma discussão geral que integra todas as conclusões enunciadas nos capítulos 2 ao 7 com trabalhos publicados por outros autores, bem como, uma conclusão geral e algumas perspectivas futuras, nesta área de investigação.

Os métodos de purificação do VDHC revelaram-se complexos e morosos e, por conseguinte, no capítulo 2 visou-se desenvolver um método simples e rápido para o isolamento do vírus, que pudesse ser utilizado em novos ensaios. Em trabalhos anteriores já se havia mostrado que para além da hepatite fulminante, outros mecanismos podiam estar a contribuir para o rápido decurso da DHC, nomeadamente, a leucopenia severa já descrita. Deste modo, o trabalho relatado no capítulo 3 teve como objetivo investigar as alterações ocorridas em subpopulações leucocitárias (macrófagos, linfócitos B e T) do fígado e do baço de coelhos adultos infetados com o VDHC, e estabelecer uma comparação entre esses dados e o grau de lesão hepática causada pelo vírus. Estes resultados levaram a que se decidisse estudar a cinética de subpopulações leucocitárias (macrófagos, linfócitos B, T, TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>) no fígado e baço de coelhos jovens infetados com VDHC, bem como, quantificar várias citocinas pró e anti-inflamatórias no soro (capítulo 4). Os nossos resultados sugeriram que os coelhos jovens, resistentes à infecção, desenvolvem uma resposta imune diferente, comparativamente, à desenvolvida pelos coelhos adultos suscetíveis. As diferentes respostas inflamatórias evidenciadas pelos coelhos adultos e jovens infetados levaram-nos a considerar se os mecanismos reguladores da inflamação, como os mediados pelas células T reguladoras (Treg) estarão ou não alterados após infecção. Deste modo, no capítulo 5 quantificaram-se as células Treg e as

citocinas *interleukin 10* (IL-10) e *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) (citocinas que podem ser produzidas pelas Treg e que podem contribuir para resposta anti-inflamatória) em coelhos jovens (resistentes) e coelhos adultos (suscetíveis) após infecção com o VDHC. Por esse motivo, no capítulo 6, decidiu-se avaliar o efeito que a imunossupressão possa ter na resistência dos coelhos jovens à infecção por VDHC. Outro mecanismo que pode contribuir para a resistência dos coelhos jovens ou suscetibilidade dos coelhos adultos à infecção é a expressão diferencial do recetor viral no fígado. Por esse motivo, no capítulo 7, foi avaliada a natureza e expressão do recetor viral na membrana dos hepatócitos de coelhos jovens e adultos.

### 1.3. Referências Bibliográficas

- 1 Liu , S.J., Xue, H.P., Pu, B.Q., and Qian, N.H. (1984) A new viral disease in rabbit. *Anim Husb Vet Med* 16, 253-255
- 2 Forrester, N.L., Abubakr, M.I., Abu Elzein, E.M., Al-Afaleq, A.I., Housawi, F.M., Moss, S.R., Turner, S.L., and Gould, E.A. (2006) Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease virus strains from the Arabian Peninsula: did RHDV emerge simultaneously in Europe and Asia? *Virology* 344 (2), 277-282
- 3 Xu, W. (1991) Viral haemorrhagic disease of rabbits in People's Republic of China - epidemiology and virus characterisation. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 10 (2), 393-408
- 4 Rodák, L., Smíd, B., Valícek, L., Veselý, T., Stepanek, J., Hampl, J., and Jurak, E. (1990) Enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies to rabbit haemorrhagic disease virus and determination of its major structural proteins. *J Gen Virol* 71 (5), 1075-1080
- 5 Alda, F., Gaitero, T., Suarez, M., Merchan, T., Rocha, G., and Doadrio, I. (2010) Evolutionary history and molecular epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus in the Iberian Peninsula and Western Europe. *BMC Evol Biol* 10, 347
- 6 Moss, S.R., Turner, S.L., Trout, R.C., White, P.J., Hudson, P.J., Desai, A., Armesto, M., Forrester, N.L., and Gould, E.A. (2002) Molecular epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus. *J Gen Virol* 83 (10), 2461-2467
- 7 Mitro, S. and Krauss, H. (1993) Rabbit hemorrhagic disease: a review with special reference to its epizootiology. *Eur J Epidemiol* 9 (1), 70-78
- 8 Cancellotti, F.M. and Renzi, M. (1991) Epidemiology and current situation of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome in Italy. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 10 (2), 409-422
- 9 Morisse, J.P., Le Gall, G., and Boilletot, E. (1991) Hepatitis of viral origin in *Leporidae*: introduction and aetiological hypotheses. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 10 (2), 269-310
- 10 Rodák, L., Smid, B., and Valicek, L. (1991) Application of control measures against viral haemorrhagic disease of rabbits in the Czech and Slovak Federal Republic. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 10 (2), 513-524

- 11 Gorski, J., Mizak, B., and Chrobocinska, M. (1994) Control of viral haemorrhagic disease of rabbits in Poland. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 13 (3), 881-891
- 12 Loliger, H.C. and Eskens, U. (1991) Incidence, epizootiology and control of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome in Germany. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 10 (2), 423-434
- 13 Peschev, R., Petkov, A., Belemezov, P., Mitov, B., Bostandzhieva, R., and Lyutskanov, M. (1989) An acute, contagious disease of domestic rabbits accompanied by a hemorrhagic syndrome. *Vet Sb* 87 34-36
- 14 Henriksen, P., Gavier, D., and Elling, F. (1989) Acute necrotising hepatitis in Danish farmed hares. *Vet Rec* 125 (19), 486-487
- 15 Boujon, C.E., Gafner, F.R., and Bestetti, G.E. (1989) Die "Infektiöse Nekrotisierende Hepatitis" des Kaninchen. Erste Fälle in der Schweiz - Schweiz. *Arch Tierheilk* 131, 71-76
- 16 Argüello, J.L., Llanos, A., and Pérez, L.I. (1988) Enfermedad hemorrágica del conejo en España. *Med Vet* 5, 645-650
- 17 Anonymous (1989) Doença hemorrágica a vírus do Coelho em Portugal. *Rev Port Ciênc Vet* 84, 57-58
- 18 Villafuerte, R., Calvete, C., Blanco, J.C., and Lucientes, J. (1995) Incidence of viral hemorrhagic disease in wild rabbit populations in Spain. *Mammalia* 59 (4), 651-660
- 19 Cooke, B.D. (2002) Rabbit haemorrhagic disease: field epidemiology and the management of wild rabbit populations. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 21 (2), 347-358
- 20 Fuller, H.E., Chasey, D., Lucas, M.H., and Gibbens, J.C. (1993) Rabbit haemorrhagic disease in the United Kingdom. *Vet Rec* 133 (25-26), 611-613
- 21 Chasey, D. (1994) Possible origin of rabbit haemorrhagic disease in the United Kingdom. *Vet Rec* 135 (21), 496-499
- 22 Gregg, D.A. and House, C. (1989) Necrotic hepatitis of rabbits in Mexico: a parvovirus. *Vet Rec* 125 (24), 603-604
- 23 Gregg, D.A., House, C., Meyer, R., and Berninger, M. (1991) Viral haemorrhagic disease of rabbits in Mexico: epidemiology and viral characterization. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 10 (2), 435-451
- 24 Anonymous (2000) Rabbit calicivirus infection confirmed in Iowa rabbitry. *J Am Vet Med Assoc* 216 (10), 1537

- 25 Cooke, B. and Saunders, G. (2002) Rabbit haemorrhagic disease in Australia and New Zealand. *Wildlife Res* 29 (6), 1-2
- 26 Fenner, F. (2010) Deliberate introduction of the European rabbit, *Oryctolagus*. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 29 (1), 103-111
- 27 Abrantes, J., van der Loo, W., Le Pendu, J., and Esteves, P.J. (2012) Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review. *Vet Res* 43 (1), 12
- 28 Embury-Hyatt, C., Postey, R., Hisanaga, T., Burton, L., Hooper-McGrevy, K., McIntyre, L., Millar, K., and Pasick, J. (2012) The first reported case of rabbit hemorrhagic disease in Canada. *Can Vet J* 53 (9), 998-1002
- 29 Gould, E.A. (2012) First case of rabbit haemorrhagic disease in Canada: contaminated flying insect, vs. long-term infection hypothesis. *Mol Ecol* 21 (5), 1042-1047
- 30 An, S.-H., Kim, B.-H., Lee, J.B., Song, J.U., Park, B.K., Kwon, Y.B., Jung, J.S., and Lee, Y.S. (1988) Studies on picornavirus hemorrhagic fever (tentative name) in rabbit. Physico-chemical properties of the casuative virus *Res Rep Rural Dev Adm* 30, 55-61
- 31 Ohlinger, V.F., Haas, B., Meyers, G., Weiland, F., and Thiel, H.J. (1990) Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease. *J Virol* 64 (7), 3331-3336
- 32 Liebermann, H., Bergmann, H., Lange, E., Schirrmeier, H., and Solisch, P. (1992) Some physicochemical properties of the virus of rabbit haemorrhagic disease. *J Vet Med B* 39 (5), 317-326
- 33 Moussa, A., Chasey, D., Lavazza, A., Capucci, L., Smid, B., Meyers, G., Rossi, C., Thiel, H.J., Vlasak, R., Ronsholt, L., Nowotny, N., McCullough, K., and Gavier-Widen, D. (1992) Haemorrhagic disease of lagomorphs: evidence for a calicivirus. *Vet Microbiol* 33 (1-4), 375-381
- 34 Parra, F. and Prieto, M. (1990) Purification and characterization of a calicivirus as the causative agent of a lethal hemorrhagic disease in rabbits. *J Virol* 64 (8), 4013-4015
- 35 Park, J.H., Kida, H., Ueda, K., Ochiai, K., Goryo, M., and Itakura, C. (1991) Etiology of rabbit haemorrhagic disease spontaneously occurring in Korea. *J Vet Med B* 38 (10), 749-754

- 36 Rodák, L., Granátová, M., Valíček, L., Smíd, B., Veselý, T., and Nevoránková, Z. (1990) Monoclonal antibodies to rabbit haemorrhagic disease virus and their use in the diagnosis of infection. *J Gen Virol* 71 (11), 2593-2598
- 37 Xu, Z.J. and Chen, W.X. (1989) Viral haemorrhagic disease in rabbits: a review. *Vet Res Commun* 13 (3), 205-212
- 38 Meyers, G., Wirblich, C., and Thiel, H.J. (1991) Genomic and subgenomic RNAs of rabbit hemorrhagic disease virus are both protein-linked and packaged into particles. *Virology* 184 (2), 677-686
- 39 Meyers, G., Wirblich, C., and Thiel, H.J. (1991) Rabbit hemorrhagic disease virus--molecular cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus genome. *Virology* 184 (2), 664-676
- 40 Sibilia, M., Boniotti, M.B., Angoscini, P., Capucci, L., and Rossi, C. (1995) Two independent pathways of expression lead to self-assembly of the rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. *J Virol* 69 (9), 5812-5815
- 41 Ohlinger, V.F., Haas, B., and Thiel, H.J. (1993) Rabbit hemorrhagic disease (RHD): characterization of the causative calicivirus. *Vet Res* 24 (2), 103-116
- 42 Capucci, L., Scicluna, M.T., and Lavazza, A. (1991) Diagnosis of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 10 (2), 347-370
- 43 Farnos, O., Boue, O., Parra, F., Martín-Alonso, J.M., Valdes, O., Joglar, M., Navea, L., Naranjo, P., and Lleona, R. (2005) High-level expression and immunogenic properties of the recombinant rabbit hemorrhagic disease virus VP60 capsid protein obtained in *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* 117 (3), 215-224
- 44 Gromadzka, B., Szewczyk, B., Konopa, G., Fitzner, A., and Kesy, A. (2006) Recombinant VP60 in the form of virion-like particles as a potential vaccine against rabbit hemorrhagic disease virus. *Acta Biochim Pol* 53 (2), 371-376
- 45 Nowotny, N., Bascunana, C.R., Ballagi-Pordany, A., Gavier-Widen, D., Uhlen, M., and Belak, S. (1997) Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease and European brown hare syndrome viruses by comparison of sequences from the capsid protein gene. *Arch Virol* 142 (4), 657-673
- 46 Forrester, N.L., Trout, R.C., Turner, S.L., Kelly, D., Boag, B., Moss, S., and Gould, E.A. (2006) Unravelling the paradox of rabbit haemorrhagic disease virus emergence, using phylogenetic analysis; possible implications for rabbit conservation strategies. *Biol Conserv* 131 (2), 296-306

- 47 Kerr, P.J., Kitchen, A., and Holmes, E.C. (2009) Origin and phylodynamics of rabbit hemorrhagic disease virus. *J Virol* 83 (23), 12129-12138
- 48 Fenner, F. and Fantini, B. (1999) Biological control of vertebrate pests: the history of myxomatosis, an experiment in evolution. In *Book Reviews*, pp. 139-140, CABI Publishing
- 49 Boga, J.A., Casais, R., Marín, M.S., Martín-Alonso, J.M., Carmenes, R.S., Prieto, M., and Parra, F. (1994) Molecular cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the capsid protein gene from rabbit haemorrhagic disease virus (Spanish isolate AST/89). *J Gen Virol* 75 ( 9), 2409-2413
- 50 Guittré, C., Baginski, I., Le Gall, G., Prave, M., Trepo, C., and Cova, L. (1995) Detection of rabbit haemorrhagic disease virus isolates and sequence comparison of the N-terminus of the capsid protein gene by the polymerase chain reaction. *Res Vet Sci* 58 (2), 128-132
- 51 Forrester, N.L., Boag, B., Moss, S.R., Turner, S.L., Trout, R.C., White, P.J., Hudson, P.J., and Gould, E.A. (2003) Long-term survival of New Zealand rabbit haemorrhagic disease virus RNA in wild rabbits, revealed by RT-PCR and phylogenetic analysis. *J Gen Virol* 84 (11), 3079-3086
- 52 Marchandeu, S., Le Gall-Reculé, G., Bertagnoli, S., Aubineau, J., Botti, G., and Lavazza, A. (2005) Serological evidence for a non-protective RHDV-like virus. *Vet Res* 36 (1), 53-62
- 53 Le Gall-Reculé, G., Zwingelstein, F., Laurent, S., de Boisseson, C., Portejoie, Y., and Rasschaert, D. (2003) Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease virus in France between 1993 and 2000, and the characterisation of RHDV antigenic variants. *Arch Virol* 148 (1), 65-81
- 54 Wirblich, C., Meyers, G., Ohlinger, V.F., Capucci, L., Eskens, U., Haas, B., and Thiel, H.J. (1994) European brown hare syndrome virus: relationship to rabbit hemorrhagic disease virus and other caliciviruses. *J Virol* 68 (8), 5164-5173
- 55 Neill, J.D. (1992) Nucleotide sequence of the capsid protein gene of two serotypes of San Miguel sea lion virus: identification of conserved and non-conserved amino acid sequences among calicivirus capsid proteins. *Virus Res* 24 (2), 211-222
- 56 Capucci, L., Frigoli, G., Ronshold, L., Lavazza, A., Brocchi, E., and Rossi, C. (1995) Antigenicity of the rabbit hemorrhagic disease virus studied by its reactivity with monoclonal antibodies. *Virus Res* 37 (3), 221-238

- 57 Capucci, L., Fallacara, F., Grazioli, S., Lavazza, A., Pacciarini, M.L., and Brocchi, E. (1998) A further step in the evolution of rabbit hemorrhagic disease virus: the appearance of the first consistent antigenic variant. *Virus Res* 58 (1-2), 115-126
- 58 Le Gall, G., Arnauld, C., Boilletot, E., Morisse, J.P., and Rasschaert, D. (1998) Molecular epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus outbreaks in France during 1988 to 1995. *J Gen Virol* 79, 11-16
- 59 Farnos, O., Rodriguez, D., Valdes, O., Chiong, M., Parra, F., Toledo, J.R., Fernandez, E., Leonart, R., and Suarez, M. (2007) Molecular and antigenic characterization of rabbit hemorrhagic disease virus isolated in Cuba indicates a distinct antigenic subtype. *Arch Virol* 152 (6), 1215-1221
- 60 Schirrmeier, H., Reimann, I., Kollner, B., and Granzow, H. (1999) Pathogenic, antigenic and molecular properties of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) isolated from vaccinated rabbits: detection and characterization of antigenic variants. *Arch Virol* 144 (4), 719-735
- 61 McIntosh, M.T., Behan, S.C., Mohamed, F.M., Lu, Z., Moran, K.E., Burrage, T.G., Neilan, J.G., Ward, G.B., Botti, G., Capucci, L., and Metwally, S.A. (2007) A pandemic strain of calicivirus threatens rabbit industries in the Americas. *Virol J* 4, 96
- 62 Muller, A., Freitas, J., Silva, E., Le Gall-Reculé, G., Zwingelstein, F., Abrantes, J., Esteves, P.J., Alves, P.C., van der Loo, W., Kolodziejek, J., Nowotny, N., and Thompson, G. (2009) Evolution of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) from the Iberian Peninsula. *Vet Microbiol* 135 (3-4), 368-373
- 63 Le Gall-Reculé, G., Zwingelstein, F., Boucher, S., Le Normand, B., Plassiart, G., Portejoie, Y., Decors, A., Bertagnoli, S., Guerin, J.L., and Marchandeau, S. (2011) Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. *Vet Rec* 168 (5), 137-138
- 64 Le Gall-Reculé, G., Lavazza, A., Marchandeau, S., Bertagnoli, S., Zwingelstein, F., Cavadini, P., Martinelli, N., Lombardi, G., Guerin, J.L., Lemaitre, E., Decors, A., Boucher, S., Le Normand, B., and Capucci, L. (2013) Emergence of a new lagovirus related to rabbit haemorrhagic disease virus. *Vet Res* 44 (1), 81



- 65 Dalton, K.P., Nicieza, I., Balseiro, A., Muguerza, M.A., Rosell, J.M., Casais, R., Alvarez, A.L., and Parra, F. (2012) Variant rabbit hemorrhagic disease virus in young rabbits, Spain. *Emerg Infect Dis* 18 (12), 2009-2012
- 66 Puggioni, G., Cavadini, P., Maestrale, C., Scivoli, R., Botti, G., Ligios, C., Le Gall-Reculé, G., Lavazza, A., and Capucci, L. (2013) The new French 2010 Rabbit Hemorrhagic Disease Virus causes an RHD-like disease in the Sardinian Cape hare (*Lepus capensis mediterraneus*). *Vet Res* 44 (1), 96
- 67 Abrantes, J., Lopes, A.M., Dalton, K.P., Melo, P., Correia, J.J., Ramada, M., Alves, P.C., Parra, F., and Esteves, P.J. (2013) New variant of rabbit hemorrhagic disease virus, Portugal, 2012-2013. *Emerg Infect Dis* 19 (11), 1900-1902
- 68 Capucci, L., Fusi, P., Lavazza, A., Pacciarini, M.L., and Rossi, C. (1996) Detection and preliminary characterization of a new rabbit calicivirus related to rabbit hemorrhagic disease virus but nonpathogenic. *J Virol* 70 (12), 8614-8623
- 69 Strive, T., Wright, J.D., and Robinson, A.J. (2009) Identification and partial characterisation of a new Lagovirus in Australian wild rabbits. *Virology* 384 (1), 97-105
- 70 Forrester, N.L., Trout, R.C., and Gould, E.A. (2007) Benign circulation of rabbit haemorrhagic disease virus on Lambay Island, Eire. *Virology* 358 (1), 18-22
- 71 Nagesha, H.S., McColl, K.A., Collins, B.J., Morrissy, C.J., Wang, L.F., and Westbury, H.A. (2000) The presence of cross-reactive antibodies to rabbit haemorrhagic disease virus in Australian wild rabbits prior to the escape of virus from quarantine. *Arch Virol* 145 (4), 749-757
- 72 Forrester, N.L., Boag, B., Buckley, A., Moureau, G., and Gould, E.A. (2009) Co-circulation of widely disparate strains of rabbit haemorrhagic disease virus could explain localised epidemics in the United Kingdom. *Virology* 393 (1), 42-48
- 73 Capucci, L., Nardin, A., and Lavazza, A. (1997) Seroconversion in an industrial unit of rabbits infected with a non-pathogenic rabbit haemorrhagic disease-like virus. *Vet Rec* 140 (25), 647-650
- 74 Chasey, D., Trout, R.C., and Edwards, S. (1997) Susceptibility of wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in the United Kingdom to rabbit haemorrhagic disease (RHD). *Vet Res* 28 (3), 271-276
- 75 Strive, T., Wright, J., Kovaliski, J., Botti, G., and Capucci, L. (2010) The non-pathogenic Australian lagovirus RCV-A1 causes a prolonged infection and elicits

- partial cross-protection to rabbit haemorrhagic disease virus. *Virology* 398 (1), 125-134
- 76 Strive, T., Elsworth, P., Liu, J., Wright, J.D., Kovaliski, J., and Capucci, L. (2013) The non-pathogenic Australian rabbit calicivirus RCV-A1 provides temporal and partial cross protection to lethal rabbit haemorrhagic disease virus infection which is not dependent on antibody titres. *Vet Res* 44 (1), 51
- 77 Le Gall-Reculé, G., Zwingelstein, F., Fages, M.P., Bertagnoli, S., Gelfi, J., Aubineau, J., Roobrouck, A., Botti, G., Lavazza, A., and Marchandeau, S. (2011) Characterisation of a non-pathogenic and non-protective infectious rabbit lagovirus related to RHDV. *Virology* 410 (2), 395-402
- 78 Bergin, I.L., Wise, A.G., Bolin, S.R., Mullaney, T.P., Kiupel, M., and Maes, R.K. (2009) Novel calicivirus identified in rabbits, Michigan, USA. *Emerg Infect Dis* 15 (12), 1955-1962
- 79 Abrantes, J. and Esteves, P.J. (2010) Not-so-novel Michigan rabbit calicivirus. *Emerg Infect Dis* 16 (8), 1331-1332
- 80 Abrantes, J., Esteves, P.J., and van der Loo, W. (2008) Evidence for recombination in the major capsid gene VP60 of the rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV). *Arch Virol* 153 (2), 329-335
- 81 Forrester, N.L., Moss, S.R., Turner, S.L., Schirrmeier, H., and Gould, E.A. (2008) Recombination in rabbit haemorrhagic disease virus: possible impact on evolution and epidemiology. *Virology* 376 (2), 390-396
- 82 Kinnear, M. and Linde, C.C. (2010) Capsid gene divergence in rabbit hemorrhagic disease virus. *J Gen Virol* 91 (1), 174-181
- 83 Smíd, B., Valícek, L., Stepanek, J., Jurak, E., and Rodák, L. (1989) Experimental transmission and electron microscopic demonstration of the virus of haemorrhagic disease of rabbits in Czechoslovakia. *J Vet Med B* 36 (3), 237-240
- 84 Smíd, B., Valícek, L., Rodák, L., Stepanek, J., and Jurak, E. (1991) Rabbit haemorrhagic disease: an investigation of some properties of the virus and evaluation of an inactivated vaccine. *Vet Microbiol* 26 (1-2), 77-85
- 85 Asgari, S., Hardy, J.R., Sinclair, R.G., and Cooke, B.D. (1998) Field evidence for mechanical transmission of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) by flies (*Diptera:Calliphoridae*) among wild rabbits in Australia. *Virus Res* 54 (2), 123-132
- 86 Lenghaus, C., Westbury, H.A., Collins, B.J., Ratnamohan, N., and Morrissy, C. (1994) Overview of the RHD project in Australian Animal Health Laboratory. In

- Rabbit haemorrhagic disease: issues in assessment for biological control.* (Munro, R.K. and Williams, R.T., eds), pp. 104–129, Australian Government Publishing Service
- 87 McColl, K.A., Merchant, J.C., Hardy, J., Cooke, B.D., Robinson, A., and Westbury, H.A. (2002) Evidence for insect transmission of rabbit haemorrhagic disease virus. *Epidemiol Infect* 129 (3), 655-663
  - 88 Marcato, P.S., Benazzi, C., Vecchi, G., Galeotti, M., Della Salda, L., Sarli, G., and Lucidi, P. (1991) Clinical and pathological features of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 10 (2), 371-392
  - 89 Cooke, B.D., Robinson, A.J., Merchant, J.C., Nardin, A., and Capucci, L. (2000) Use of ELISAs in field studies of rabbit haemorrhagic disease (RHD) in Australia. *Epidemiol Infect* 124 (3), 563-576
  - 90 Ferreira, P.G., Dini, M., Costa-e-Silva, A., and Águas, A.P. (2008) Adult rabbits acquire resistance to lethal calicivirus infection by adoptive transfer of sera from infected young rabbits. *Vet Immunol Immunopathol* 121 (3-4), 364-369
  - 91 Ramiro-Ibáñez, F., Martín-Alonso, J.M., García Palencia, P., Parra, F., and Alonso, C. (1999) Macrophage tropism of rabbit hemorrhagic disease virus is associated with vascular pathology. *Virus Res* 60 (1), 21-28
  - 92 Plassiart, G., Guelfi, J.F., Ganière, J.P., Wang, B., André-Fontaine, G., and Wyers, M. (1992) Hematological parameters and visceral lesions relationships in rabbit viral hemorrhagic-disease. *J Vet Med B* 39 (6), 443-453
  - 93 Ueda, K., Park, J.H., Ochiai, K., and Itakura, C. (1992) Disseminated intravascular coagulation (DIC) in rabbit haemorrhagic disease. *Jpn J Vet Res* 40 (4), 133-141
  - 94 Alexandrov, M., Peshev, R., Yanchev, I., Bozhkov, S., Doumanova, L., Dimitrov, T., and Zacharieva, S. (1992) Immunohistochemical localization of the rabbit haemorrhagic disease viral antigen. *Arch Virol* 127 (1-4), 355-363
  - 95 Zheng, D., Xue, T., Chen, D.H., Zheng, M., Zhou, Z.H., and Xu, W. (2001) Three-dimensional structure of the wild-type RHDV. *Chinese Sci Bull* 46 (12), 1005-1009
  - 96 Park, J.H., Ochiai, K., and Itakura, C. (1992) Detection of rabbit haemorrhagic disease virus particles in the rabbit liver tissues. *J Comp Pathol* 107 (3), 329-340

- 97 Ohlinger, V.F. and Thiel, H.J. (1991) Identification of the viral haemorrhagic disease virus of rabbits as a calicivirus. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 10 (2), 311-323
- 98 Park, J.H. and Itakura, C. (1992) Detection of rabbit haemorrhagic disease virus antigen in tissues by immunohistochemistry. *Res Vet Sci* 52 (3), 299-306
- 99 Collins, B.J., White, J.R., Lenghaus, C., Boyd, V., and Westbury, H.A. (1995) A competition ELISA for the detection of antibodies to rabbit haemorrhagic disease virus. *Vet Microbiol* 43 (1), 85-96
- 100 Gall, A., Hoffmann, B., Teifke, J.P., Lange, B., and Schirrmeier, H. (2007) Persistence of viral RNA in rabbits which overcome an experimental RHDV infection detected by a highly sensitive multiplex real-time RT-PCR. *Vet Microbiol* 120 (1-2), 17-32
- 101 Alonso, C., Oviedo, J.M., Martín-Alonso, J.M., Diaz, E., Boga, J.A., and Parra, F. (1998) Programmed cell death in the pathogenesis of rabbit hemorrhagic disease. *Arch Virol* 143 (2), 321-332
- 102 Kimura, T., Mitsui, I., Okada, Y., Furuya, T., Ochiai, K., Umemura, T., and Itakura, C. (2001) Distribution of rabbit haemorrhagic disease virus RNA in experimentally infected rabbits. *J Comp Pathol* 124 (2-3), 134-141
- 103 Gelmetti, D., Grieco, V., Rossi, C., Capucci, L., and Lavazza, A. (1998) Detection of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) by in situ hybridisation with a digoxigenin labelled RNA probe. *J Virol Methods* 72 (2), 219-226
- 104 Jung, J.Y., Lee, B.J., Tai, J.H., Park, J.H., and Lee, Y.S. (2000) Apoptosis in rabbit haemorrhagic disease. *J Comp Pathol* 123 (2-3), 135-140
- 105 Ferreira, P.G., Costa-e-Silva, A., Oliveira, M.J., Monteiro, E., Cunha, E.M., and Águas, A.P. (2006) Severe leukopenia and liver biochemistry changes in adult rabbits after calicivirus infection. *Res Vet Sci* 80 (2), 218-225
- 106 Tuñón, M.J., Sánchez-Campos, S., García-Ferreras, J., Alvarez, M., Jorquera, F., and González-Gallego, J. (2003) Rabbit hemorrhagic viral disease: characterization of a new animal model of fulminant liver failure. *J Lab Clin Med* 141 (4), 272-278
- 107 Sánchez-Campos, S., Alvarez, M., Culebras, J.M., González-Gallego, J., and Tuñón, M.J. (2004) Pathogenic molecular mechanisms in an animal model of fulminant hepatic failure: Rabbit hemorrhagic viral disease. *J Lab Clin Med* 144 (4), 215-222

- 108 Ferreira, P.G., Costa-e-Silva, A., Monteiro, E., Oliveira, M.J., and Águas, A.P. (2006) Liver enzymes and ultrastructure in rabbit haemorrhagic disease (RHD). *Vet Res Commun* 30 (4), 393-401
- 109 García-Lastra, R., San-Miguel, B., Crespo, I., Jorquera, F., Alvarez, M., González-Gallego, J., and Tuñón, M.J. (2010) Signaling pathways involved in liver injury and regeneration in rabbit hemorrhagic disease, an animal model of virally-induced fulminant hepatic failure. *Vet Res* 41 (1), 2
- 110 Ferreira, P.G., Costa-e-Silva, A., Monteiro, E., Oliveira, M.J., and Águas, A.P. (2004) Transient decrease in blood heterophils and sustained liver damage caused by calicivirus infection of young rabbits that are naturally resistant to rabbit haemorrhagic disease. *Res Vet Sci* 76 (1), 83-94
- 111 Mikami, D., Park, J.H., Kimura, T., Ochiai, K., and Itakura, C. (1999) Hepatic lesions in young rabbits experimentally infected with rabbit haemorrhagic disease virus. *Res Vet Sci* 66 (3), 237-242
- 112 Shien, J.H., Shieh, H.K., and Lee, L.H. (2000) Experimental infections of rabbits with rabbit haemorrhagic disease virus monitored by polymerase chain reaction. *Res Vet Sci* 68 (3), 255-259
- 113 Ferreira, P.G., Costa-e-Silva, A., and Águas, A.P. (2006) Liver disease in young rabbits infected by calicivirus through nasal and oral routes. *Res Vet Sci* 81 (3), 362-365
- 114 Ferreira, P.G., Costa-e-Silva, A., Oliveira, M.J., Monteiro, E., and Águas, A.P. (2005) Leukocyte-hepatocyte interaction in calicivirus infection: differences between rabbits that are resistant or susceptible to rabbit haemorrhagic disease (RHD). *Vet Immunol Immunopathol* 103 (3-4), 217-221
- 115 Ruvoën-Clouet, N., Ganière, J.P., André-Fontaine, G., Blanchard, D., and Le Pendu, J. (2000) Binding of rabbit hemorrhagic disease virus to antigens of the ABH histo-blood group family. *J Virol* 74 (24), 11950-11954
- 116 Nyström, K., Le Gall-Reculé, G., Grassi, P., Abrantes, J., Ruvoën-Clouet, N., Le Moullac-Vaidye, B., Lopes, A.M., Esteves, P.J., Strive, T., Marchandeau, S., Dell, A., Haslam, S.M., and Le Pendu, J. (2011) Histo-blood group antigens act as attachment factors of rabbit hemorrhagic disease virus infection in a virus strain-dependent manner. *PLoS Pathog* 7 (8), e1002188

- 117 Huang, H.B. (1991) Vaccination against and immune response to viral haemorrhagic disease of rabbits: a review of research in the People's Republic of China. *Rev Sci Tech Oie* 10 (2), 481-498
- 118 Argüello Villares, J.L. (1991) Viral haemorrhagic disease of rabbits: vaccination and immune response. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 10 (2), 459-480
- 119 Boga, J.A., Martín-Alonso, J.M., Casais, R., and Parra, F. (1997) A single dose immunization with rabbit haemorrhagic disease virus major capsid protein produced in *Saccharomyces cerevisiae* induces protection. *J Gen Virol* 78 (9), 2315-2318
- 120 Farnos, O., Rodriguez, M., Chiong, M., Parra, F., Boue, O., Lorenzo, N., Colas, M., and Leonart, R. (2006) The recombinant rabbit hemorrhagic disease virus VP60 protein obtained from *Pichia pastoris* induces a strong humoral and cell-mediated immune response following intranasal immunization in mice. *Vet Microbiol* 114 (3-4), 187-195
- 121 Castanon, S., Marín, M.S., Martín-Alonso, J.M., Boga, J.A., Casais, R., Humara, J.M., Ordas, R.J., and Parra, F. (1999) Immunization with potato plants expressing VP60 protein protects against rabbit hemorrhagic disease virus. *J Virol* 73 (5), 4452-4455
- 122 Mikschofsky, H., Schirrmeier, H., Keil, G.M., Lange, B., Polowick, P.L., Keller, W., and Broer, I. (2009) Pea-derived vaccines demonstrate high immunogenicity and protection in rabbits against rabbit haemorrhagic disease virus. *Plant Biotechnol J* 7 (6), 537-549
- 123 Pérez-Filgueira, D.M., Resino-Talaván, P., Cubillos, C., Angulo, I., Barderas, M.G., Barcena, J., and Escribano, J.M. (2007) Development of a low-cost, insect larvae-derived recombinant subunit vaccine against RHDV. *Virology* 364 (2), 422-430
- 124 Laurent, S., Vautherot, J.F., Madelaine, M.F., Le Gall, G., and Rasschaert, D. (1994) Recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in baculovirus self-assembles into viruslike particles and induces protection. *J Virol* 68 (10), 6794-6798
- 125 Marín, M.S., Martín-Alonso, J.M., Pérez Ordoyo García, L.I., Boga, J.A., Argüello-Villares, J.L., Casais, R., Venugopal, K., Jiang, W., Gould, E.A., and Parra, F. (1995) Immunogenic properties of rabbit haemorrhagic disease virus

- structural protein VP60 expressed by a recombinant baculovirus: an efficient vaccine. *Virus Res* 39 (2-3), 119-128
- 126 Fernandez, E., Toledo, J.R., Chiong, M., Parra, F., Rodriguez, E., Montero, C., Mendez, L., Capucci, L., and Farnos, O. (2011) Single dose adenovirus vectored vaccine induces a potent and long-lasting immune response against rabbit hemorrhagic disease virus after parenteral or mucosal administration. *Vet Immunol Immunopathol* 142 (3-4), 179-188
- 127 Bertagnoli, S., Gelfi, J., Le Gall, G., Boilletot, E., Vautherot, J.F., Rasschaert, D., Laurent, S., Petit, F., Boucraut-Baralon, C., and Milon, A. (1996) Protection against myxomatosis and rabbit viral hemorrhagic disease with recombinant myxoma viruses expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. *J Virol* 70 (8), 5061-5066
- 128 Bertagnoli, S., Gelfi, J., Petit, F., Vautherot, J.F., Rasschaert, D., Laurent, S., Le Gall, G., Boilletot, E., Chantal, J., and Boucraut-Baralon, C. (1996) Protection of rabbits against rabbit viral haemorrhagic disease with a vaccinia-RHDV recombinant virus. *Vaccine* 14 (6), 506-510
- 129 Qiu, L., Wang, X., Hao, H., Mu, G., Dang, R., Wang, J., Zhang, S., Du, E., and Yang, Z. (2013) Oral administration of attenuated *Salmonella typhimurium* containing a DNA vaccine against rabbit haemorrhagic disease. *J Virol Methods* 188 (1-2), 108-113
- 130 Martín-Alonso, J.M., Castanon, S., Alonso, P., Parra, F., and Ordas, R. (2003) Oral immunization using tuber extracts from transgenic potato plants expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. *Transgenic Res* 12 (1), 127-130
- 131 Yuan, D., Qu, L., Liu, J., Guo, D., Jiang, Q., Lin, H., and Si, C. (2013) DNA vaccination with a gene encoding VP60 elicited protective immunity against rabbit hemorrhagic disease virus. *Vet Microbiol* 164 (1-2), 1-8
- 132 Morton, D., Verga, M., Blasco, A., Cavani, C., Lavazza, A., Maertens, L., Mirabito, L., Rosell, J.M., Stauffacher, M., and Szendrő, Z. (2005) The Impact of the current housing and husbandry systems on the health and welfare of farmed domestic rabbits. *The EFSA J*, 267 1-31





## CAPÍTULO 2

---

### **A simple and rapid method for isolation of caliciviruses from liver of infected rabbits**

Teixeira L., Marques, R.M., Águas, A.P., Ferreira, P.G. (2011), *Research in Veterinary Science* 91 (1), 164-166.

Reimpresso com a permissão da *Elsevier*.





## A simple and rapid method for isolation of caliciviruses from liver of infected rabbits

Luzia Teixeira<sup>\*</sup>, Raquel M. Marques, Artur P. Águas, Paula G. Ferreira

Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS) and Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica (UMIB), Universidade do Porto, Largo Prof. Abel Salazar 2, 4099-003 Porto, Portugal

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 2 March 2010

Accepted 10 August 2010

#### Keywords:

Virus purification  
Immunocytochemistry  
RHD  
VP60  
RHDV  
Iodixanol

### ABSTRACT

Rabbit Haemorrhagic Disease Virus (RHDV), a member of the *Caliciviridae* family, is the etiologic agent of Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD); this viral disease is highly contagious and kills more than 90% of infected adult rabbits. Research on experimental calicivirus infection uses inocula obtained from livers of rabbits dying from calicivirus infection. This implies that caliciviruses have to be purified from liver homogenates. Current methods to isolate caliciviruses from rabbit livers are time consuming. We propose here a new procedure for fast purification of rabbit caliciviruses from liver homogenates that uses centrifugation through an iodixanol gradient. This method offers in approximately 2 h a sample with a high degree of calicivirus purity, as shown by its biochemical and immunocytochemistry analysis, which is also able to kill adult rabbits from RHD within 48 h of inoculation.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

The calicivirus known as Rabbit Haemorrhagic Disease Virus (RHDV) is the etiologic agent of an acute and lethal infection (RHD, rabbit haemorrhagic disease) that is responsible for the worldwide decrease in the number of wild rabbits that has occurred during the last decades (Chasey, 1997). Because rabbit calicivirus cannot be readily replicated *in vitro* using cell culture (Chasey, 1997), experimental studies on calicivirus infection use liver homogenates of infected rabbits as inocula to induce the disease *in vivo*. Thus, for research purposes, experimental infections with calicivirus are often performed by the inoculation of dilutions of crude homogenates of the liver of infected rabbits (Fuchs and Weissenböck, 1992; Plassiart et al., 1992; Ueda et al., 1992; Guittre et al., 1996; Gelmetti et al., 1998). Because the use of crude liver extracts as inocula may impair the reliability of experimental studies on rabbit calicivirus infection some laboratories use instead purified viruses. Using current methods, calicivirus purification from liver homogenates may be a time consuming procedure. To overcome this technical difficulty, we have tested several methods of virus purification in order to select a simpler method to purify caliciviruses from liver homogenates in order to pursue our own experimental studies on RHD (Ferreira et al., 2005, 2006).

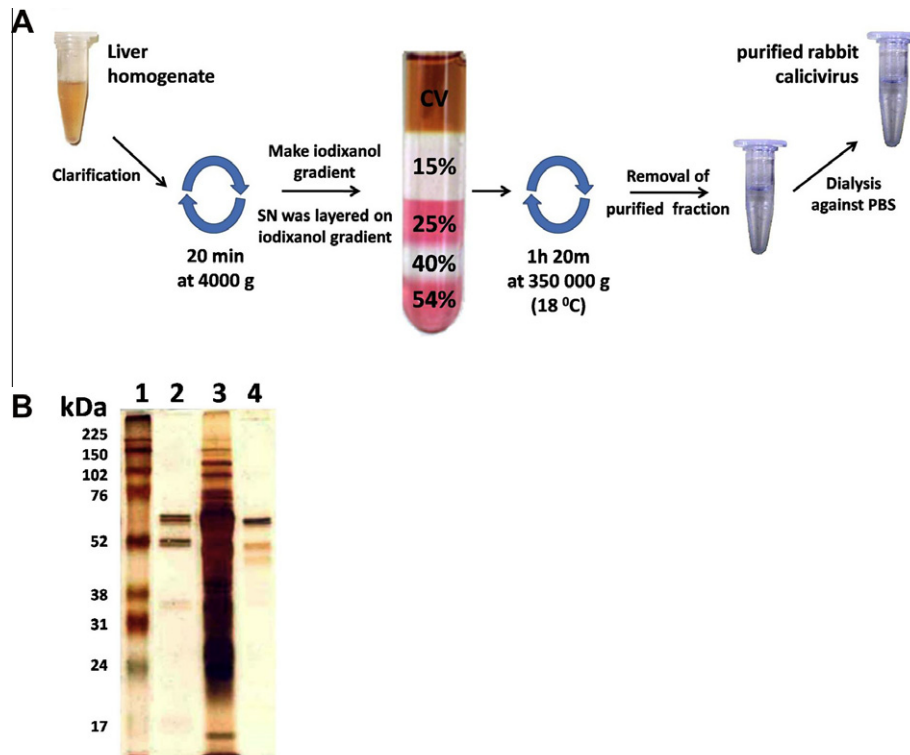
We report here a fast procedure for the isolation of rabbit caliciviruses from liver homogenates that adapts to calicivirus a previous method that was originally developed to purify recombinant

adeno-associated virus (rAAV) (Zolotukhin et al., 1999; OptiPrep™ manufacture instructions).

The steps of our isolation procedure are summarized in Fig. 1A. The initial inoculum of caliciviruses that we have used here was a kind offer of Professor Francisco Parra (University of Oviedo, Spain) (Parra and Prieto, 1990), and was used as described in Ferreira et al. (2004). Homogenates from infected rabbit liver were prepared with the help of a glass pestle in phosphate-buffered saline (PBS) kept between 0 and 4 °C. The tissue suspensions were centrifuged at 900g and the supernatants were frozen at –80 °C. These liver homogenates were purified by iodixanol gradients: a solution of 54% iodixanol was prepared by adding a OptiPrep™ (Axis-shield, Oslo, Norway) solution of 60% iodixanol in water with 10× PBS-MK (PBS 10× with 10 mM MgCl<sub>2</sub> and 25 mM KCl); dilutions from this solution were prepared with PBS-MK (1×) (15%, 25% and 40% of iodixanol); sodium chloride was added to a final concentration of 1 M to 15% iodixanol solution. Phenol red (0.01 µg/mL) was present in the 54% and 25% iodixanol solutions. While preparing the iodixanol solutions, the liver homogenate (2.5 mL) was centrifuged for 20 min at 4000g. The supernatant (filtered through a 0.2 µm pore-size filter) was overlaid into a discontinuous gradient of iodixanol solutions prepared as described above (2.25 mL of 15% iodixanol; 1.5 mL of 25% iodixanol; 1.25 mL of 40% iodixanol and 1.25 mL of 54% iodixanol). The gradient with the clarified liver homogenate was centrifuged at 350,000g for 1 h 20 min at 18 °C in a Beckman L8-80M with a 75 Ti rotor. Successive fractions were recovered from the top of the tube. In order to assess the degree of viral purification provided by the method, 10% sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) analysis was performed for all of the recovered gradient fractions (data

<sup>\*</sup> Corresponding author. Address: Department of Anatomy – ICBAS/UP Largo Prof. Abel Salazar, 2 4099-003 Porto, Portugal, European Union. Tel.: +351 22 2062 205; fax: +351 22 2062 232.

E-mail address: [luzia\\_tx@icbas.up.pt](mailto:luzia_tx@icbas.up.pt) (L. Teixeira).



**Fig. 1.** (A) Summary of the procedure herein proposed for calicivirus purification from rabbit liver homogenates. SN – supernatant, CV – clarified liver homogenate. (B) Sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) analysis of rabbit calicivirus purification. Protein migration profile on silver nitrate-stained SDS–PAGE of molecular weight standards (lane 1), VP60 (lane 2), liver homogenate before purification (lane 3) and purified rabbit calicivirus (lane 4).

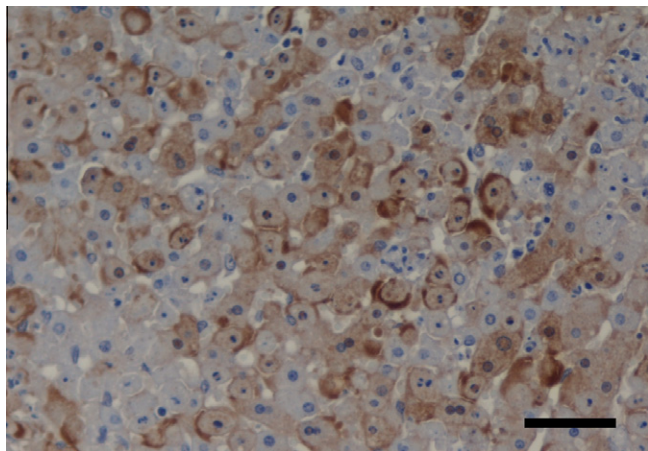
not shown). The fractions with the highest virus purity were those present in the 40% layer. These were pooled into one sample and dialyzed to PBS in an Amicon with a cutoff of 10 kDa (4 times, 20 min each at 3110 g). To evaluate the degree of purification obtained from the liver homogenate from calicivirus infected rabbits up to the final virus-rich fraction, we have used the Lowry method to compare the protein contents of the initial liver homogenate with that of the final purified fraction.

An example of SDS–PAGE of the sample (purified rabbit calicivirus) is depicted in Fig. 1B showing that this fraction has fewer protein bands than the initial viral suspension obtained from liver homogenates. Accordingly, protein content in the liver homogenate layered into the iodixanol gradient was  $11.85 \pm 1.83$  mg/mL, whereas the purified virus sample was only  $0.17 \pm 0.07$  mg/mL in protein content (data from 4 repetitions of the isolation procedure). This clearly shows that the procedure was able to greatly reduce the protein content present in the initial liver homogenate sample. The purified virus fraction showed a predominant band between 76 and 52 kDa that is positioned at the same level as the positive control made up of the VP60 antigen of calicivirus. The presence of the main structural protein of rabbit calicivirus, the VP60, in the purified fraction was confirmed by ELISA (Insezim 17.RHD.K.2 KIT, Ingenasa). In order to determine the number of infectious particles present in the samples a haemagglutination test was used, as previously described (Chasey et al., 1995). The liver homogenate applied to the gradient (in a volume of 2.5 mL) and the purified calicivirus sample before dialysis (in a volume of 1.25 mL), both had a titer of  $2^{12}$  haemagglutination units (data from 3 independent experiments). Therefore, it is concluded that a reduction of 50% was observed in the number of virus particles after this step. After dialysis against PBS and recovering of the sample in the same volume (1.25 mL), the titer of the sample was reduced to  $2^{11}$  haemagglutination units (data from 3 independent experiments). Therefore, the herein described method for calicivi-

rus purification showed recovery of 25% of the viruses present in the initial sample (liver homogenate). Remarkably, the protein content had a reduction of  $98.50 \pm 0.85\%$ , clearly showing that this method enables us to obtain a highly purified viral suspension that is not significantly tainted by liver proteins.

In order to evaluate whether the virus infectivity was maintained after our purification procedure, we have injected intramuscularly (i.m.) 6 adult rabbits (12 weeks old), with 100 or 500  $\mu$ L of purified rabbit caliciviruses diluted in PBS to a titer of  $2^7$  haemagglutination units. Control rabbits were inoculated i.m. with PBS. Rabbits were kept under standard conditions of housing, and with unrestricted access to food and water, as described before (Ferreira et al., 2008). All procedures involving rabbits were performed according to the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (ETS 123) and 86/609/EEC Directive and Portuguese rules (DL 129/92). We found that inoculation of either 500 or 100  $\mu$ L of the sample resulted in rabbit death from haemorrhagic disease within 24–48 h of infection. To confirm that the caliciviruses were present in the liver of the dead rabbits, immunocytochemistry of liver paraffin sections was performed, as previously described (Teixeira et al., 2007), using an anti-VP60 mouse antiserum. In Fig. 2, VP60-positive hepatocytes are shown by immunoperoxidase labelling: staining is seen in the majority of the rabbit liver cells. This immunocytochemistry observation combined with the fact that rabbits infected with the purified calicivirus died at the same time interval as did rabbits infected with the initial liver homogenate (Ferreira et al., 2006) indicates that our method of calicivirus purification using the iodixanol gradient does not affect virus viability. Control rabbits showed no positive staining for calicivirus (data not shown).

We propose the above described purification strategy as an elective method to obtain a preparation of purified rabbit caliciviruses since it is simpler and faster than the methods currently used



**Fig. 2.** Light microscopy of liver section from rabbit infected with our sample of purified caliciviruses upon labelling with a polyclonal mouse anti-VP60 antiserum followed by peroxidase staining (brownish) and counterstained with hematoxylin. Most liver cells are positive for the calicivirus antigen. Magnification bar – 50  $\mu$ m.

for calicivirus purification from rabbit liver homogenates. For instance, the method of Capucci et al. (1995) consists in clarifying liver homogenates through centrifugation for 20 min, precipitation of viral particles with polyethylene glycol (PEG) 6000, resuspension and ultracentrifugation during 90 min in a sucrose cushion, followed by centrifugation of the pellet in a linear gradient of sucrose. The procedure of Granzow et al. (1996) is longer and starts with centrifugation of the liver homogenates for 20 min, treatment of the supernatant with chloroform followed by centrifugation, with the supernatant viruses being precipitated with PEG during 12 h, followed by resuspension and an additional 10 min centrifugation. The suspension is then centrifuged again in a sucrose cushion for 2 h, the pellets are resuspended overnight and layered into gradients of CsCl and centrifuged for 17 h or centrifuged isopycnically to equilibrium in CsCl for 60 h. The method of Parra and Prieto (1990) first uses ultracentrifugation for 2 h with a solution of sucrose followed by resuspension of the virus pellet in a mixture of CsCl and centrifugation till reaching an isopycnic equilibrium. In comparison, the herein proposed method only requires a gradient made by iodixanol and involves just one ultracentrifugation that lasts 1 h 20 min.

In conclusion, we consider that the herein described procedure is a practical and fast method to isolate caliciviruses from liver homogenates of infected rabbits and thus it will be useful for researchers working on experimental rabbit haemorrhagic disease.

## Acknowledgments

The authors are thankful to Mr. Costa-e-Silva, Mrs. Manuela Silva and Dr. Madalena Costa for excellent technical assistance. Luzia Teixeira is supported by FSE and MCTES through POPH-QREN –

Tipologia 4.2. This work was funded by grants from FCT (PTDC/CVT/66656/2006), Portugal.

## References

- Capucci, L., Frigoli, G., Ronshold, L., Lavazza, A., Brocchi, E., Rossi, C., 1995. Antigenicity of the rabbit hemorrhagic disease virus studied by its reactivity with monoclonal antibodies. *Virus Research* 37, 221–238.
- Chasey, D., Lucas, M.H., Westcott, D.G., Sharp, G., Kitching, A., Hughes, S.K., 1995. Development of a diagnostic approach to the identification of rabbit haemorrhagic disease. *The Veterinary Record* 137, 158–160.
- Chasey, D., 1997. Rabbit haemorrhagic disease: the new scourge of *Oryctolagus cuniculus*. *Laboratorial Animals* 31, 33–44.
- Ferreira, P.G., Costa-e-Silva, A., Monteiro, E., Oliveira, M.J., Aguas, A.P., 2004. Transient decrease in blood heterophils and sustained liver damage caused by calicivirus infection of young rabbits that are naturally resistant to rabbit haemorrhagic disease. *Research in Veterinary Science* 76, 83–94.
- Ferreira, P.G., Costa-e-Silva, A., Oliveira, M.J., Monteiro, E., Aguas, A.P., 2005. Leukocyte–hepatocyte interaction in calicivirus infection: differences between rabbits that are resistant or susceptible to rabbit haemorrhagic disease (RHD). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 103, 217–221.
- Ferreira, P.G., Costa-e-Silva, A., Monteiro, E., Oliveira, M.J., Aguas, A.P., 2006a. Liver enzymes and ultrastructure in rabbit haemorrhagic disease (RHD). *Veterinary Research Communications* 30, 393–401.
- Ferreira, P.G., Costa-e-Silva, A., Aguas, A.P., 2006b. Liver disease in young rabbits infected by calicivirus through nasal and oral routes. *Research in Veterinary Science* 81, 362–365.
- Ferreira, P.G., Costa-e-Silva, A., Oliveira, M.J., Monteiro, E., Cunha, E.M., Aguas, A.P., 2006c. Severe leukopenia and liver biochemistry changes in adult rabbits after calicivirus infection. *Research in Veterinary Science* 80, 218–225.
- Ferreira, P.G., Dinis, M., Costa-e-Silva, A., Aguas, A.P., 2008. Adult rabbits acquire resistance to lethal calicivirus infection by adoptive transfer of sera from infected young rabbits. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 121, 364–369.
- Fuchs, A., Weissenböck, H., 1992. Comparative histopathological study of rabbit haemorrhagic disease (RHD) and European brown hare syndrome (EBHS). *Journal of Comparative Pathology* 107, 103–113.
- Granzow, H., Weiland, F., Strebelow, H.G., Liu, C.M., Schirmmeier, H., 1996. Rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV): ultrastructure and biochemical studies of typical and core-like particles present in liver homogenates. *Virus Research* 41, 163–172.
- Gelmetti, D., Grieco, V., Rossi, C., Capucci, L., Lavazza, A., 1998. Detection of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) by in situ hybridisation with a digoxigenin labelled RNA probe. *Journal of Virological Methods* 72, 219–226.
- Guittre, C., Ruvoen-Clouet, N., Barraud, L., Cherel, Y., Baginski, I., Prave, M., Ganiere, J.P., Trepo, C., Cova, L., 1996. Early stages of rabbit haemorrhagic disease virus infection monitored by polymerase chain reaction. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of Veterinary Medicine* 43, 109–118.
- Parra, F., Prieto, M., 1990. Purification and characterization of a calicivirus as the causative agent of a lethal hemorrhagic disease in rabbits. *Journal Virology* 64, 4013–4015.
- Plassiart, G., Guelfi, J.F., Ganiere, J.P., Wang, B., Andre-Fontaine, G., Wyers, M., 1992. Hematological parameters and visceral lesions relationships in rabbit viral hemorrhagic disease. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of Veterinary Medicine* 39, 443–453.
- Ueda, K., Park, J.H., Ochiai, K., Itakura, C., 1992. Disseminated intravascular coagulation (DIC) in rabbit haemorrhagic disease. *The Japanese Journal of Veterinary Research* 40, 133–141.
- Teixeira, L., Botelho, A.S., Batista, A.R., Meireles, C.S., Ribeiro, A., Domingues, H.S., Correia Da Costa, J.M., Castro, A.G., Faustino, A.M., Vilanova, M., 2007. Analysis of the immune response to neospora caninum in a model of intragastric infection in mice. *Parasite Immunology* 29, 23–36.
- Zolotukhin, S., Byrne, B.J., Mason, E., Zolotukhin, I., Potter, M., Chesnut, K., Summerford, C., Samulski, R.J., Muzyczka, N., 1999. Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Therapy* 6, 973–985.



## CAPÍTULO 3

---

### **Early acute depletion of lymphocytes in calicivirus-infected adult rabbits**

Marques, R.M., Costa-e-Silva, A., Águas, A.P., Teixeira, L., Ferreira, P.G. (2010), *Veterinary Research Communications* 34 (8), 659-668.

Reimpresso com a permissão de *Springer publishing*





## Early acute depletion of lymphocytes in calicivirus-infected adult rabbits

Raquel M. Marques · António Costa-e-Silva ·  
Artur P. Águas · Luzia Teixeira · Paula G. Ferreira

Accepted: 21 July 2010 / Published online: 11 August 2010  
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

**Abstract** Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD) is a lethal infection caused by calicivirus that kills 90% of the infected adult rabbits within 3 days. The calicivirus replicates in the liver and causes a fulminant hepatitis. Most studies on the pathology of RHD have been focused on the fulminant liver disease. This may not be the only mechanism in the pathogenesis of RHD: calicivirus infection may also induce leukopenia in the infected adult rabbits. We show now by flow cytometry analysis that the calicivirus induces an early decrease in B and T cells, in both spleen and liver. The depletion of B and T cells was associated with apoptosis labelled by annexin V. These changes occurred in rabbits before they showed enzymatic evidence of liver damage and persisted after liver transaminase values were very high. We conclude that depletion of lymphocytes caused by the calicivirus infection precedes or attends liver damage. The relative contribution of this lymphocyte depletion for the pathogenesis of the fatal calicivirus infection of rabbits remains to be investigated.

**Keywords** Haemorrhagic disease · Inflammation · Liver · Spleen · T lymphocyte · B lymphocyte · Macrophage · Apoptosis · Flow cytometry

### Introduction

Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD) is a “dengue-like” viral disorder that causes very high mortality of rabbits within a few days of infection. RHD kills more than 90% of adult rabbits 24–72 hours after their experimental inoculation with calicivirus (Ohlinger et al. 1990; Shien et al. 2000). The viral agent replicates in the liver, and induces a fulminant necrotic hepatitis that kills the animals (Marcato et al. 1991; Mitro and Krauss 1993; Ferreira et al. 2006a, b). Current views on the natural history of RHD are focused on the

R. M. Marques (✉) · A. Costa-e-Silva · A. P. Águas · L. Teixeira · P. G. Ferreira  
Department of Anatomy, ICBAS (Abel Salazar Institute for Biomedical Science) and UMIB  
(Unit for Multidisciplinary Biomedical Research), University of Porto, Largo Professor Abel Salazar, 2,  
4099-003 Porto, Portugal, European Union  
e-mail: ramarques@icbas.up.pt

fulminant liver disease triggered by the virus (Ferreira et al. 2006a, b). Nevertheless, other mechanisms may also concur for the rapid course of the disease, namely the systemic leukocyte depletion that we have previously described in RHD (Ferreira et al. 2006a). This phenomenon is characteristic not only of the RHD but also of others haemorrhagic fevers such as in Ebola virus infection that is associated with a severe apoptosis of lymphocytes (Leroy et al. 2000; Baize et al. 2002; Bradfute et al. 2007).

The fast progress of calicivirus infection into fulminant hepatitis in adult rabbits makes it difficult to map the sequence of cellular changes that occurs as a result of calicivirus inoculation, since most of the animals are dead less than 48 hours after inoculation. Furthermore, values of biochemical markers of liver damage have shown that RHD progresses at a different rate in individual (Ferreira et al. 2006a).

We have investigated here the early alterations in lymphocyte subpopulations that occur in spleen and liver of calicivirus-infected adult rabbits, and we have compared these data with the level of hepatic damage caused by calicivirus at 24 hours of infection.

The present work extends information obtained by previous investigations on the immunological response of rabbits to calicivirus, namely on the changes of B and T lymphocytes present in the peripheral blood of infected animals (Tokarz-Deptula and Deptula 2004, 2009; Niedzwiedzka-Rystwej et al. 2009)

## Materials and methods

### Rabbits

Fourteen New Zealand White rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) were used in this study when they were 8 weeks old. All animals were purchased from a Spanish breeder (Charles River Laboratories España, SA, Spain) and were pathogen free. The rabbits were kept under standard conditions of housing with unrestricted access to food and water; this was done according to the European Union Directive no. 86/609/CEE.

### Calicivirus infection of adult rabbits

The initial inoculum of caliciviruses used in our laboratory was a kind offer of Professor Francisco Parra, University of Oviedo, Spain. Current inocula were produced from homogenates of livers from infected rabbits, and they were obtained as previously described (Ferreira et al. 2004). Seven rabbits were injected intramuscularly with a PBS suspension of caliciviruses that had a  $2^{12}$  titre in haemagglutination units and then they were sacrificed at 24 hours after inoculation in order to determine the percentage of apoptosis and the total number of the major subpopulations of leukocytes (macrophages, T and B lymphocytes) in the liver and spleen of calicivirus infected- rabbits. The kinetics of leukocyte subpopulations was evaluated by flow cytometry. The other seven animals were inoculated only with PBS (the vehicle of the calicivirus) and they were used as controls of the infection. Before the euthanasia, blood samples were collected by venepuncture for evaluation of the serum concentration of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). The biochemical parameters were measured by spectrophotometric methods (Cobas Integra 800, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). All rabbits were euthanized with an intravenous injection of an anaesthetic mixture of xylazine (Rompun®, Bayer Co., Portugal, 3 mg/kg) and ketamine (Imalgène 1000®, Merial, Portugal, 10 mg/kg), 1 hour after the intramuscularly administration of morphine (Morfina

Labesfal®, Labesfal, Portugal, 5 mg/kg). The vascular system was washed by perfusion, through a cannula inserted in aorta, with a saline solution (40°C) and then with HEPES solution (0,14 M NaCl; 2,7 mM KCl; 0,28 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O; 10 mM HEPES) at 40°C. Liver and spleen were aseptically collected in order to be processed and analysed by flow cytometry.

#### Isolation of mononuclear cells from liver

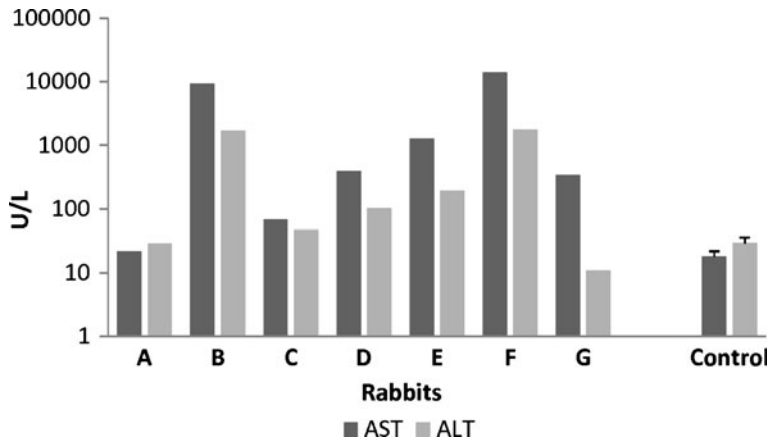
A 6–7 g portions of the liver were cut aseptically and placed in a Potter-Elvehjem homogenizer with 3 mL of a Balance Salt Solution (1,26 mM CaCl<sub>2</sub>; 5,4 mM KCl; 0,44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,49 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 0,40 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,14 M NaCl and 0,63 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) where they were gently mechanically disrupted (the homogenization was performed at low rotation for minimize the cell rupture). The resulting cell suspension was divided into two equal aliquots and transferred to 50 mL falcon tubes; BSS was then added to complete a total volume of 100 mL. The cell suspension was filtered through a 100 µm nylon mesh cell strainer to remove cellular aggregates and tissue debris. The filtrate was washed by centrifugation at 1500 rpm for 10 min at 4°C. Pellets were resuspended in 10 mL of BSS each and then they were filtered twice through a 70 µm nylon mesh cell strainer. For mononuclear cells isolation, 10 mL of the suspension was carefully layered on 5 mL of Percoll (Histopaque1077—Sigma) and centrifuged at 3000 rpm for 15 min at room temperature (Centrifuge Hoefer Labofuge 300). The layer formed between the BSS and the Percoll layers was collected and transferred to a 15 mL Falcon Flask. The cell suspension was washed by centrifugation at 1000 rpm for 10 min and the pellet was resuspended in 10 mL of BSS. Cells were stained with Turk's reagent and counted in a Neubauer Chamber (dilution 1:10).

#### Isolation of mononuclear cells from spleen

Spleen cells were obtained by gentle smearing of the organ in a sterile plate with 10 mL of BSS solution. Cells were later washed by centrifugation at 1000 rpm for 10 min at 4°C (Centrifuge Sigma 3–16 K). The pellet was resuspended in 5 mL of ACK solution (0,15 M NH<sub>4</sub>Cl, 1 mM KHCO<sub>3</sub> and 0,1 mM EDTA, pH 7,2) and incubated for 2–3 min on ice for red blood cell lysis. Five mL of BSS were added to the suspension that was centrifuged at 1000 rpm for 5 min. The pellet was resuspended in 15 mL of BSS. Cells were stained with Turk's reagent and then counted in a Neubauer Chamber (dilution 1:20).

#### Flow cytometry analysis

Mononuclear cells isolated from liver and spleen were added to cytometry tubes (1×10<sup>6</sup> cells/tube); 400 µL of PBS supplemented with 1% BSA and sodium azide (10 mM) was added to each tube. The cells were washed by centrifugation at 1000 rpm for 10 min at room temperature. Immunofluorescence cytometric analysis of cell surface antigens was performed in a FACSScan with CellQuest software, using the following antibodies: FITC-conjugated goat polyclonal antibody anti-rabbit IgM (Serotec), for the analysis of B cells (it recognizes B cells, IgM positive); FITC-conjugated mouse monoclonal antibody anti-rabbit T-lymphocytes (Serotec) that recognizes T cells and immunoprecipitates, a 67 kD glycoprotein (Kotani et al. 1993); FITC conjugated monoclonal antibody anti-mouse CD11b Mac-1α (BD Pharmingen), for the analysis of macrophages. For flow cytometry analysis of cells that are undergoing apoptosis, it was used an early apoptotic marker namely,



**Fig. 1** Comparison of the serum concentration of AST and ALT between control and calicivirus-infected adult rabbits. Twenty four hours after viral inoculation, calicivirus infection of adult rabbits induced a wide variation of the AST and ALT values

annexin V, which has a high affinity to the phosphatidylserine exposed to the external cellular environment (Apoptotic cells present membrane phospholipid phosphatidylserine translocated from inner to the outer leaflet of the plasma membrane). The late apoptotic/ necrotic cells were labelled with propidium iodide. Both lymphocyte and macrophage populations were gated on the basis of forward and side scatters and then were analyzed for the respective markers. For the calculation of the total number of cells, we have used the following formula: (cellular concentration, *cells/mL* × volume of the cell suspension, *mL*) × percentage of positive cells.

### Statistical analysis

Statistical comparison of data from all groups of rabbits was performed using the test Mann-Witney, calculated with PASW Statistics 17.0 software. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

## Results

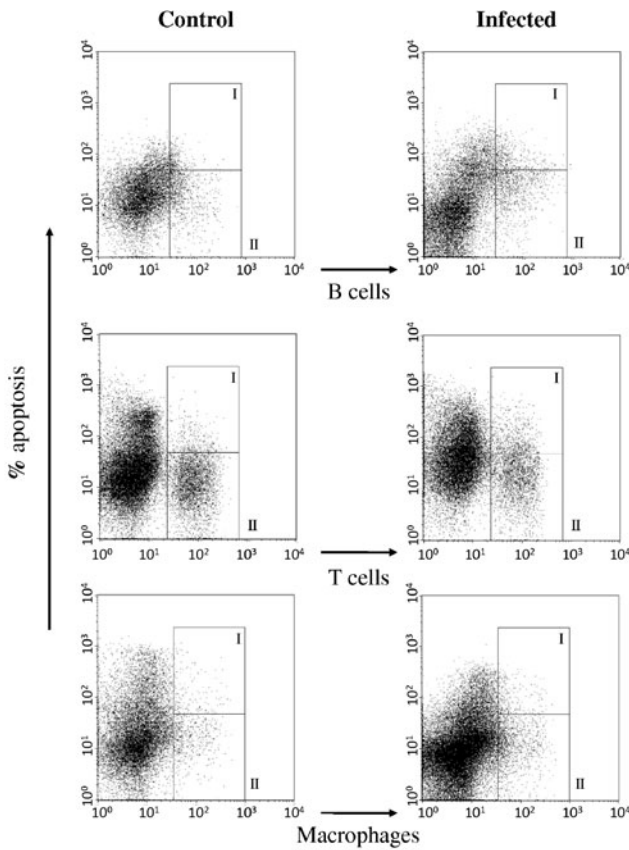
Liver biochemistry and lymphocyte subpopulations were characterized in adult rabbits 24 hours after a lethal experimental infection of the animals with calicivirus.

**Fig. 2 a** Representative flow cytometry dot-plots: the regions identified in the dot-plots as II represent the percentage of positive B cells ( $\text{IgM}^+$ ), T cells and macrophages ( $\text{CD11b}^+$ ) present in the liver of control and infected adult rabbits, after 24 hours of infection; the regions identified in the dot-plots as I represent the percentage of apoptosis (annexin $\text{V}^+$ ) for each cell population analysed, without excluding the cells labelled annexin $\text{V}^+$ /propidium iodide $^+$ . **b** Comparison of the number of leukocytes (macrophages, B and T lymphocytes) present in the liver of control and calicivirus-infected adult rabbits, after 24 hours of infection; Mann-Witney test (\*  $p < 0.05$ ). Calicivirus infection of adult rabbits is associated to a significant decrease of the liver lymphocytes (B and T cells). **c** Comparison of the percentage of apoptosis of liver leukocytes (macrophages, B and T lymphocytes) between control and calicivirus-infected adult rabbits, after 24 hours of infection; Mann-Witney test (\*  $p < 0.05$ ). The significant decrease of B and T cells in the liver of infected animals was associated with an increase of the number of apoptotic cells

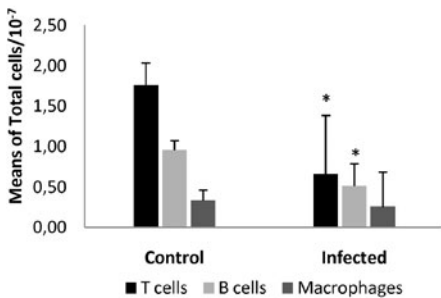
# Liver transaminases (ALT and AST)

Both ALT and AST were measured in the plasma of the 7 calicivirus-infected rabbits and in the same number of control rabbits. There was a wide variation in the ALT and AST values among the infected rabbits, i.e. these values were varies from 22 to 14000 U/L for AST and

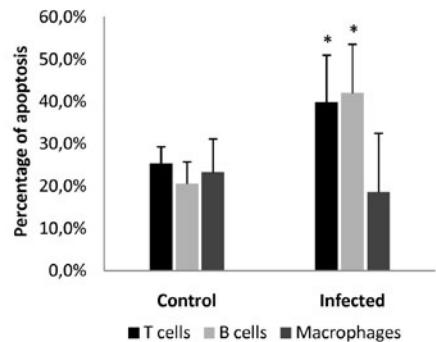
**A**

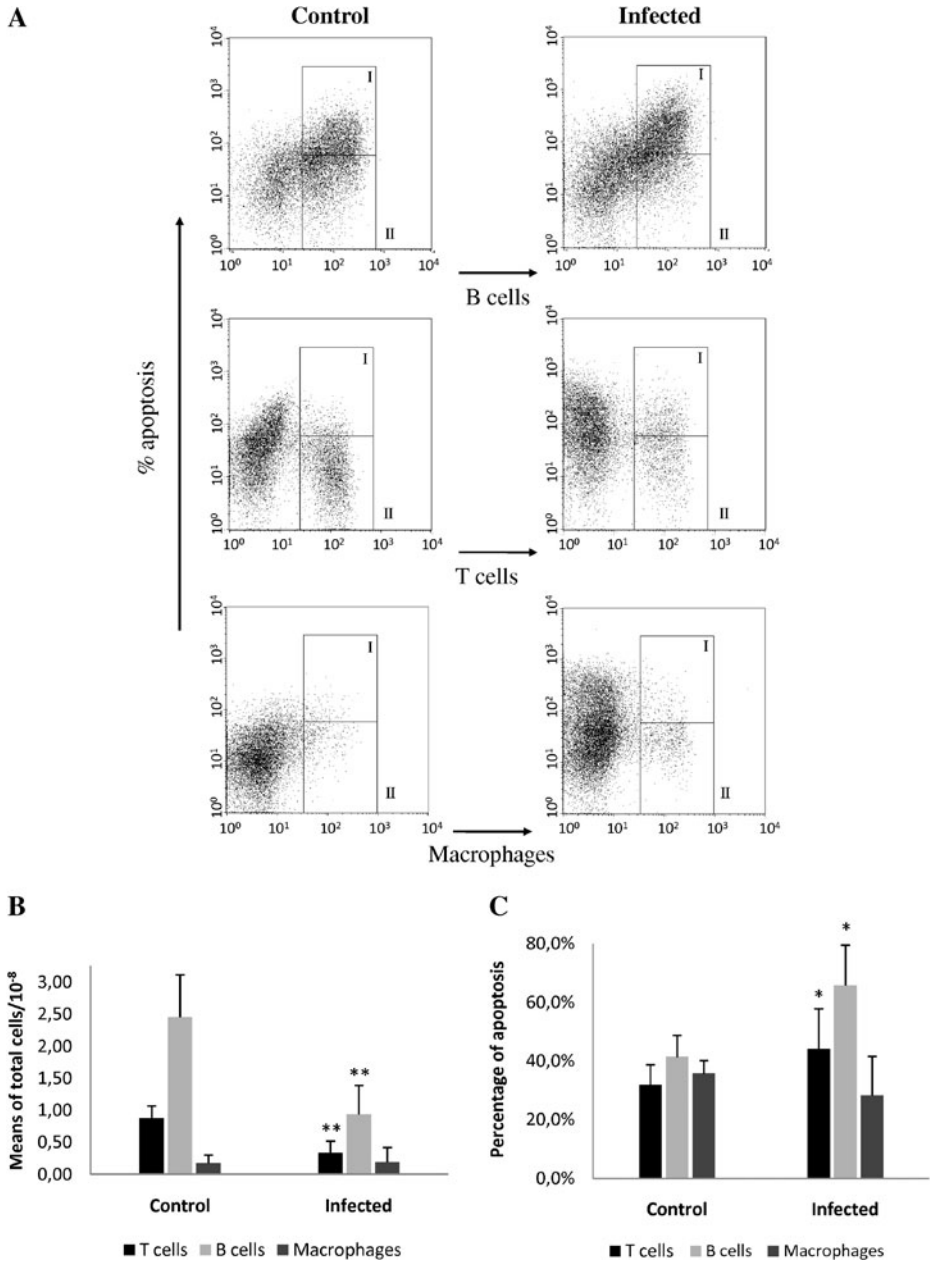


**B**



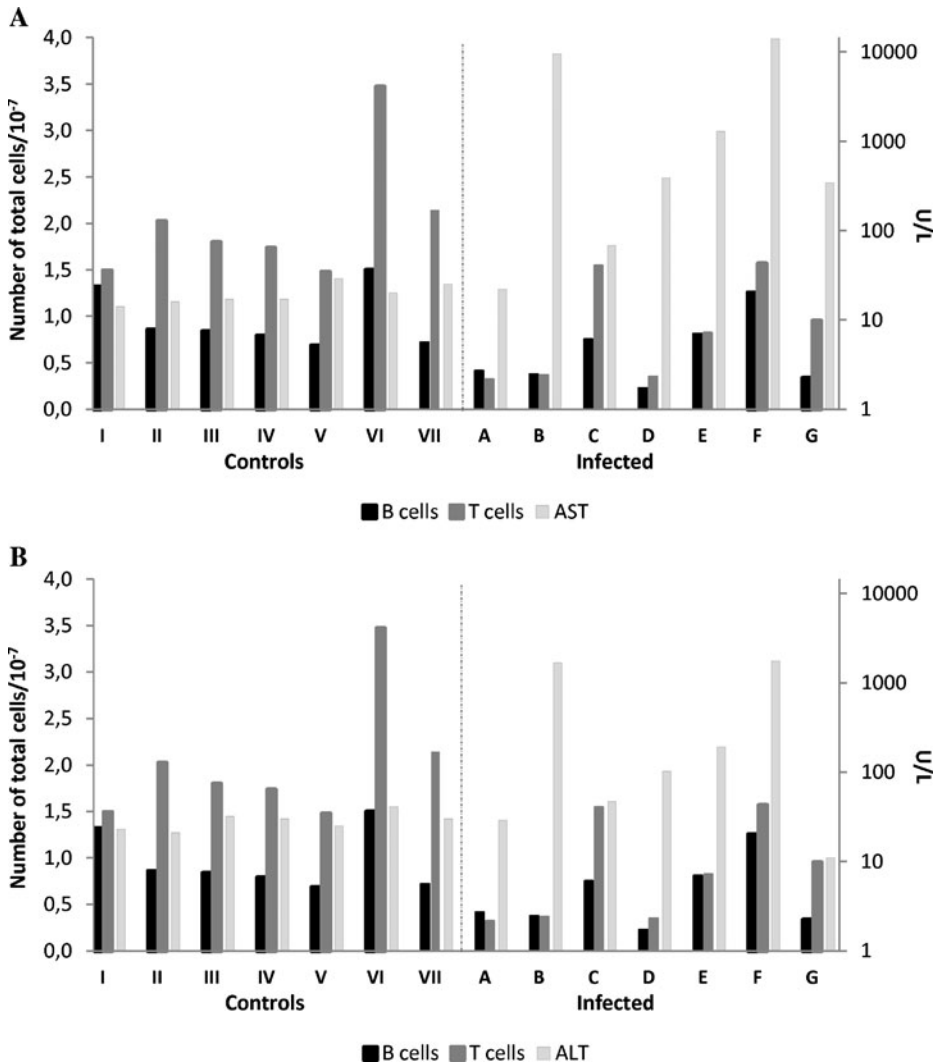
**C**





from 29 to 1749 U/L for ALT. In more detail: 2 of the rabbits (animals A, C in Fig. 1) had low values of transaminases (less than 100 U/L), 3 rabbits (animals D, E and G) presented a moderate value (342–1282 U/L for AST and 11–191 U/L for ALT) and 2 other rabbits (animals B and F) showed high values (above 9000 U/L for AST and 1000 U/L for ALT). Values for controls were below 29 U/L for AST and 41 U/L for ALT (Fig. 1).

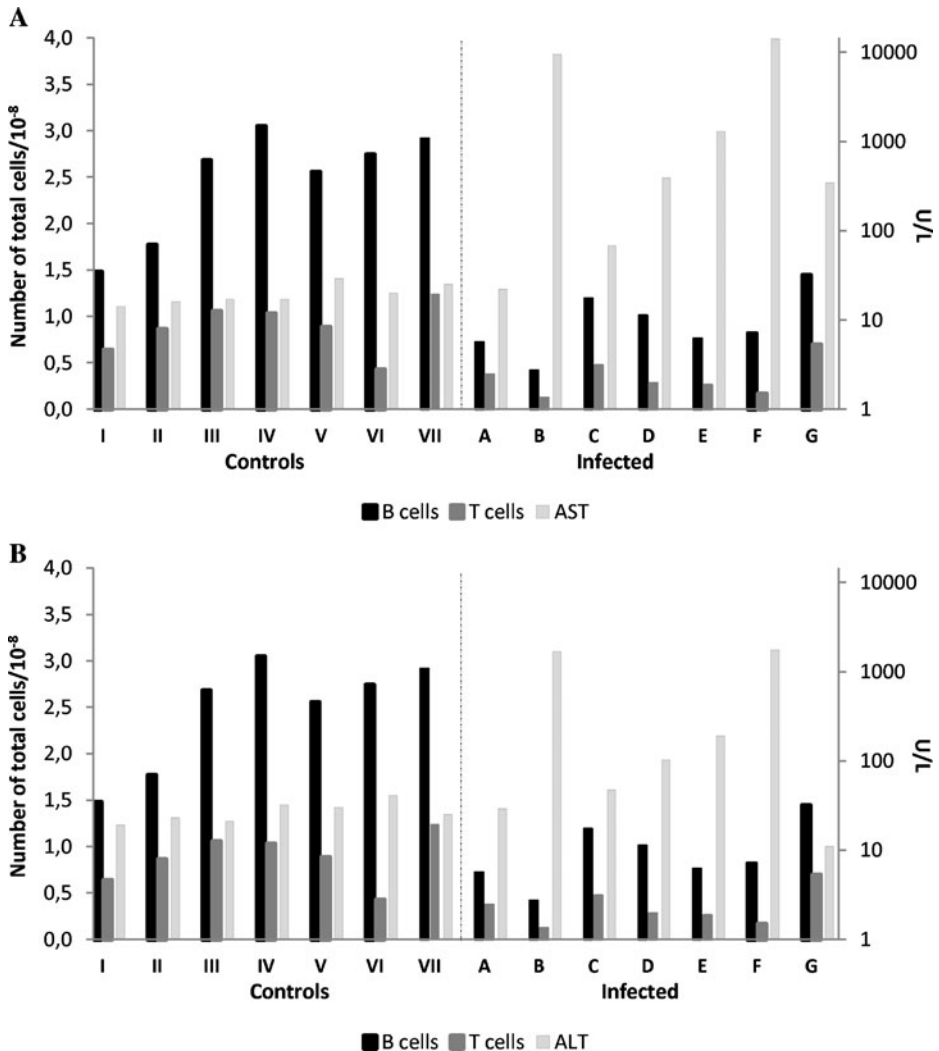
**Fig. 3** **a** Representative flow cytometry dot-plots: the regions identified in the dot-plots as II represent the percentage of positive B cells ( $\text{IgM}^+$ ), T cells and macrophages ( $\text{CD11b}^+$ ) present in the spleen of control and infected adult rabbits, after 24 hours of infection; the regions identified in the dot-plots as I represent the percentage of apoptosis (annexin $\text{V}^+$ ) for each cell population analysed, without excluding the cells labelled annexin $\text{V}^+$ /propidium iodide $^+$ . **b** Comparison of the number of leukocytes (macrophages, B and T lymphocytes) present in the spleen of control and calicivirus-infected adult rabbits, after 24 hours of infection; Mann-Whitney test (\*\*  $p < 0.001$ ). Calicivirus infection of adult rabbits involves a significant decrease of the splenic lymphocytes (B and T cells). **c**. Comparison of the percentage of apoptosis of splenic leukocytes (macrophages, B and T lymphocytes) between control and calicivirus-infected adult rabbits, after 24 hours of infection; Mann-Whitney (\*  $p < 0.05$ ). The significant decrease of splenic B and T cells in infected animals was associated with apoptosis



**Fig. 4** **a** Comparison of the individual AST values with the number of lymphocytes present in the liver of control and infected adult rabbits. There was no correlation between the two parameters. **b** Comparison of the individual ALT values with the number of lymphocytes present in the liver of control and infected adult rabbits. There was no correlation between the two parameters

## Liver and spleen lymphocytes

Infected rabbits showed a significant decrease in the total number of liver and spleen lymphocytes (Figs. 2a, b and 3a, b). This decrease affected both B and T cells. The use of an apoptotic marker (annexin V) revealed that the infection caused a significant increase in the number of B and T cells in an early apoptotic stage in both liver and spleen (Figs. 2a, c and 3a, c). There was no significant difference in the number of late apoptotic/necrotic cells between control and calicivirus-infected adult rabbits.



**Fig. 5** **a** Comparison of the individual AST values with the number of lymphocytes present in the spleen of control and infected adult rabbits. There no correlation between the two parameters. **b** Comparison of the individual ALT values with the number of lymphocytes present in the spleen of control and infected adult rabbits. There was no correlation between the two parameters



## Correlation between lymphocyte depletion and liver damage

Comparison of the individual transaminase values with lymphocyte number in the liver and spleen of infected rabbits showed no correlation between the two parameters, i.e. the rabbits with higher transaminase values were not the animals with the greatest decrease in lymphocyte number and vice versa (Figs. 4 and 5).

## Discussion

We have described before that calicivirus infection causes a significant decrease in the general pool circulating leukocytes of the adult rabbit. We describe now that this leukopenia involves both B and T lymphocytes, and is associated with apoptosis of the white blood cells and precedes the fulminant liver disease that kills the animals.

Previous investigations of ours had indicated that the calicivirus infected-adult rabbits develop severe leukopenia involving both circulating heterophils and lymphocytes (Ferreira et al. 2006a). We show now that lymphocytes are decreased not only in the spleen but also in the target organ of viral replication, the liver. We found that the B and T cell loss was associated with apoptosis. Previous studies on the pathogenesis of RHD were not able to demonstrate the presence of the virus in lymphocytes (Ramiro-Ibáñez et al. 1999). This finding suggests that the apoptosis of B and T-lymphocytes that we observed in both the spleen and the liver could be a bystander effect of the viral infection. It may contribute for the rapid progression of the disease of immune response impairment.

The acute lymphocytes depletion that we have documented in RHD recalls similar data obtain in Ebola hemorrhagic disease, where a significant loss of lymphocytes was reported in the early stage of infection (Baize et al. 2002; Mahanty and Bray 2004; Bradfute et al. 2007). Patients who died from Ebola disease presented defective humoral responses and widespread intravascular apoptosis of T cells. In contrast, patients who have survived Ebola infection were capable of produce an early and strong humoral response (Baize et al. 2002). RHD kills adult rabbits within 2–3 days; therefore the animals do not have enough time to mount an effective immune response against the virus. If rabbits are allowed to produce specific antibodies, before calicivirus infection, they will become resistant to the viral infection (Parra and Prieto 1990; Laurent et al. 1994; Bertagnoli et al. 1996; Ferreira et al. 2008). For instance, it has been proposed that the minority (around 10%) of adult rabbits that survive RHD achieve survival because they develop hepatitis at a relatively slow pace; after recovering from the calicivirus-induced liver disease these rabbits will depict long-term protection from RHD and this is due to circulating anti-calicivirus antibodies (Cooke 2002). This investigation adds a new piece of information on pathogenesis of RHD: in addition to induce the fulminant hepatitis, the virus depletes both B and T lymphocytes, thus impairing the immune response of the host. These changes in leukocytes occurred in rabbits before showing enzymatic evidence of liver damage and persisted after liver transaminases values were very high. We conclude that loss of immune cells precedes or attends liver damage in rabbits submitted to lethal calicivirus infection. The relative contribution of this lymphocyte depletion for the natural history of RHD requires further investigations.

**Acknowledgements** We are grateful to Professor Francisco Parra (University of Oviedo) for the offer of the initial sample of calicivirus suspension that was used to infect the rabbits. We thank Dr. José Carlos Oliveira (Santo António Hospital), Mrs. Maria Júlia Reis (Santo António Hospital) and Mrs. Manuela Silva for excellent technical assistance. This work was funded by grants from FCT, Portugal.

## References

- Baize S, Leroy EM, Georges AJ, Georges-Courbot MC, Capron M, Bedjabaga I, Lansoud-Soukate J, Mavoungou E (2002) Inflammatory responses in Ebola virus-infected patients. *Clin Exp Immunol* 128: 163–168.
- Bertagnoli S, Gelfi J, Petit F, Vautherot JF, Rasschaert D, Laurent S, Le Gall G, Boilletot E, Chantal J, Boucraut-Baralon C (1996) Protection of rabbits against rabbit viral haemorrhagic disease with a vaccinia-RHDV recombinant virus. *Vaccine* 14 (6): 506–510.
- Bradfute SB, Braun DR, Shamblin JD, Geisbert JB, Paragas J, Garrison A, Hensley LE, Geisbert TW (2007) Lymphocyte Death in a Mouse Model of Ebola Virus Infection. *J Infect Dis* 196 (S2): 296–304.
- Cooke BD (2002) Rabbit haemorrhagic disease: field epidemiology and the management of wild rabbit populations. *Rev sci tech Off int Epiz* 2: 347–358.
- Ferreira PG, Costa-e-Silva A, Monteiro E, Oliveira MJR, Águas AP (2004) Transient decrease in blood heterophils and sustained liver damage caused by calicivirus infection of young rabbits that are naturally resistant to rabbit haemorrhagic disease. *Res Vet Sci* 76: 83–94.
- Ferreira PG, Costa-e-Silva A, Oliveira MJR, Monteiro E, Águas AP (2006a) Severe leukopenia and liver biochemistry changes in adult rabbits after calicivirus infection. *Res Vet Sci* 80: 218–225.
- Ferreira PG, Costa-e-Silva A, Oliveira MJR, Monteiro E, Águas AP (2006b) Liver enzymes and ultrastructure in rabbit haemorrhagic disease (RHD). *Vet Res Comm* 30: 393–401.
- Ferreira PG, Dinís M, Costa-e-Silva A, Oliveira MJR, Águas AP (2008) Adult rabbits acquire resistance to lethal calicivirus infection by adoptive transfer of sera from infected young rabbits. *Vet Immuno Immunopathol* 121: 364–69.
- Kotani M, Yamamura Y, Tamatani T, Kitamura F, Miyasaka M (1993) Generation and characterisation of monoclonal antibodies against rabbit CD4, CD5 and CD11a cell surface antigens. *J Immunol Methods* 157: 241–252.
- Laurent S, Vautherot JF, Madelaine MF, Gall G, Rasschaert D (1994) Recombinant Rabbit Hemorrhagic Disease Virus Capsid Protein Expressed in Baculovirus Self-Assembles into Virus like Particles and Induces Protection. *J Virol* 68 (10): 6794–6798.
- Leroy EM, Baize S, Volchkov VE, Fisher-Hoch SP, Georges-Courbot MC, Lansoud-Soukate J, Capro M, Debré P, McCormick JB, Georges AJ (2000) Human asymptomatic Ebola infection and strong inflammatory response. *The Lancet* 355: 2210–2215.
- Mahanty S, Bray M (2004) Pathogenesis of filoviral haemorrhagic fevers. *The Lancet, Infect Dis* 4: 487–498.
- Marcato PS, Benazzi C, Vecchi G, Galleotti M, Della Salda L, Sarli G, Lucidi P (1991) Clinical and pathological features of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 10: 371–392.
- Mitro S, Krauss H (1993) Rabbit hemorrhagic disease: a review with special reference to its epizootiology. *Eur J Epid* 9: 70–78.
- Niedzwiedzka-Rystwej P, Pawlikowska M, Hukowska-Szematowicz B, et al. (2009) Immunological and genetic studies of RHD (rabbit haemorrhagic disease) virus strains. *Central Eur J Immuno* 34 (2):61–67.
- Ohlinger VF, Haas B, Meyers G, Weiland F, Thiel H-J (1990) Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease. *J Virol* 64: 3331–3336.
- Parra F, Prieto M (1990) Purification and characterization of a calicivirus as the causative agent of a lethal hemorrhagic disease in rabbits. *J Virol* 64: 4013–4015.
- Ramiro-Ibáñez F, Martín-Alonso JM, Palencia PG, Parra F, Alonso C (1999) Macrophage tropism of rabbit hemorrhagic disease virus is associated with vascular pathology. *Virus Res* 60: 21–28.
- Shien JH, Shieh HK, Lee LH (2000) Experimental infections of rabbits with rabbit haemorrhagic disease virus monitored by polymerase chain reaction. *Res Vet Sci* 68: 255–259.
- Tokarz-Deptula B, Deptula W (2004) T and B lymphocytes and their subpopulations in peripheral blood in rabbits experimentally infected with Fr-2 strain of viral haemorrhagic disease (VHD) virus. *Bull Vet.Inst Pulawy* 48 (4): 367–370.
- Tokarz-Deptula B, Deptula T (2009) Selected immunological factors in rabbits infected with four strains (Fr-1, Fr-2, SGM, Mal) of the RHD virus (rabbit haemorrhagic disease). *Central Eur J Immuno* 34 (4): 222–226.

## CAPÍTULO 4

---

### **Early inflammatory response of young rabbits attending natural resistance to calicivirus (RHDV) infection**

Marques, R.M., Costa-e-Silva, A., Águas, A.P., Teixeira, L., Ferreira, P.G. (2012), *Veterinary Immunology and Immunopathology* 150 (3-4), 181–188.

Reimpresso com a permissão da *Elsevier*





## Research paper

## Early inflammatory response of young rabbits attending natural resistance to calicivirus (RHDV) infection

R.M. Marques\*, A. Costa-E-Silva, A.P. Águas, L. Teixeira, P.G. Ferreira

Department of Anatomy, ICBAS (Abel Salazar Institute for Biomedical Science) and UMIB (Unit for Multidisciplinary Biomedical Research), University of Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira n.º 228, 4050-313, Portugal

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 9 May 2012

Received in revised form

10 September 2012

Accepted 26 September 2012

## Keywords:

RHD

RHDV

Liver

Spleen

Inflammation

Lymphocytes

Macrophage

Cytokines

## ABSTRACT

Young rabbits (i.e. up to 4 weeks of age) are naturally resistant to infection by rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV), the same calicivirus that kills more than 90% of adult rabbits in 3 days or less. To characterize this fascinating model of age-related natural resistance to viral infection, we have studied the kinetics (from 6 h up to 7 days) of cytokines and of leukocyte subpopulations in the liver (the target organ for calicivirus replication) and spleen (host systemic response) of RHDV infected young rabbits. Infection was associated with early (6 h) elevation of proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-8). We found that all three major leukocyte subpopulations (macrophages, B and T lymphocytes) were increased in the liver 48 h after the RHDV inoculation. At 7 days of infection, B and T lymphocytes were still elevated in the liver of the rabbits. In the spleen, both macrophages and B lymphocytes (but not T cells) were also enhanced. At 7 days, anti-RHDV specific antibodies were present in sera of all young rabbits infected by the virus. We conclude that natural resistance of young rabbits to RHDV infection is associated with a rapid and effective inflammatory response by the liver, with few hepatocytes being infected, and also with a sustained elevation in local and systemic B and T cells.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Rabbit haemorrhagic disease (RHD) is a widespread deadly disease of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) that is caused by a member of the Caliciviridae family of viruses (Ohlinger et al., 1990; Parra and Prieto, 1990; Marcato et al., 1991). RHDV infection has been responsible for the death of millions of rabbits during the last decades, both living in the wild and raised in commercial farms (Mitro and Krauss, 1993; McIntosh et al., 2007). Interestingly, young rabbits (up to 4 weeks of age) do not develop any clinical signs of RHD after RHDV inoculation (Ferreira

et al., 2004). This natural resistance of young rabbits to RHDV infection was already described decade ago during the first outbreaks of this viral disease (Liu et al., 1984). Nonetheless, there is no information on the host inflammatory response that attends the acquisition of resistance to RHDV by young rabbits; this issue is the goal of the herein investigation.

We have reported before that RHDV infected young rabbits showed lymphocytic inflammatory infiltrates in the liver (Ferreira et al., 2005, 2006). We have also shown that infected young rabbits presented specific antiviral antibodies and that these antibodies, upon adoptive transfer, will protect adult rabbits from RHD (Ferreira et al., 2008).

We investigate here the early inflammatory response to RHDV by young rabbits that are naturally resistant to the virus. We document the kinetics, in liver and spleen, of leukocyte subpopulations and of serum cytokines attending experimental RHDV infection of young rabbits, up to

\* Corresponding author at: Department of Anatomy, ICBAS/UP, Rua de Jorge Viterbo Ferreira n.º 228, 4050-313 Porto, Portugal.  
Tel.: +351 220 428 000; fax: +351 222 062 232.

E-mail addresses: [ramarques@icbas.up.pt](mailto:ramarques@icbas.up.pt),  
[ramachado.marques@gmail.com](mailto:ramachado.marques@gmail.com) (R.M. Marques).

7 days of RHDV inoculation. It is likely that this rapid and strong inflammatory response is related with the quite low number of infected cells detected in the liver of young rabbits.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Rabbits

A group of 53, pathogen free, New Zealand White rabbits (*O. cuniculus*) was purchased from a Spanish breeder (Charles River Laboratories España, SA, Spain) and used in this study when the animals were 4 weeks old. These young rabbits and their mothers were tested for seric anti-RHDV antibodies and they were all negative. The rabbits were kept under standard conditions of housing with unrestricted access to food and water; this was done according to the European Union Directive no. 86/609/CEE. The rabbits were attended by veterinary doctors and inspected at least 4 times daily.

### 2.2. Virus

The initial inoculum of RHDV used in our laboratory was a kind offer of Prof. Francisco Parra, University of Oviedo, Spain. Current inocula were produced from liver homogenates from infected rabbits and obtained as previously described by Teixeira et al. (2011). The purified suspension of RHDV had a  $2^{10}$  titre in haemagglutination units (HU).

### 2.3. Infection and collection of biological samples

Infection of young rabbits was done by intramuscularly injection of 100  $\mu$ L of a RHDV suspension diluted in PBS, an inoculum that kills adult rabbits by RHD within 24–48 h of infection (Teixeira et al., 2011). Controls of the infection were injected with 100  $\mu$ L of PBS. Three different kinds of experiments were done:

- (i) The first experiment involved 18 infected young rabbits, used to study by flow cytometry the kinetic of the major subpopulations of mononuclear leukocytes (macrophages, T and B lymphocytes) in liver and spleen. The infected animals were divided in 3 groups of 6 animals and they were euthanized at 24, 48 h and 7 days after the viral inoculation. Six young rabbits were used as controls of the infection. After euthanasia, liver and spleen samples were aseptically collected for flow cytometry analysis; other liver samples were fixed in 10% buffered formalin to search for viral antigens in situ by immunolabelling. Additionally, blood samples were collected from the rabbits euthanized 7 days after infection for titration of anti-RHDV antibodies.
- (ii) The second experiment encompassed 18 infected young rabbits that were used to study the kinetics of the T cells subsets, namely CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells, in liver and spleen by flow cytometry. These animals were divided in 3 groups of 6 animals that were euthanized at 24, 48 h and 7 days after the viral inoculation. Six

other rabbits were used as controls. Liver and spleen samples were aseptically collected for flow cytometry analysis.

- (iii) In the third experiment, 5 infected young rabbits were used for periodic collection of blood in order to evaluate the seric concentration of cytokines and of aspartate aminotransferase (AST; a biochemical marker of hepatic lesion). Blood samples were collected using a catheter introduced in the rabbit marginal ear vein before viral inoculation and also at the following timings: 6 h, 12 h, 18 h, 24 h, 48 h, 72 h and 7 days after the RHDV infection.

All rabbits were euthanized with an intravenous injection of an anaesthetic mixture of xylazine (Rompun®, Bayer Co., Portugal, 3 mg/kg) and ketamine (Imalgène 1000®, Merial, Portugal, 10 mg/kg), 30 min after the intramuscularly administration of morphine (Morfina Labesfal®, Labesfal, Portugal, 5 mg/kg). The vascular system was washed by perfusion, through a cannula inserted in aorta, with a saline solution (40 °C) and then with HEPES solution (0.14 M NaCl; 2.7 mM KCl; 0.28 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O; 10 mM HEPES) at 40 °C.

### 2.4. Isolation of liver mononuclear cells

A 6–7 g of liver samples were aseptically cut and placed in a Potter–Elvehjem homogenizer with 3 mL of a balance salt solution (BSS; 1.26 mM CaCl<sub>2</sub>; 5.4 mM KCl; 0.44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.49 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 0.40 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0.14 M NaCl and 0.63 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) where they were gently mechanically disrupted (the homogenization was performed at low rotation to minimize cell rupture). The resulting cell suspension was divided into two equal aliquots and transferred to 50 mL falcon tubes; BSS was then added to complete a total volume of 100 mL. The cell suspension was filtered through sterile glass pipettes with nylon gauze in order to remove cellular aggregates and tissue debris. The filtrate was washed by centrifugation at 280  $\times$  g for 10 min at 4 °C. Pellets were resuspended in 10 mL of BSS. For mononuclear cells isolation, 5 mL of the suspension were carefully layered on 2.5 mL of Percoll (Histopaque1077 – Sigma) and centrifuged at 1000  $\times$  g for 15 min at room temperature (Centrifuge Hoefer Labofuge 300). The layer formed between the BSS and the Percoll layers was collected and transferred to a 15 mL Falcon Flask. The cell suspension was washed by centrifugation at 280  $\times$  g for 10 min and the pellet was resuspended in 5 mL of BSS. Cells were stained with Turk's reagent and counted by light microscopy in a Neubauer chamber (dilution 1:10).

### 2.5. Isolation of spleen mononuclear cells

Spleen cells were obtained by gentle smearing of the organ in a sterile plate with 10 mL of BSS solution. Cells were washed with BSS by centrifugation at 280  $\times$  g for 10 min at 4 °C (Centrifuge Sigma 3–16K). The pellet was resuspended in 5 mL of ACK solution (0.15 M NH<sub>4</sub>Cl, 1 mM KHCO<sub>3</sub> and 0.1 mM EDTA, pH 7.2) and incubated for 2–3 min on ice for red blood cell lysis. Five millilitres of BSS were added to the suspension that was centrifuged

at  $280 \times g$  for 5 min. The pellet was resuspended in 5 mL of BSS. Cells were stained with Turk's reagent and then counted by light microscopy in a Neubauer chamber (dilution 1:10).

## 2.6. Flow cytometry analysis

Mononuclear cells, isolated from liver and spleen, were added to cytometry tubes ( $2 \times 10^6$  cells/tube); 400  $\mu$ L of PBS supplemented with 1% BSA and sodium azide (10 mM) were added to each tube. The cells were washed by centrifugation at  $280 \times g$  for 10 min at room temperature. Immunofluorescence cytometry analysis of cell surface antigens was performed in a FACScan with CellQuest software, using the following antibodies: FITC-conjugated goat polyclonal antibody anti-rabbit IgM (Serotec), for the analysis of B cells; FITC-conjugated mouse monoclonal antibody anti-rabbit T-lymphocytes (Serotec; clone: KEN-5) that recognizes T cells; FITC-conjugated monoclonal antibody anti-mouse CD11b MAC-1 $\alpha$  (BD Pharmingen; clone: M1/70), for the analysis of macrophages; FITC-conjugated monoclonal antibody anti-rabbit CD4 (Serotec; clone: KEN-4); FITC-conjugated monoclonal antibody anti-rabbit CD8 (Serotec; clone: 12.C7); FITC mouse IgG1 negative control (Serotec), as isotype control of T cells and CD8 $^+$  T cells; FITC rat IgG2b,  $\kappa$  isotype control (BD Pharmingen), for macrophages and FITC mouse IgG2a (Serotec), as isotype control of CD4 $^+$  T cells. Cells were gated first by size and granularity and then by FITC staining. Dead cells were gated out using propidium iodide incorporation. For the calculation of the total number of cells, we have used the following formula: (cellular concentration, cells/mL  $\times$  volume of the cell suspension, mL)  $\times$  percentage of positive cells.

## 2.7. Immunocytochemistry of RHDV antigen in liver

Samples of liver of infected and control rabbits were collected for immunocytochemical detection of RHDV antigen by light microscopy. These liver fragments were fixed by 10% buffered formalin, dehydrated through graded alcohols and xylene and embedded in paraffin wax by standard methods. Sections (3  $\mu$ m thick) of liver were cut and stained using the modified avidin–biotin–peroxidase complex (ABC) method (Teixeira et al., 2005). Endogenous peroxidase was blocked by 3% hydrogen peroxide in methanol for 10 min. After washing in PBS, the sections were incubated for 20 min in a humid chamber with normal rabbit serum diluted 1:5 in 10% BSA, to block non-specific binding. The sections were then incubated overnight at 4°C with an anti-VP60 mouse antiserum diluted 1:1000 in 5% BSA (VP60-antiserum was previously prepared in our laboratory by hyperimmunizing BALB/c mice with the RHDV VP60 protein; the animals were twice injected intradermally with 5  $\mu$ g of VP60, with a 2 week interval between injections). Liver tissue was incubated for 30 min with a biotin-labelled anti-mouse secondary antibody (Dako) diluted 1:200 in 5% BSA followed by incubation in an avidin–biotin–peroxidase complex (ABC) (VectaStain) for 30 min. Finally, the tissue sections were incubated in diaminobenzidine (Dako) during 7 min for

colour development. Tissue sections were counterstained with haematoxylin; dehydrated slides were mounted in Entellan and observed by light microscopy.

## 2.8. Detection of seric anti-RHDV antibodies

An ELISA was performed to determine the serum titre of anti-RHDV antibodies in young rabbits. The assay was performed according to the manufacturer's instructions (INGEZIM RHDV 17.RHD.K1 kit, Ingenasa).

## 2.9. Evaluation of serum cytokines and aspartate aminotransferase (AST)

An ELISA was performed to evaluate the serum titres of the following cytokines: TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-8, IL-6 and IL-10, before viral inoculation and on the following timings: 6 h, 12 h, 18 h, 24 h, 48 h, 72 h and 7 days after RHDV infection. The cytokine ELISAs were performed according to the manufacturer's instructions (ELISA Kit, Uscn Life Science Inc.). AST serum levels were measured by spectrophotometric methods (Cobas Integra 800, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) at the same timings.

## 2.10. Statistical analysis

Statistical comparison of data from all groups of rabbits was performed using an unpaired *t*-test, calculated with GraphPad Prism, version 5.0a, software. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

# 3. Results

## 3.1. Leukocyte kinetics in liver and spleen

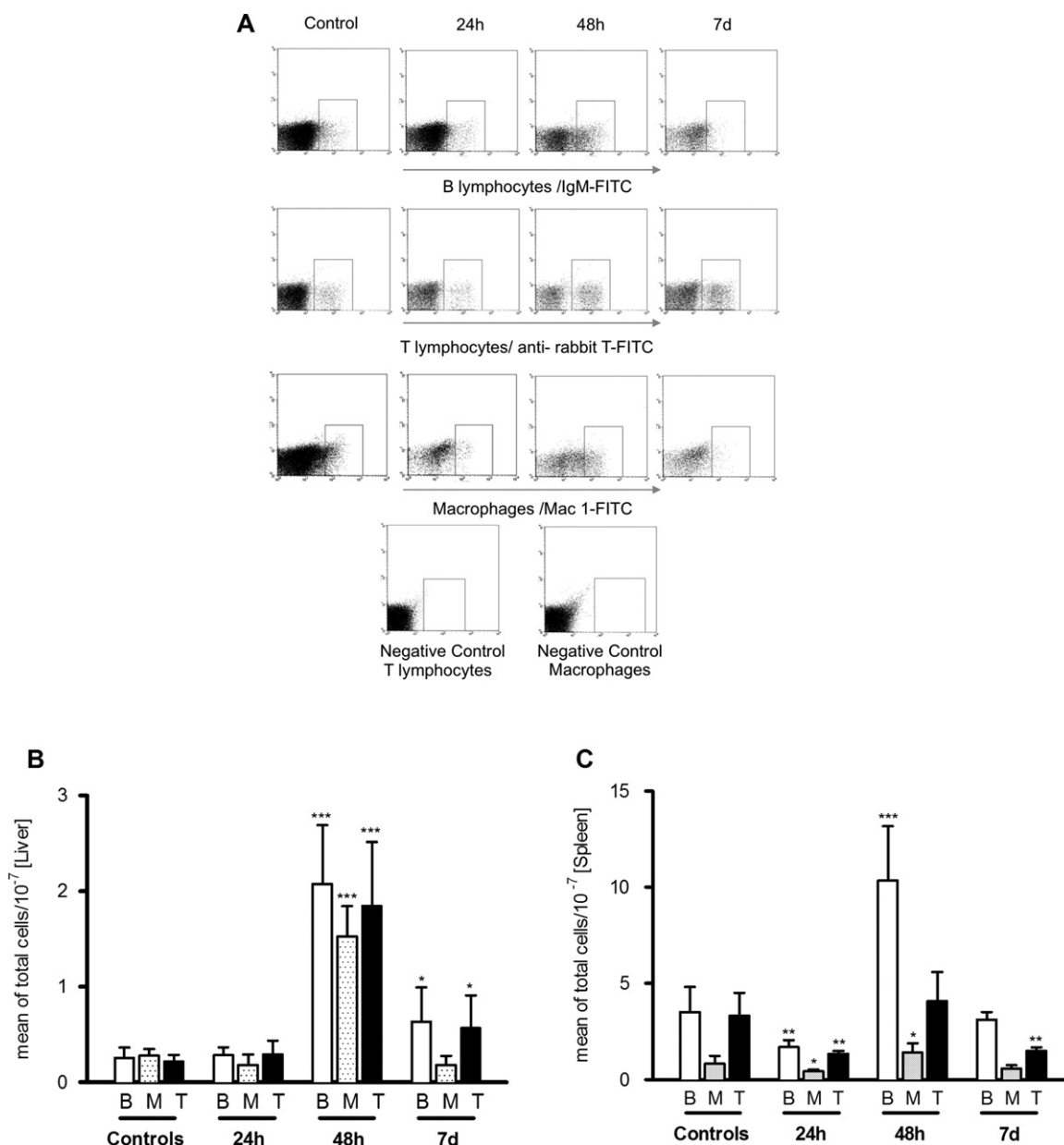
Liver leukocyte number was unchanged at 24 h of RHDV infection (Fig. 1B). Liver macrophages, B and T lymphocytes, all were increased at 48 h of infection. Both B and T cells were still enhanced in the liver of rabbits at 7 days of infection. A mild decrease in the number of splenic macrophages, B and T cells was observed 24 h after infection; this early decline was followed by a significant increase in B lymphocytes and in macrophages at 48 h (Fig. 1C).

## 3.2. Liver and spleen CD4 $^+$ and CD8 $^+$ T lymphocytes

The CD8 $^+$  T lymphocytes were increased in the liver of the rabbits 24 h after the RHDV infection; later on, both CD4 $^+$  and CD8 $^+$  T subsets were enhanced in the liver of rabbits up to 7 days of infection (Fig. 2A). In the spleen, only CD4 $^+$  T cells were transiently increased after infection (Fig. 2B).

## 3.3. Immunocytochemistry of RHDV antigen in liver

Immunoperoxidase detection of the RHDV antigen was performed in liver sections of infected and control young rabbits. Control rabbits showed no positive staining for the RHDV antigen. Only a few RHDV-positive cells were



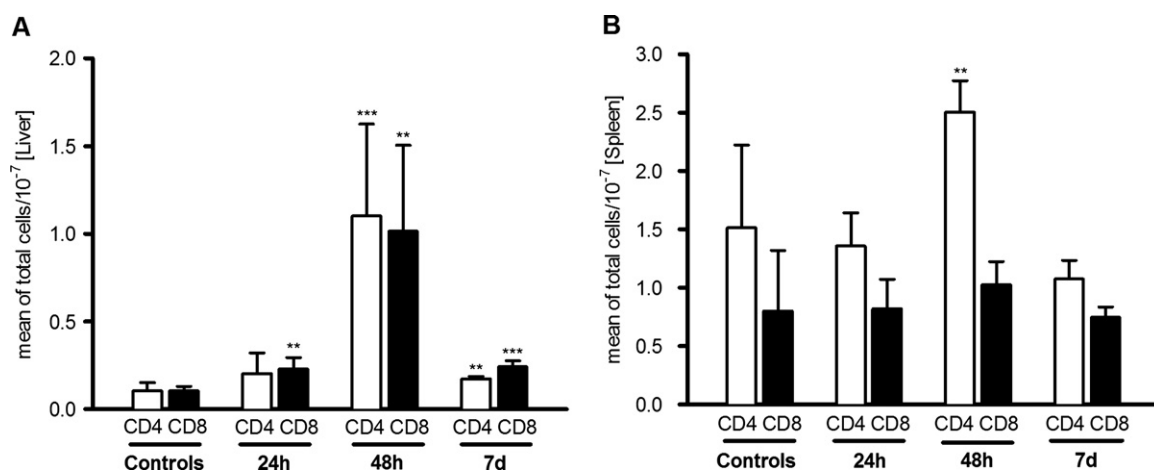
**Fig. 1.** Kinetics of macrophages (M), B and T lymphocytes in the liver (B in the figure) and spleen (C in the figure) of young rabbits infected with RHDV. (A) Representative flow cytometry dot plots showing the percentage of B lymphocytes (IgM<sup>+</sup>), T lymphocytes and macrophages (CD11b<sup>+</sup>) present in the liver of control and infected young rabbits at different time points after inoculation. Representative flow cytometry dot plots of the isotype controls of T lymphocytes and macrophages are also shown. (B) Comparison of the number of leukocytes present in the liver of control ( $n=6$ ) and RHDV infected ( $n=6$ ) young rabbits 24, 48 h and 7 days after infection; unpaired  $t$ -test (\* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.0001$ ). The viral infection caused significant increase in liver lymphocytes and macrophages at 48 h and 7 days. (C) Comparison of the number of leukocytes present in the spleen of control ( $n=6$ ) and RHDV infected ( $n=6$ ) young rabbits 24, 48 h and 7 days after infection; unpaired  $t$ -test (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$ ; \*\*\* $p < 0.0001$ ). The viral infection caused an initial decrease in splenic leukocytes, followed by increase in B lymphocytes and macrophages (at 48 h).

detected in livers of the calicivirus infected rabbits. Inflammatory infiltrates were often associated with these positive hepatocytes (Fig. 3A and B). Virus-positive Kupffer cells were seen both at 48 h and 7 days after infection. Morphological evidence for liver regeneration was observed at 7 days of infection: hepatocytes with double nuclei were now often detected; they were located in areas of inflammatory mononuclear infiltrates (Fig. 3C).

### 3.4. AST levels in sera

The severity of liver damage was evaluated by seric concentration of the intracellular liver enzyme, aspartate aminotransferase (AST). Infected young rabbits showed a mild and transient increase of serum AST concentration (18–78 U/L) during the acute phase of infection (24–72 h). This enhancement in circulating





**Fig. 2.** (A) Comparison of the two major T lymphocytes subsets (CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells) present in the liver of control ( $n = 6$ ) and RHDV infected ( $n = 6$ ) young rabbits 24, 48 h and 7 days after infection; unpaired  $t$ -test (\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\* $p < 0.0001$ ). There is a sustained enhancement in both T lymphocytes subsets in the liver of infected rabbits. (B) Comparison of the same T lymphocytes subsets in the spleen of control ( $n = 6$ ) and RHDV infected ( $n = 6$ ) young rabbits after 24, 48 h and 7 days of infection; unpaired  $t$ -test (\*\* $p < 0.001$ ). There is a significant increase in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes 48 h after infection.

liver enzyme disappeared at 7 days of infection (Fig. 4).

### 3.5. Anti-RHDV antibodies

ELISA confirmed that infected young rabbits presented significant titres of circulating anti-RHDV antibodies, with values ranging between 160 and 1280; they were distributed as follows: 160 ( $n = 1$ ), 320 ( $n = 1$ ), 640 ( $n = 2$ ) and 1280 ( $n = 2$ ). The control group was negative for circulating anti-RHDV antibodies.

### 3.6. Cytokines in sera

The kinetics of several proinflammatory (TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-8 and IL-6) and an anti-inflammatory cytokine (IL-10) was determined in sera of infected young rabbits. TNF- $\alpha$  showed a marked increase upon infection that peaked at 48 h (Fig. 5A). IL-6 concentration was also enhanced up to 24 h after infection (Fig. 5E), and remained elevated 7 days after the viral inoculation. Both IL-1 (Fig. 5B) and IFN- $\alpha$  (Fig. 5C) showed significant increases until 18 h after infection but rebounded to normal values at 24 h. IL-8 concentration showed a mild enhancement at 24 h after infection that was still present at 7 days (Fig. 5F). IFN- $\gamma$  and IL-10 concentrations were unaltered in sera of infected young rabbits (Fig. 5D and G).

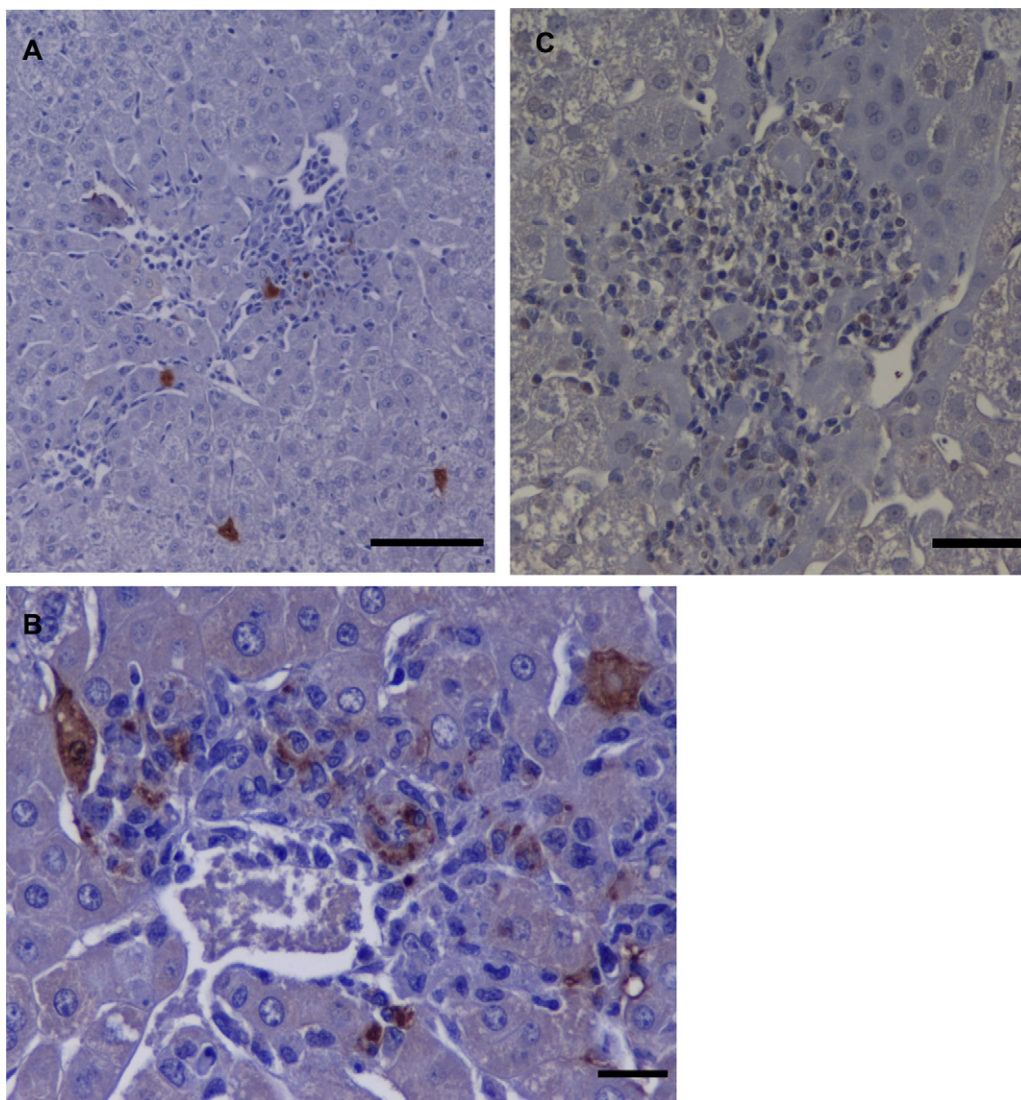
## 4. Discussion

Young rabbits show no signs of disease after RHDV infection and will acquire long-term resistance to the virus as a result of an early contact with the microorganism (Liu et al., 1984; Ferreira et al., 2005, 2008). This age-related natural resistance of rabbits to RHDV infection is in contrast with the more than 90% mortality shown by naïve adult rabbits upon infection by the same inoculum of this calicivirus (Liu et al., 1984; Ferreira et al., 2008). Our own experience with this infection indicates that the

susceptibility of rabbits to the virus increases gradually between 4 and 8 weeks of age, when most rabbits will start dying from the infection. Thus, the young rabbit (4 weeks-old or less) is an elective model to study age-related natural resistance to a viral infection that is lethal in adulthood and innocuous in childhood of the same host. This fascinating feature of rabbit RHDV infection led us to investigate the leukocyte and cytokine response that attend the natural resistance of the young rabbits to the virus.

We report here that young rabbits show a fast and strong inflammatory response to the virus in the liver, the target organ of RHDV replication. Interestingly, this phenomenon was accompanied by a systemic B cell response that was already measured in the spleen at 48 h of infection. Furthermore, the changes in the kinetics of these lymphocytic subpopulations suggest that there is a sustained T cell response in the liver and spleen associated with the infection in young rabbits.

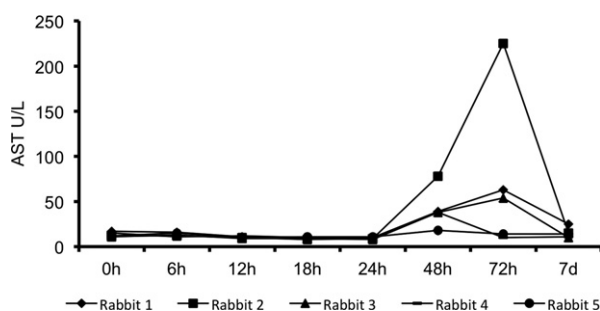
B lymphocytes were elevated in liver and spleen as early as 48 h after the viral infection. This is a too early timing of infection for the B-cell response to be engaged in the production of specific antibodies. Thus, it is conceivable that this B-cell expansion may correspond to the virus having the ability to induce an early polyclonal activation of B lymphocytes, as it often occurs with infectious agents (Coutelier et al., 1990; Ferreira et al., 1997; Teixeira et al., 2005; Madureira et al., 2007). In fact, most infections start by a transient polyclonal B cell activation that is followed by the focusing in host response on the production of specific antimicrobial or antiviral antibodies. Thus, it is plausible to consider that our finding of an early B cell response of young rabbits to RHDV may precede secretion of virus specific antibodies, which is supported by our detection of specific anti-RHDV antibodies 7 days after the viral inoculation. These results confirm our previous report, using adoptive transfer of antibodies, that RHDV infection of young rabbits is associated with the production of specific antiviral antibodies that are protective against RHDV infection of adult rabbits (Ferreira et al., 2008). Macrophages were increased



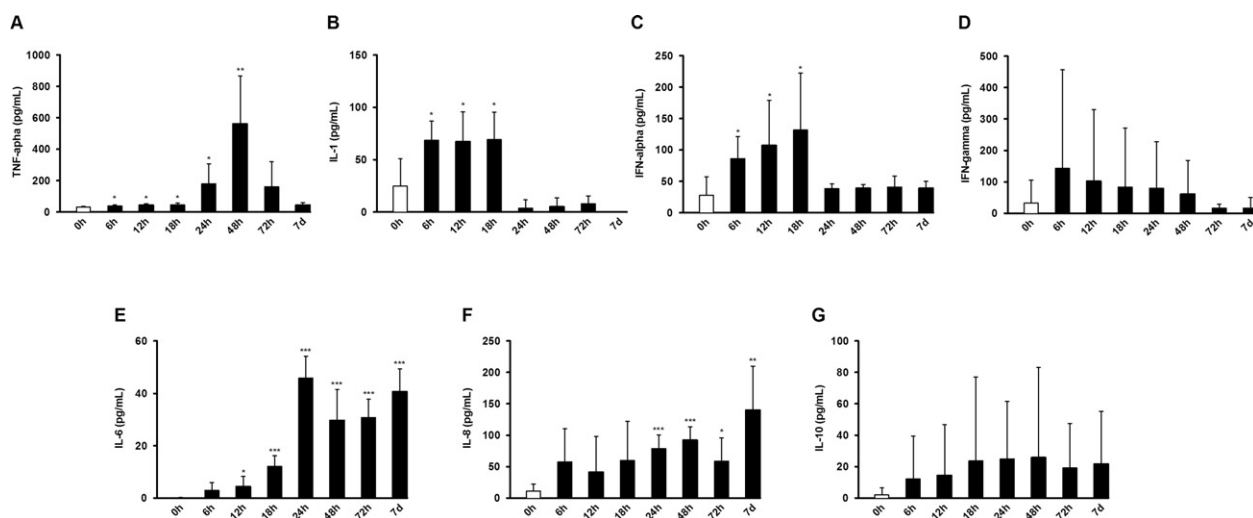
**Fig. 3.** Light micrographs of liver paraffin sections of RHDV infected young rabbits with viral antigen labelled by immunoperoxidase. (A) Only scattered hepatocytes are positive for the virus; the two RHDV-positive hepatocytes seen at the centre of the figure are associated with inflammatory infiltrates made of mononuclear cells (lymphocytes and macrophages). Bar = 100  $\mu$ m. (B) RHDV-positive hepatocytes are associated with an inflammatory infiltrate; several macrophages also stain positively for the viral antigen. Bar = 20  $\mu$ m. (C) RHDV-positive cells, an inflammatory infiltrate and hepatocytes with double nuclei seen 7 days after infection. Bar = 50  $\mu$ m.

in rabbit liver and spleen after infection, a finding that is likely to be related with their role in promoting clearance of viral particles and antigen-presentation to immune cells (Lang et al., 2010).

Prieto et al. (2000) and Mikami et al. (1999) have reported before that viral antigens were present only in a few hepatocytes of infected young rabbits, namely in liver cells located nearby inflammatory infiltrates. Our immunocytochemistry data confirmed these previous reports and thus suggest that young rabbits activate an early inflammatory reaction against RHDV that results in only a scarce number of hepatocytes being infected by the virus. In addition, we have observed signs of hepatocyte regeneration 7 days after viral infection. This was associated with areas where the few infected hepatocytes were seen, thus



**Fig. 4.** Individual kinetics of blood values of AST of each of the 5 young rabbits that were submitted to RHDV infection and to periodic collection of blood samples. The data show that liver damage starts between 24 and 48 h and is reversible.



**Fig. 5.** Serum values of different inflammatory cytokines in RHDV infected young rabbits. The kinetics of the cytokines is depicted in separate graphics: TNF- $\alpha$  (A); IL-1 (B); IFN- $\alpha$  (C); IFN- $\mu$  (D); IL-6 (E); IL-8 (F); IL-10 (G). In all cases the data were derived from 5 young rabbits; unpaired t-test (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$ ; \*\*\* $p < 0.0001$ ).

indicating an effective anti-viral response against RHDV infection by young rabbits. It is pertinent to recall that in RHDV infected adult rabbits a large number of virus-positive hepatocytes are diffusely scattered throughout the hepatic parenchyma (Prieto et al., 2000).

In young rabbits, TNF- $\alpha$  showed a moderate increase at 6 h of RHDV infection that peaked at 48 h, suggesting the development of an adequate inflammatory response. This contrasts with the massive enhancement in TNF- $\alpha$  reported in infected adult rabbits (Sánchez-Campos et al., 2004; García-Lastra et al., 2010). Infected young rabbits also presented an early and significant increase of IFN- $\alpha$  and IL-1, which was maintained until 18 h after infection. IFN- $\alpha$  is a cytokine associated with antiviral activity, and IL-1, in some viral hepatitis (such as human hepatitis B and C), enhances the expression of the IFN gene, and inhibits viral replication (Daniels et al., 1990; Zhu and Liu, 2003). This antiviral activity of IL-1, in association with IFN- $\alpha$ , is likely to be present in young rabbits infected with RHDV. IL-6 was elevated both during acute phase (24–48 h) of infection and at 7 days after inoculation. IL-6 may stimulate both inflammation and liver regeneration: it was shown to induce acute phase protein synthesis by hepatocytes in hepatitis B (García-Lastra et al., 2010), and to trigger liver regeneration, via IL-6/Stat3 pathway (Taub, 2003). IL-8 is a strong chemoattractant of neutrophils and T cells (Taub et al., 1996); its increase in RHDV infected young rabbits may favour leukocyte migration to the local of infection, as we have found in liver sections.

Because young rabbits are breastfed up to 4 weeks of age, the same timing when totally resistance to RHDV ends, it is pertinent that future studies will consider whether a protective soluble factor is transmitted by the mother to the young rabbits during nursing.

## Acknowledgements

We are grateful to Prof. Francisco Parra (University of Oviedo) for the offer of the initial sample of RHDV

suspension that was used to infect the rabbits. We thank Dr. Madalena Costa and Ms. Manuela Silva for excellent technical assistance. We are also grateful to Dr. Alexandra Correia for her kind offer of the BALB/c mice which were used for the production of anti-VP60 antibodies. This work was funded by FCT – Portugal, grant no. PTDC/CVT/66656/2006, COMPETE and FEDER. Luzia Teixeira was supported by Fundo Social Europeu and MCTES through POPH-QREN-Tipologia 4.2.

## References

- Coutelier, J.P., Coulie, P.G., Wauters, P., Heremans, H., van der Logt, J.T.M., 1990. In vivo polyclonal B-lymphocyte activation elicited by murine viruses. *J. Virol.* 64, 5383–5388.
- Daniels, H.M., Meager, A., Eddleston, A.L., Alexander, G.J., Williams, R., 1990. Spontaneous production of tumour necrosis factor alpha and interleukin-1 beta during interferon-alpha treatment of chronic HBV infection. *Lancet* 335, 875–877.
- García-Lastra, R., San-Miguel, B., Crespo, I., Jorquera, F., Alvarez, M., González-Gallego, J., Tuñón, M.J., 2010. Signaling pathways involved in liver injury and regeneration in rabbit hemorrhagic disease, an animal model of virally-induced fulminant hepatic failure. *Vet. Res.*, 41.
- Ferreira, P., Brás, A., Tavares, D., Vilanova, M., Ribeiro, A., Videira, A., Arala-Chaves, M., 1997. Purification and biochemical and biological characterization of an immunosuppressive and lymphocyte mitogenic protein secreted by *Streptococcus sobrinus*. *Int. Immunol.* 9, 1735–1743.
- Ferreira, P.G., Costa-e-Silva, A., Monteiro, E., Oliveira, M.J.R., Monteiro, E., Águas, A.P., 2004. Transient decrease in blood heterophils and sustained liver damage caused by RHDV infection of young rabbits that are naturally resistant to rabbit haemorrhagic disease. *Res. Vet. Sci.* 76, 83–94.
- Ferreira, P.G., Costa-e-Silva, A., Oliveira, M.J.R., Monteiro, E., Águas, A.P., 2005. Leukocyte–hepatocyte interaction in RHDV infection: differences between rabbits that are resistant or susceptible to rabbit haemorrhagic disease (RHD). *Vet. Immun. Immunopathol.* 10, 217–221.
- Ferreira, P.G., Costa-e-Silva, A., Águas, A.P., 2006. Liver disease in young rabbits infected by a RHDV through nasal and oral routes. *Res. Vet. Sci.* 83, 362–365.
- Ferreira, P.G., Dinís, M., Costa-e-Silva, A., Oliveira, M.J.R., Águas, A.P., 2008. Adult rabbits acquire resistance to lethal RHDV infection by adoptive transfer of sera from infected young rabbits. *Vet. Immun. Immunopathol.* 121, 364–369.
- Lang, P.A., Recher, M., Honke, N., Scheu, S., Borkens, S., Gailus, N., Krings, C., Meryk, A., Kulawik, A., Cervantes-Barragan, L., Van Rooijen, N., Kalinke,

- U., Ludewig, B., Hengartner, H., Harris, N., Häussinger, D., Ohashi, P.S., Zinkernagel, R.M., Lang, K.S., 2010. Tissue macrophages suppress viral replication and prevent severe immunopathology in an interferon-I-dependent manner in mice. *Hepatology* 52, 25–32.
- Liu, S.J., Xue, H.P., Pu, B.Q., Qian, N.H., 1984. A new disease in rabbits. *Ann. Husb. Vet. Med.* 16, 253–255.
- Madureira, P., Baptista, M., Vieira, M., Magalhães, V., Camelo, A., Oliveira, L., Ribeiro, A., Tavares, D., Trieu-Cuot, P., Vilanova, M., Ferreira, P., 2007. *Streptococcus agalactiae* GAPDH is a virulence-associated immunomodulatory protein. *J. Immunol.* 178, 1379–1387.
- Marcato, P.S., Benazzi, C., Vecchi, G., Galleotti, M., Della Salda, L., Sarli, G., Lucidi, P., 1991. Clinical and pathological features of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 10, 371–392.
- McIntosh, M.T., Behan, S.C., Mohamed, F.M., Lu, Z., Moran, K.E., Burrage, T.G., Neilan, J.G., Ward, G.B., Botti, G., Capucci, L., Metwally, S.A., 2007. A pandemic strain of calicivirus threatens rabbit industries in the Americas. *Virology* 4, 4.
- Mikami, O., Park, J.H., Kimura, T., Ochiai, K., Itakura, C., 1999. Hepatic lesions in young rabbits experimentally infected with rabbit haemorrhagic diseases virus. *Res. Vet. Sci.* 66, 237–242.
- Mitro, S., Krauss, H., 1993. Rabbit hemorrhagic disease: a review with special reference to its epizootiology. *Eur. J. Epidemiol.* 9, 70–78.
- Ohlinger, V.F., Haas, B., Meyers, G., Weiland, F., Thiel, H.-J., 1990. Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease. *J. Virol.* 64, 3331–3336.
- Parra, F., Prieto, M., 1990. Purification and characterization of a RHDV as the causative agent of a lethal hemorrhagic disease in rabbits. *J. Virol.* 64, 4013–4015.
- Prieto, J.M., Fernandez, F., Alvarez, V., Espi, A., Garcia-Marín, J.F., Alvarez, M., Parra, F., 2000. Immunohistochemical localisation of rabbit haemorrhagic disease virus VP-60 antigen in early infection of young and adult rabbits. *Res. Vet. Sci.* 68, 181–187.
- Sánchez-Campos, S., Álvarez, M., Culebras, J.M., González-Gallego, J., Tuñón, M.J., 2004. Pathogenic molecular mechanisms in an animal model of fulminant hepatic failure: rabbit hemorrhagic viral disease. *J. Lab. Clin. Med.* 144, 215–222.
- Taub, D.D., Anver, M., Oppenheim, J.J., Longo, D.L., Murphy, W.J., 1996. T lymphocyte recruitment by interleukin-8 (IL-8). *J. Clin. Invest.* 97, 1931–1941.
- Taub, R., 2003. Hepatoprotection via the IL-6/Stat3 pathway. *J. Clin. Invest.* 112, 978–980.
- Teixeira, L., Marques, A., Meireles, C.S., Seabra, A.R., Rodrigues, D., Madureira, P., Faustino, A.M., Silva, C., Ribeiro, A., Ferreira, P., Correia da Costa, J.M., Canada, N., Vilanova, M., 2005. Characterization of the B-cell immune response elicited in BALB/c mice challenged with *Neospora caninum* tachyzoites. *Immunology* 116, 38–52.
- Teixeira, L., Marques, R.M., Águas, A.P., Ferreira, P.G., 2011. A simple and rapid method for isolation of RHDV from liver of infected rabbits. *Res. Vet. Sci.* 91, 164–166.
- Zhu, H., Liu, C., 2003. Interleukin-1 inhibits hepatitis C virus subgenomic RNA replication by activation of extracellular regulated kinase pathway. *J. Virol.* 77, 5493–5498.

## CAPÍTULO 5

---

### **Regulatory T cells are decreased in acute RHDV lethal infection of adult rabbits**

Teixeira, L., Marques, R.M., Águas, A.P., Ferreira, P.G. (2012), *Veterinary Immunology and Immunopathology* 148 (3-4): 343-347.

Reimpresso com a permissão da *Elsevier*







## Short communication

## Regulatory T cells are decreased in acute RHDV lethal infection of adult rabbits

Luzia Teixeira<sup>a,b,\*</sup>, Raquel M. Marques<sup>a,b</sup>, Artur P. Águas<sup>a,b</sup>, Paula G. Ferreira<sup>a,b</sup><sup>a</sup> Departamento de Anatomia, ICBAS, Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto, Portugal<sup>b</sup> UMIB, Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica, Largo Abel Salazar 2, 4099-003 Porto, Portugal

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 16 December 2011

Received in revised form 16 April 2012

Accepted 2 May 2012

## Keywords:

RHD

Foxp3

RHDV

Regulatory T cells

## ABSTRACT

Rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) is the etiologic agent of rabbit hemorrhagic disease (RHD), an acute lethal infection that kills 90% of adult rabbits due to severe acute liver inflammation. Interestingly, young rabbits are naturally resistant to RHDV infection. Here, we have compared naturally occurring CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells (Tregs) between young and adult rabbits after infection by RHDV. The number and frequency of Tregs was decreased in the spleen of adult rabbits 24 h after the RHDV infection; this was in contrast with the unchanged number and frequency of splenic Tregs found in young rabbits after the same infection. Also, serum levels of IL-10 and TGF- $\beta$  were enhanced in the infected adult rabbits whereas no alteration was observed in infected young rabbits. However, this increase is accompanied by a burst of pro-inflammatory cytokines, but seems not able to prevent the death of the animals with severe acute liver inflammation in few days after infection. Since Tregs downregulate inflammation, we conclude that their decrease may contribute to the natural susceptibility of adult rabbits to RHDV infection.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) is a positively stranded RNA virus responsible for an acute lethal disease (RHD, rabbit hemorrhagic disease) that plagues the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) worldwide (Ohlinger et al., 1993): approximately 90% of adult rabbits die within 24–72 h of RHDV infection (Ferreira et al., 2006). RHD is characterized by severe necrotizing hepatitis, disseminated intravascular coagulation and bleeding in several organs (Fuchs and Weissenböck, 1992). In contrast with adult rabbits, young animals are naturally resistant to

RHDV infection. Therefore, looking for differences in the immune response between young and adult rabbits at early time points after RHDV infection may help to explain the lethality of this viral infection in adult rabbits. So far, comparative studies using young and adult rabbits have shown that: (i) few hepatocytes are infected by the virus in young rabbits (Mikami et al., 1999; Prieto et al., 2000), while in adult rabbits the virus is detected in several hepatocytes 24 h after infection (Jung et al., 2000; Prieto et al., 2000); (ii) a transient decrease in blood heterophils is observed in young rabbits early after infection (Ferreira et al., 2004) while adult rabbits depict a severe leukopenia as a result of marked decreases in both heterophils and lymphocytes (Ferreira et al., 2006); and (iii) in adult rabbits, there is also a decrease in lymphocytes in both liver and spleen of infected rabbits (Marques et al., 2010), a change associated with apoptosis. In this work we have investigated variations in a subtype of T cells, naturally occurring CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells (Tregs), regarding RHDV infection. This T cell population is able to limit collateral damages due

**Abbreviations:** RHDV, rabbit hemorrhagic disease virus; RHD, rabbit hemorrhagic disease; Tregs, regulatory T cells.

\* Corresponding author at: Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira, 228, 4050-313 Porto, Portugal, European Union. Tel.: +351 220428106; fax: +351 222062232.

E-mail address: [lmteixeira@icbas.up.pt](mailto:lmteixeira@icbas.up.pt) (L. Teixeira).

to strong immune responses elicited by pathogens that would be otherwise quite harmful to the infected host (Belkaid and Tarbell, 2009). For instance, Tregs reduce the severity of inflammatory lesions in the eye induced by herpes simplex virus (HSV) infection (Suvas et al., 2004). A major drawback of this regulatory role is that Tregs can facilitate host colonization by downregulating protective immune responses, as it has been described in several chronic infections (Belkaid and Tarbell, 2009). With regards to acute infections, there are few studies on Tregs and their role is still unclear and contradictory (Belkaid and Tarbell, 2009). For instance, in acute infection with Friend retrovirus, Tregs depletion leads to a better control of viral replication (Zelinskyy et al., 2009), whereas in mucosal herpes simplex virus infection, depletion of Tregs accelerates the fatal outcome of the infection due to a faster dissemination of the virus (Lund et al., 2008). Also to add to this issue is the finding of no change in the viral load during the acute phase of infection with feline immunodeficiency virus observed upon partial depletion of Tregs prior to infection (Mikkelsen et al., 2011). RHD is an acute infection of adult rabbits associated with a strong increase in mRNA levels of pro-inflammatory cytokines in the liver (Sanchez-Campos et al., 2004; Tunon et al., 2011) and a burst of pro-inflammatory cytokines in the serum hours after RHDV infection (unpublished results). Therefore we have considered whether regulatory mechanisms that are known to downregulate inflammation, such as those mediated by Tregs, would be altered by this viral infection. Thus, we have quantified Tregs and the levels of IL-10 and TGF- $\beta$ , two cytokines that can be produced by Tregs cells and can contribute to the anti-inflammatory action. This was done both in rabbits that are naturally susceptible (adult animals) and naturally resistant (young rabbits) to the RHDV infection.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Rabbits

Outbred female New Zealand white rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), 5 (young rabbits) and 11 weeks old (adult rabbits), were purchased from Charles River (Barcelona, Spain). The rabbits were kept under standard conditions of housing with unrestricted access to food and water; this was done according to the European Union Directive no. 86/609/CEE. The average weight of the young and adult rabbits used in these experiments was respectively,  $701 \pm 199$  g and  $2168 \pm 267$  g.

### 2.2. Virus

The inoculum of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) was obtained as previously described (Teixeira et al., 2011). Briefly, homogenates from infected rabbit liver were prepared with the help of a glass pestle in phosphate-buffered saline (PBS), kept between 0 °C and 4 °C. The tissue suspensions were centrifuged at  $900 \times g$  and the supernatants were frozen at 80 °C. These liver homogenates were purified by iodixanol gradient (Teixeira et al., 2011). The

titer of the inoculum was determined by hemagglutination test.

### 2.3. Challenge infection

We injected intramuscularly (i.m.) young rabbits (5 weeks old) or adult rabbits (11 weeks old) with 100  $\mu$ l of purified RHDV diluted in PBS to a titer of  $2^{10}$  hemagglutination units. Control animals were given 100  $\mu$ l of PBS i.m.

### 2.4. Collection of biological samples

At 24 h after infection, rabbits were euthanized with an intravenous injection of an anesthetic mixture of xylazine (Rompun®, Bayer Co., Portugal, 3 mg/kg) and ketamine (Imalgène 1000®, Merial, Portugal, 10 mg/kg), 1 h after the intramuscularly administration of morphine (Morfina Labesfal®, Labesfal, Portugal, 5 mg/kg). Spleens were removed and placed in Hanks Balanced Salt Solution, HBSS (Sigma) for flow cytometry analysis. Blood was also collected from these animals, allowed to clot overnight and serum was removed by centrifugation and stored at –20 °C.

### 2.5. Flow cytometric analysis

For cytometric analysis, the spleens from rabbits were homogenized in HBSS (Sigma) and passed through a 70- $\mu$ m-cell strainer. For the analysis of Foxp3 expression, spleen cells were surface stained with FITC anti-rabbit CD4 (clone KEN-4, Serotec), fixed and permeabilized (Foxp3 fixation/permeabilization buffer, eBioscience, San Diego, CA), washed, and pre-incubated with normal rat serum (produced at ICBAS) before intracellular staining with PE anti-human Foxp3 (clone PCH101, eBioscience) monoclonal antibody according to manufacturer's instructions. Alternatively, cells were stained with Rat IgG2a K Isotype Control PE (eBioscience). Data acquisition was performed in a FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) using the CellQuest software (Becton Dickinson). A number of  $1 \times 10^6$  cells were stained per sample. We used anti-human Foxp3 as it has been previously described by others to cross-react with cells of the rabbit with regulatory properties (Nesburn et al., 2007). The data were analyzed using FlowJo 9.3.1 software (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA).

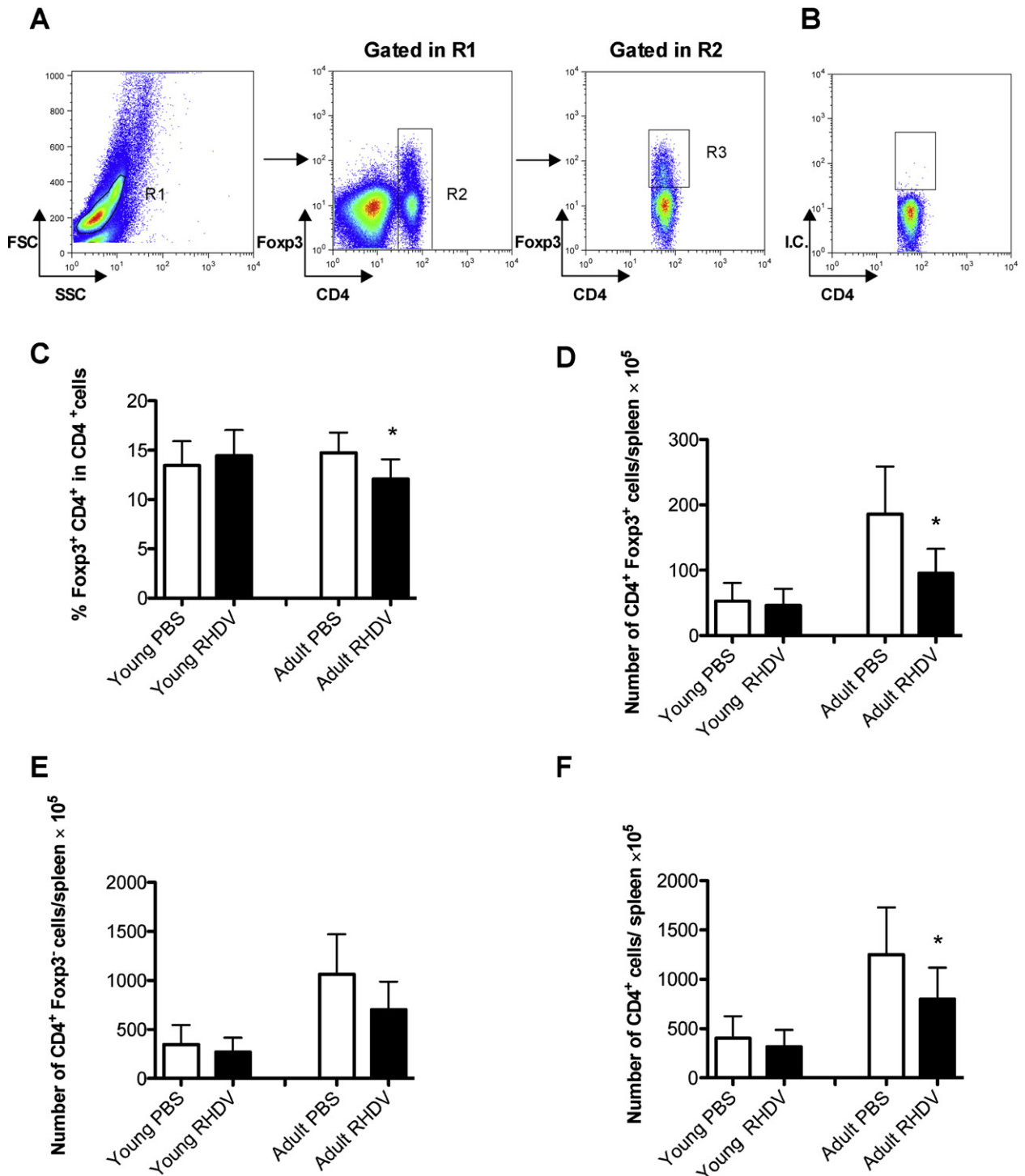
### 2.6. TGF- $\beta$ and IL-10 serum measurements

Serum TGF- $\beta$  and IL-10 titers in RHDV-inoculated and PBS-inoculated rabbits were quantified with ELISA kits (Uscn Life Science, Inc.) according to manufacturer's instructions.

### 2.7. Statistical analysis

Statistical significance of results was performed by Mann–Whitney two-tailed test using IBM® SPSS® Statistics (version 20 for MacOS).  $P < 0.05$  was considered to be statistically significant.





**Fig. 1.** RHDV infection decreases Tregs in the spleen. (A) Representative example of gates set to delineate total spleen leukocytes cells (R1), CD4 cell population (R2) and CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells (R3) upon flow cytometric analysis of splenic cells. (B) Representative dot plot for isotype control (I.C.) of Foxp3 antibody. (C) percentages of Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells in total splenic CD4<sup>+</sup> cells, (D) numbers of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells, (E) numbers of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> cells, and (F) number of CD4<sup>+</sup> cells detected by FACS analysis 24 h after PBS or RHDV inoculation in young (5 weeks old) and adult rabbits (11 weeks old). Bars represent the mean plus one standard deviation (SD) of 8 rabbits on PBS groups and 9 rabbits on the RHDV group. Statistically significant differences between PBS and RHDV inoculated young rabbits or PBS and RHDV inoculated adult rabbits are indicated above the bar corresponding to respective young or adult infected rabbits, (Mann–Whitney test, \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ ). The graph documents a significant decrease in splenic Tregs in adult rabbits after being infected by RHDV.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. $CD4^+Foxp3^+$ cells number in the spleen of rabbits infected with RHDV

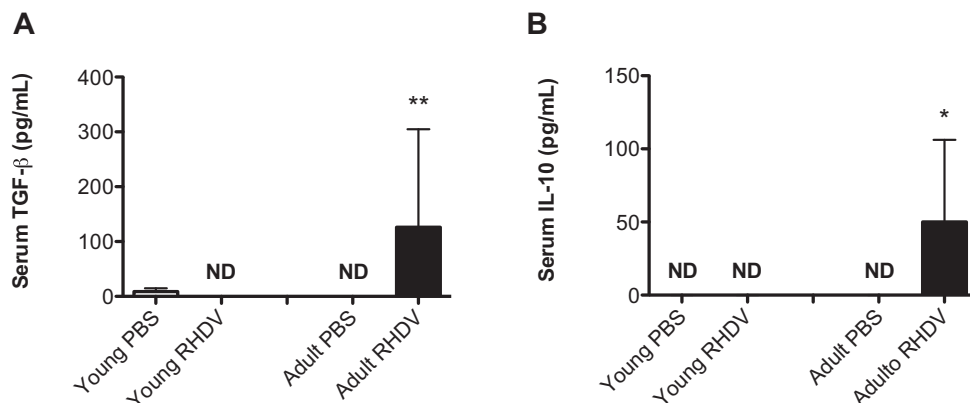
It was shown by others that RHDV can be detected in the spleen of both young and adult rabbits as early as 24 h after infection (Shien et al., 2000) and there is some experimental evidence that the virus can also replicate in this organ (Kimura et al., 2001). We have therefore, quantified here, the frequency and number of Tregs in the spleen of both adult and young rabbits infected with RHDV. The dot plots in Fig. 1A show the regions used to define the  $CD4^+$  and Tregs populations. Staining with the isotype control is also shown (Fig. 1B). A decrease in the frequency and number of splenic  $CD4^+Foxp3^+$  was observed in adult rabbits 24 h after infection, as compared to mock-infected controls (Fig. 1C and D). In contrast, no significant changes were observed in the numbers and frequency of splenic  $CD4^+Foxp3^+$  in young rabbits after RHDV infection (Fig. 1C and D). No significant alteration in the number of splenic  $CD4^+Foxp3^-$  cells was observed in young and adult rabbits upon RHDV infection (Fig. 1E). We recently showed that RHDV infection in adult rabbits induces T cell apoptosis and a reduction in the number of this cellular population (Marques et al., 2010). Accordingly, we observed here a reduction in the number of total  $CD4^+$  T cells in RHDV-infected adult rabbits (Fig. 1F). Because the frequency of Tregs in the  $CD4^+$  cell population also decreased in these rabbits, while no significant change is observed in the number of  $CD4^+Foxp3^-$  cells, we can hypothesize that  $CD4^+Foxp3^+$  cells are more sensitive to apoptosis than  $CD4^+Foxp3^-$  cells. Alternatively, the reduction of Tregs in the spleen can be interpreted as deriving from a preferential migration of this cell population to other organs.

The preferential reduction of Tregs observed in the infected adult rabbits is likely to have influence on the outcome of the disease. In addition to their influence in adaptive immunity, regulatory T cells are also known to inhibit populations of the innate immunity such as

macrophages, natural killer cells and dendritic cells (Misra et al., 2004; Taams et al., 2005; Ralainirina et al., 2007; Belkaid and Tarbell, 2009). In fact, Tregs have been shown to suppress innate immune pathology in other viral infections, namely influenza A infection (Antunes and Kassiotis, 2010). It is thus pertinent to hypothesize that the decreased frequency of Tregs observed in infected adult rabbits may have exacerbated the innate inflammatory response to infection with more severe pathology, thus contributing to the rapid death of the host, contrastingly to the non-susceptible natural resistance to RHDV infection expressed by young rabbits. Indeed, the pro-inflammatory cytokine  $TNF-\alpha$  is increased in the liver of infected adult rabbits and as already suggested by other authors, can be the cause of liver cell apoptosis observed in RHD (Sanchez-Campos et al., 2004; Garcia-Lastra et al., 2010).

#### 3.2. Cytokine levels in the serum of rabbits infected with RHDV

Beside  $TNF-\alpha$ , the levels of IL-6, another pro-inflammatory cytokine is also increased in the liver of adult rabbits infected with RHDV (Garcia-Lastra et al., 2010). Here, we assessed in the serum the levels of IL-10 and  $TGF-\beta$ , two cytokines that can have an anti-inflammatory role and can be produced by Tregs as a mechanism of suppression (Miyara and Sakaguchi, 2007). Indeed, we observed a significant increase in the levels of  $TGF-\beta$  and IL-10 in infected adult rabbits comparatively to non-infected rabbits (Fig. 2A and B) while no alteration in the level of these cytokines was observed in young rabbits (Fig. 2A and B). This suggests a counterbalancing effect to control the pro-inflammatory cytokines produced upon RHDV infection in an attempt to limit the damage to the host caused by inflammation. In fact, production of IL-10 has been shown to be important for the control of inflammatory reactions in several viral infections, such as herpes simplex virus infection and hepatitis C virus (Rouse and Sehrawat, 2010). The levels of  $TGF-\beta$  detected in the serum are in agreement with the work of Sanchez-Campos et al. (2004) that detected an



**Fig. 2.** RHDV infection increases serum levels of  $TGF-\beta$  and IL-10. Concentration of  $TGF-\beta$  (A) and IL-10 (B), detected by ELISA in the sera of young (5 weeks old) and adult rabbits (11 weeks old) 24 h after PBS or RHDV inoculation. Bars represent the mean plus one standard deviation (SD) of 8 rabbits on PBS groups and 9 rabbits on the RHDV group. Statistically significant differences between PBS and RHDV inoculated young rabbits or PBS and RHDV inoculated adult rabbits are indicated above the bar corresponding to respective young or adult infected rabbits, (Mann–Whitney test, \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ ). Not detected, ND. The graph documents that the viral infections causes increase in both cytokines in adult rabbits.

increase in TGF- $\beta$ 1 mRNA in the liver of adult rabbits 24 h after RHDV infection. However, the increased serum levels of TGF- $\beta$  and IL-10 did not correlate with the number of Tregs observed in the spleen of adult infected rabbits. Therefore, even if Treg may contribute to the enhanced IL-10 and TGF- $\beta$  levels, other cells rather than Tregs are more likely to be the main source of these two cytokines produced upon RHDV infection.

Our goal here was to investigate whether the number of Tregs is modified upon experimental infection of rabbits with RHDV. Work done by others (Garcia-Lastra et al., 2010; Tunon et al., 2011) and experiments done in our own lab have shown that a burst of pro-inflammatory cytokines occurs in infected adult rabbits upon RHDV infection. We report here that cytokines that downgrade inflammation and can be produced by Tregs, such as IL-10 and TGF- $\beta$ , also increase upon RHDV infection. However, the levels of these anti-inflammatory cytokines seem not able to inhibit inflammation since adult rabbits die with severe acute liver inflammation between 24 and 72 h after RHDV infection. As Tregs downregulate inflammation, our finding that Tregs are decreased by RHDV infection, prompts us to postulate that this change will favor the susceptibility of the host for this particular viral infection.

### Conflict of interest statement

The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

### Acknowledgments

The authors are thankful to Mr. Costa e Silva, Mrs. Manuela Silva and Dr. Madalena Costa for excellent technical assistance. The authors are also thankful to Sara Cunha. Luzia Teixeira is supported by FSE and MCTES through POPH-QREN – Tipologia 4.2. This work was funded by FCT – Portugal, grant no. PTDC/CVT/66656/2006, COMPETE and FEDER.

### References

Antunes, I., Kassiotis, G., 2010. Suppression of innate immune pathology by regulatory T cells during Influenza A virus infection of immunodeficient mice. *J. Virol.* 84, 12564–12575.

Belkaid, Y., Tarbell, K., 2009. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions (\*). *Annu. Rev. Immunol.* 27, 551–589.

Ferreira, P.G., Costa-e-Silva, A., Monteiro, E., Oliveira, M.J., Aguas, A.P., 2004. Transient decrease in blood heterophils and sustained liver damage caused by calicivirus infection of young rabbits that are naturally resistant to rabbit haemorrhagic disease. *Res. Vet. Sci.* 76, 83–94.

Ferreira, P.G., Costa-e-Silva, A., Oliveira, M.J., Monteiro, E., Cunha, E.M., Aguas, A.P., 2006. Severe leukopenia and liver biochemistry changes in adult rabbits after calicivirus infection. *Res. Vet. Sci.* 80, 218–225.

Fuchs, A., Weissenböck, H., 1992. Comparative histopathological study of rabbit haemorrhagic disease (RHD) and European brown hare syndrome (EBHS). *J. Comp. Pathol.* 107, 103–113.

Garcia-Lastra, R., San-Miguel, B., Crespo, I., Jorquera, F., Alvarez, M., Gonzalez-Gallego, J., Tunon, M.J., 2010. Signaling pathways involved in liver injury and regeneration in rabbit hemorrhagic disease, an animal model of virally-induced fulminant hepatic failure. *Vet. Res.* 41, 2.

Jung, J.Y., Lee, B.J., Tai, J.H., Park, J.H., Lee, Y.S., 2000. Apoptosis in rabbit haemorrhagic disease. *J. Comp. Pathol.* 123, 135–140.

Kimura, T., Mitsui, I., Okada, Y., Furuya, T., Ochiai, K., Umemura, T., Itakura, C., 2001. Distribution of rabbit haemorrhagic disease virus RNA in experimentally infected rabbits. *J. Comp. Pathol.* 124, 134–141.

Lund, J.M., Hsing, L., Pham, T.T., Rudensky, A.Y., 2008. Coordination of early protective immunity to viral infection by regulatory T cells. *Science* 320, 1220–1224.

Marques, R.M., Costa, E.S.A., Aguas, A.P., Teixeira, L., Ferreira, P.G., 2010. Early acute depletion of lymphocytes in calicivirus-infected adult rabbits. *Vet. Res. Commun.* 34, 659–668.

Mikami, O., Park, J.H., Kimura, T., Ochiai, K., Itakura, C., 1999. Hepatic lesions in young rabbits experimentally infected with rabbit haemorrhagic disease virus. *Res. Vet. Sci.* 66, 237–242.

Mikkelsen, S.R., Long, J.M., Zhang, L., Galemor, E.R., VandeWoude, S., Dean, G.A., 2011. Partial regulatory T cell depletion prior to acute feline immunodeficiency virus infection does not alter disease pathogenesis. *PLoS One* 6, e17183.

Misra, N., Bayry, J., Lacroix-Desmazes, S., Kazatchkine, M.D., Kaveri, S.V., 2004. Cutting edge: human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J. Immunol.* 172, 4676–4680.

Miyara, M., Sakaguchi, S., 2007. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol. Med.* 13, 108–116.

Nesburn, A.B., Bettahi, I., Dasgupta, G., Chentoufi, A.A., Zhang, X., You, S., Morishige, N., Wahlert, A.J., Brown, D.J., Jester, J.V., Wechsler, S.L., Ben-Mohamed, L., 2007. Functional Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25(Bright<sup>+</sup>) natural regulatory T cells are abundant in rabbit conjunctiva and suppress virus-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> effector T cells during ocular herpes infection. *J. Virol.* 81, 7647–7661.

Ohlinger, V.F., Haas, B., Thiel, H.J., 1993. Rabbit hemorrhagic disease (RHD): characterization of the causative calicivirus. *Vet. Res.* 24, 103–116.

Prieto, J.M., Fernandez, F., Alvarez, V., Espi, A., Garcia Marin, J.F., Alvarez, M., Martin, J.M., Parra, F., 2000. Immunohistochemical localisation of rabbit haemorrhagic disease virus VP-60 antigen in early infection of young and adult rabbits. *Res. Vet. Sci.* 68, 181–187.

Ralainirina, N., Poli, A., Michel, T., Poos, L., Andres, E., Hentges, F., Zimmer, J., 2007. Control of NK cell functions by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J. Leukoc. Biol.* 81, 144–153.

Rouse, B.T., Sehrawat, S., 2010. Immunity and immunopathology to viruses: what decides the outcome? *Nat. Rev. Immunol.* 10, 514–526.

Sanchez-Campos, S., Alvarez, M., Culebras, J.M., Gonzalez-Gallego, J., Tunon, M.J., 2004. Pathogenic molecular mechanisms in an animal model of fulminant hepatic failure: rabbit hemorrhagic viral disease. *J. Lab. Clin. Med.* 144, 215–222.

Shien, J.H., Shieh, H.K., Lee, L.H., 2000. Experimental infections of rabbits with rabbit haemorrhagic disease virus monitored by polymerase chain reaction. *Res. Vet. Sci.* 68, 255–259.

Suvas, S., Azkur, A.K., Kim, B.S., Kumaraguru, U., Rouse, B.T., 2004. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control the severity of viral immunoinflammatory lesions. *J. Immunol.* 172, 4123–4132.

Taams, L.S., van Amelsfort, J.M., Tiemessen, M.M., Jacobs, K.M., de Jong, E.C., Akbar, A.N., Bijlsma, J.W., Lafaber, F.P., 2005. Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Hum. Immunol.* 66, 222–230.

Teixeira, L., Marques, R.M., Aguas, A.P., Ferreira, P.G., 2011. A simple and rapid method for isolation of caliciviruses from liver of infected rabbits. *Res. Vet. Sci.* 91, 164–166.

Tunon, M.J., San Miguel, B., Crespo, I., Riezu-Boj, J.L., Larrea, E., Alvarez, M., Gonzalez, I., Bustos, M., Gonzalez-Gallego, J., Prieto, J., 2011. Cardiotrophin-1 promotes a high survival rate in rabbits with lethal fulminant hepatitis of viral origin. *J. Virol.* 85, 13124–13132.

Zelinskyy, G., Dietze, K., Sparwasser, T., Dittmer, U., 2009. Regulatory T cells suppress antiviral immune responses and increase viral loads during acute infection with a lymphotropic retrovirus. *PLoS Pathog.* 5, e1000406.



## CAPÍTULO 6

---

### **Immunosuppression abrogates resistance of young rabbits to rabbit haemorrhagic disease (RHD)**

Marques, R.M., Teixeira, L., Águas, A.P., Ribeiro, J.C., Costa-e-Silva, A., Ferreira, P.G. (2014), *Veterinary Research*, 45 (14)

Reimpresso com a permissão da *BioMed Central*



SHORT REPORT

Open Access

# Immunosuppression abrogates resistance of young rabbits to Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD)

Raquel M Marques<sup>\*</sup>, Luzia Teixeira, Artur P Águas, Joana C Ribeiro, António Costa-e-Silva and Paula G Ferreira

## Abstract

Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD) is caused by a calicivirus (RHDV) that kills 90% of infected adult European rabbits within 3 days. Remarkably, young rabbits are resistant to RHD. We induced immunosuppression in young rabbits by treatment with methylprednisolone acetate (MPA) and challenged the animals with RHDV by intramuscular injection. All of these young rabbits died within 3 days of infection due to fulminant hepatitis, presenting a large number of RHDV-positive dead or apoptotic hepatocytes, and a significant seric increase in cytokines, features that are similar to those of naïve adult rabbits infected by RHDV. We conclude that MPA-induced immunosuppression abrogates the resistance of young rabbits to RHD, indicating that there are differences in the innate immune system between young and adult rabbits that contribute to their distinct resistance/susceptibility to RHDV infection.

## Introduction, methods and results

Rabbits of the species *Oryctolagus cuniculus* are the natural hosts of the Rabbit Haemorrhagic Disease Virus (RHDV). This virus targets the liver of rabbits and causes the death of millions of wild and domestic adult rabbits worldwide [1-3]. Usually, adult rabbits die within 3 days of RHDV infection as a result of fulminant hepatitis, showing no symptoms of the disease until a few hours before death. Interestingly, young rabbits (less than 4 weeks-old) are resistant to Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD), developing only a sub-clinical disease to the viral infection [3-6]. A central issue in the pathogenesis of RHD is to understand this age-related resistance to a viral infection that is fatal in adult animals. Pertinent to this issue, Ruvoën-Clouet et al. [7] reported that RHDV is capable of binding to histo-blood group antigens (HBGA) that are expressed on the mucosa of the upper respiratory and digestive tracts of adult rabbits, and they have postulated that the density of these attachment factors on mucosal cells is essential for adult rabbits to be susceptible to RHDV infection. In agreement with their view, they found only a weak binding of virus particles to the

same mucosal tissues in young rabbits, thus indicating that low expression of HBGA could explain the resistance of young animals to RHD. Nevertheless, and despite this evidence, they recently reported that low expression of these facilitating factors of the infection, at the epithelial level, only confers partial protection against RHDV infection [3,8]. They also showed that hepatocytes, the main target of RHDV replication, do not express HBGA [7,8], which led them to suggest the existence of additional hepatic cellular receptor(s) for the virus [3]. Additionally, we demonstrated that young rabbits infected with RHDV by the intramuscular route develop the exact same mild liver disease that we had observed in young rabbits infected with RHDV by natural, oral and nasal routes [4,9-12]. This made us consider that resistance of young rabbits to RHD may depend on additional putative factors. A difference in innate immunity is one of these possible factors, since previous data have shown that young and adult rabbits develop different immune responses after RHDV infection [4-6,13-16]. Thus, we decided to study whether altering the immune physiology of young rabbits by methylprednisolone acetate (MPA)-induced immunosuppression would interfere with the resistance of young rabbits to RHDV infection.

<sup>\*</sup> Correspondence: ramarques@icbas.up.pt  
Department of Anatomy, ICBAS (Abel Salazar Institute for Biomedical Science) and UMIB (Unit for Multidisciplinary Biomedical Research), University of Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira n.º 228, 4050-313 Porto, Portugal

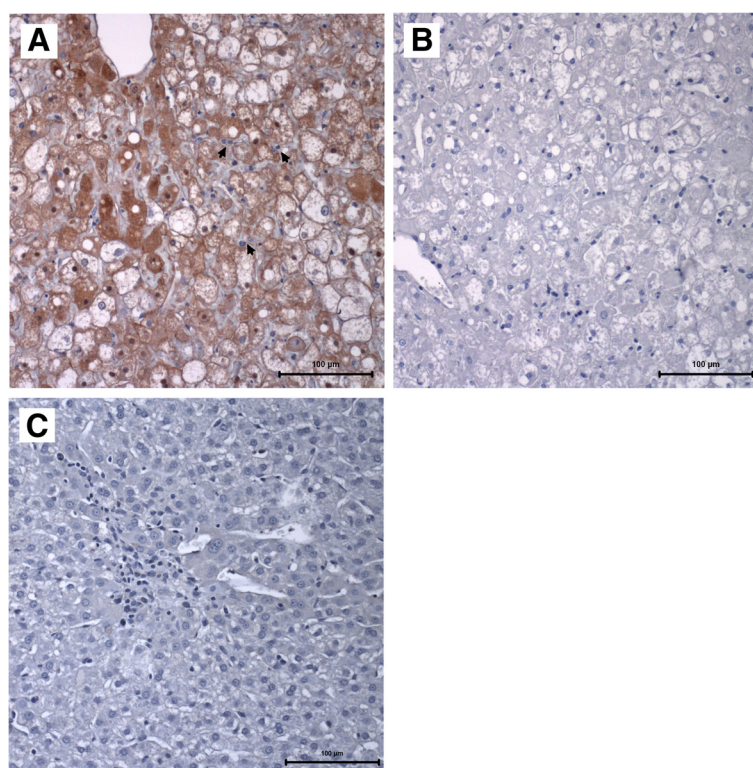


New Zealand white rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) were used when the animals were 4 weeks old. The rabbits were kept under standard conditions of housing with unrestricted access to food and water; this was done according to the European Union Directive no. 2010/63/CE and was approved by the appropriate local ethic committee ("Comité de Ética do ICBAS/UP"). The inoculum of RHDV (Ast/89 strain) was obtained as previously described by Teixeira et al. [17] and had a  $2^{10}$  titre in haemagglutination units (HAU). Fourteen young rabbits (24 days) were immunosuppressed with an intramuscular injection of a suspension of MPA a long-acting corticosteroid (Depo-Medrol®; 20 mg/kg). All animals were also injected subcutaneously with a broad spectrum antibiotic, enrofloxacin (Alsir® 2.5%; 10 mg/kg), in order to prevent secondary bacterial infections. One week later, 9 of the 14 immunosuppressed rabbits were challenged with 100 µL of RHDV injected intramuscularly. The other 5 young rabbits were used as controls of the immunosuppression, i.e. they were euthanized and their thymuses were collected and weighed in relation with the body weight of the rabbits [18]. Another group of 15 young rabbits were used as the control of the infection or of the experiment. Ten animals were inoculated, injected intramuscularly, with 100 µL of RHDV, and the other 5 were inoculated, injected intramuscularly, with 100 µL of PBS, at the same time of the immunosuppressed rabbits. Five of the infected rabbits also received the antibiotic, according to the same scheme of the immunosuppressed rabbits. All the animals were observed regularly, and clinical manifestations of RHD were monitored. After the animal's death, by disease or euthanasia (as described by Marques et al. [16]), the presence of macroscopic lesions compatible with RHD was investigated. Fragments of the thymus, spleen and liver were collected for histopathological and TUNEL analysis as described below. Blood samples were obtained from the vena cava caudal in order to quantify the seric level of cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10) by ELISA (ELISA Kit, Usn Life Science Inc., Wuhan, People's Republic of China) in 3 of the experimental groups: PBS control rabbits, immunosuppressed rabbits and immunosuppressed, RHDV-infected young rabbits. Liver samples of immunosuppressed, RHDV-infected young rabbits and infected young rabbits were also collected to quantify the presence of RHDV antigen by ELISA (the viral titer corresponding to the threshold value of dilution at which the sample is considered positive to RHDV, i.e., when its value is superior to the calculated cut-off ( $0.2 \times OD_{405nm}$  positive control sample; INGEZIM RHDV 17.RHD.K2 kit, Ingenasa, Madrid, Spain). Other liver samples were fixed by 10% buffered formalin, dehydrated through graded alcohols and xylene and embedded in paraffin wax by standard methods. These were used for light microscopy

studies that included immunocytochemistry for RHDV antigen (protocol described by Marques et al. [16]) and TUNEL assay for apoptosis detection (protocol described according to the manufacturer's instructions (TdT in situ - DAB In Situ Apoptosis Detection Kit, R&D Systems Europe, Ltd., Abingdon, United Kingdom)). Samples of the spleen and thymus were also fixed with 10% buffered formalin to be used for apoptosis detection by the TUNEL assay. Statistical comparison of data from all groups of rabbits was performed using an unpaired t-test calculated with GraphPad Prism, version 5.0a, software. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

All immunosuppressed, RHDV-infected young rabbits died within 24–72 h of RHDV infection (24–30 h  $n = 2$ ; 36–48 h  $n = 6$ ; 60–72 h  $n = 1$ ) depicting the hyperacute form of RHD, i.e., they died suddenly, often without conspicuous signs of disease, showing prostration, lethargy and anorexia. As expected, all non-immunosuppressed infected young rabbits showed no clinical symptoms of disease after being infected with RHDV; they were euthanized 1 week after the viral inoculation. Immunosuppressed rabbits (infected (IS + I) or not (IS)) showed atrophic thymuses, indicating that immunosuppression had been achieved; this atrophy was confirmed by the ratio thymus (g)/body weight (g) since we found that these ratios were significantly lower in immunosuppressed groups (IS group:  $0.00048 \pm 0.000049$ ; IS + I group:  $0.00054 \pm 0.000050$ ; mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM);  $p < 0.0001$ ) than in control rabbits (PBS group:  $0.0024 \pm 0.00024$ ; mean  $\pm$  SEM). The immunosuppressed, RHDV-infected young rabbits showed the typical lesions of RHD, such as enlarged and pale livers with enhanced lobular patterns, congestion and haemorrhagic lesions of several viscera, and bloody foam in the trachea. A significant difference was seen in the spleen volume, with splenomegaly in immunosuppressed, RHDV-infected rabbits in contrast with spleen atrophy in immunosuppressed animals (ratio - spleen (g)/body weight (g);  $p < 0.05$ ). Young rabbits that were infected with RHDV did not present any macroscopic lesions suggestive of RHD, 7 days after the viral inoculation, when they were euthanized. Widespread liver cell vacuolization was seen in immunosuppressed, RHDV-infected young rabbits; these hepatocytes often showed pyknotic nuclei and karyorrhexis, classic features of cell death (Figure 1A). The TUNEL assay confirmed extensive cell death of hepatocytes and this was illustrated by brown-nuclear staining (early apoptotic cells) or brown-cytoplasmic staining (late apoptotic or necrotic cells) (Figure 2A). Scattered inflammatory cells (predominantly heterophils) were seen in the liver of the animals. In contrast, hepatic tissue of the immunosuppressed rabbits did not reveal any signs of hepatocellular degeneration suggestive of apoptosis. In RHDV-infected young rabbits,





**Figure 1 Immunocytochemistry of RHDV antigen in the liver.** **A:** Light micrograph of a liver paraffin section of an immunosuppressed, RHDV-infected young rabbit that died with RHD showing widespread positive immunodetection of the major RHDV antigen (brown staining). Heterophils are observed surrounding the damaged hepatocytes and inside sinusoids (arrows). The tissue section was labelled with an anti-VP60 mouse antiserum; haematoxylin counterstain; bar = 100 µm. **B:** A liver section of an immunosuppressed, RHDV-infected young rabbit that died with RHD and that was labeled with control mouse antiserum; haematoxylin counterstain, bar = 100 µm. **C:** A liver paraffin section of an infected young rabbit that survived the infection and was euthanized 7 days later. Signs of hepatocellular regeneration are visible as expressed by enlarged and often binucleated cells (without the formation of organized hepatic cords); some tissue spaces are occupied by small basophilic cells, with an oval shape, that are suggestive of hepatocyte precursors. The tissue section was labeled with an anti-VP60 mouse antiserum; haematoxylin counterstain, bar = 100 µm.

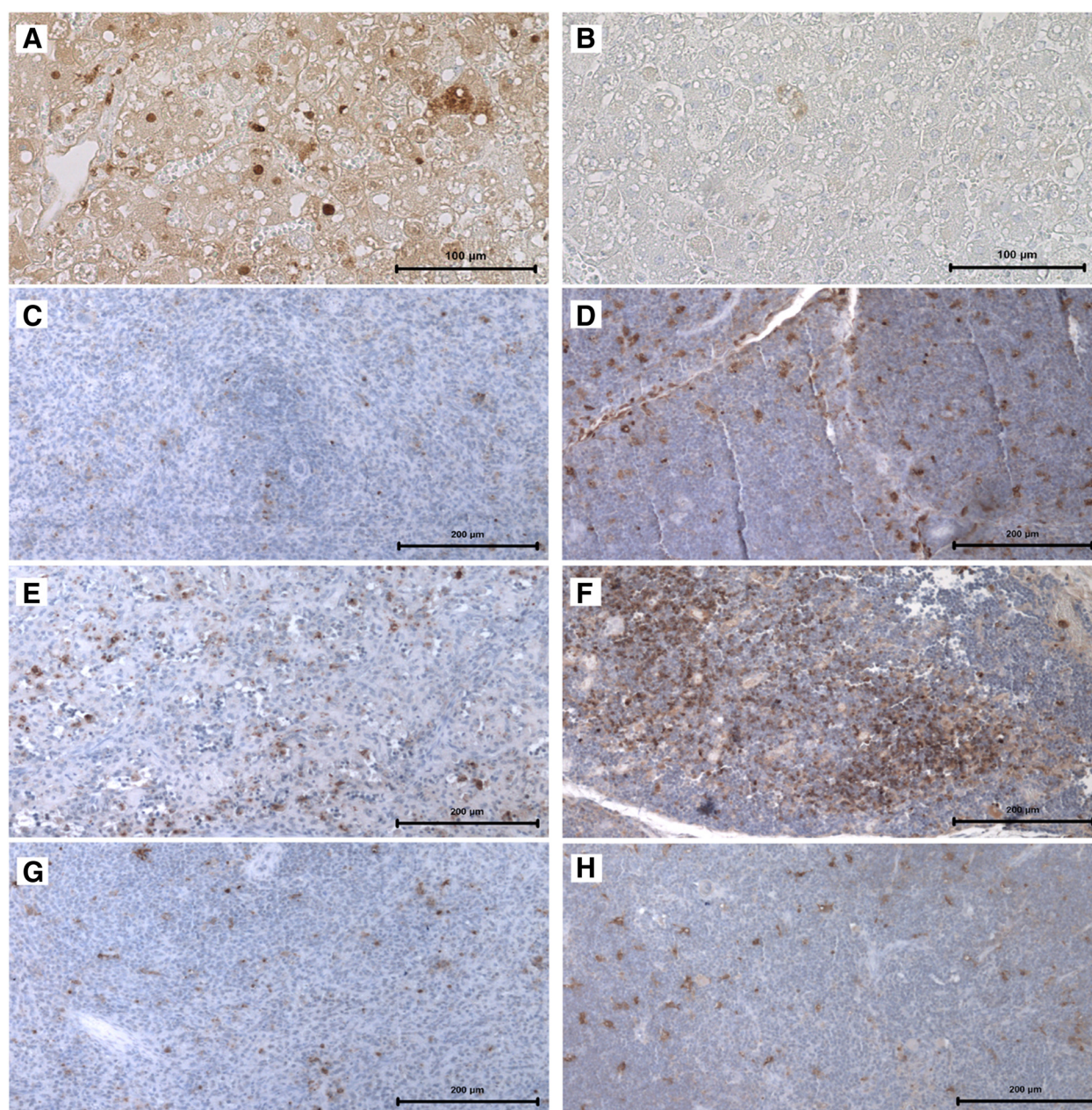
at day 7<sup>th</sup> after viral inoculation, there was evidence of hepatic regeneration as expressed by rebuilding of focal hepatic lesions that had been produced by the infection (Figure 1C). All immunosuppressed, RHDV-infected young rabbits presented an extensive brown-staining of the liver for the RHDV antigen (Figure 1A). In contrast, RHDV-infected young rabbits, euthanized 7 days after infection, exhibited, in general, no RHDV-positive staining (Figure 1C). ELISA revealed that all immunosuppressed, RHDV-infected young rabbits presented elevated viral titers in the liver ( $240.0 \pm 99.06$ ; mean  $\pm$  SEM), similarly to those found in RHDV-infected adult rabbits that died spontaneously with RHD ( $170.7 \pm 42.67$ ; mean  $\pm$  SEM;  $n = 3$ ; data obtained from previous experiments). In contrast, the virus was not detected in the livers of young rabbits that had been submitted to the RHDV infection. The TUNEL assay confirmed marked apoptosis in the thymus of immunosuppressed, RHDV-infected rabbits and this was less extensive in the spleen (Figures 2E-F); these tissue changes were not observed in infected young rabbits not

submitted to immunosuppression (Figures 2G-H). As expected, significant apoptosis of thymus lymphocytes was observed in all immunosuppressed animals (Figure 2D). The values of the proinflammatory cytokines, TNF- $\alpha$ , IL-6, and the anti-inflammatory cytokine, IL-10, were determined in the sera of PBS control rabbits, immunosuppressed rabbits and immunosuppressed, RHDV-infected young rabbits. All cytokines had a marked increase in the serum of immunosuppressed, RHDV-infected young rabbits that died with RHD, TNF- $\alpha$  in particular (Figure 3).

## Discussion

RHDV infection kills most adult rabbits, whereas young rabbits show no disease [4,5,12]. Our previous reports on the pathogenesis of RHD [5,6,14-16] indicated that young and adult rabbits may differ in innate immune response, since the adult animals usually die in less than 3 days (a too early timing for the host to mount a specific immune response to the infectious agent). To investigate

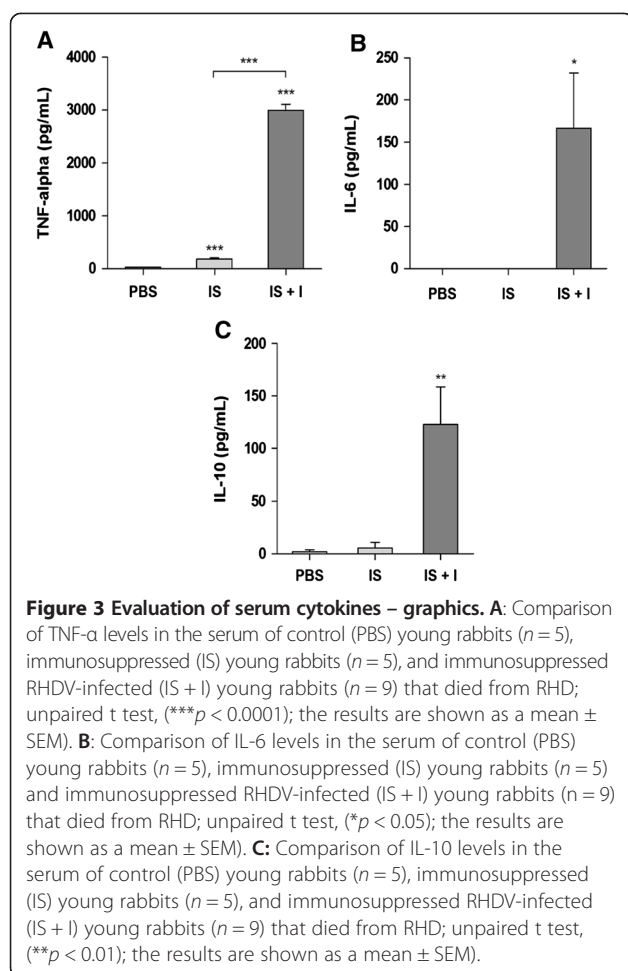




**Figure 2 Immunocytochemistry of apoptosis in the liver, spleen and thymus.** Light micrographs of the liver, spleen and thymus paraffin sections where the immunodetection of cellular apoptosis was obtained by TUNEL; counterstaining with haematoxylin. In liver sections, bar = 100 μm; in spleen and thymus sections, bar = 200 μm. **A:** A liver paraffin section of an immunosuppressed, RHDV-infected young rabbit that died due to RHD. **B:** A liver paraffin section of an immunosuppressed, RHDV-infected young rabbit that died from RHD; control of the TUNEL assay. **C:** A spleen paraffin section of an immunosuppressed young rabbit euthanized 7 days after immunosuppression. **D:** A thymus paraffin section of an immunosuppressed young rabbit euthanized 7 days after immunosuppression. **E:** A spleen paraffin section of an immunosuppressed, RHDV-infected young rabbit that died from RHD. **F:** A thymus paraffin section of an immunosuppressed, RHDV-infected young rabbit that died from RHD. **G:** A spleen paraffin section of an infected young rabbit euthanized 7 days after RHDV infection. **H:** A thymus paraffin section of an infected young rabbit euthanized 7 days after RHDV infection.

a putative role of innate immunity in the resistance of young rabbits, we decided to investigate whether immunosuppression would change the progress of calicivirus infection in these animals. For that, we studied rabbits treated

with MPA, a corticosteroid of long-duration, with pleiotropic actions including immunosuppression due to inhibition of the inflammatory response and depletion of both T and B cells [19,20].



We found that young rabbits under MPA-immunosuppression died from RHDV infection within 3 days, just as naïve adult rabbits do after RHDV inoculation. The animals died from fulminant hepatitis that was associated with widespread apoptosis and disseminated intravascular coagulation (DIC). The inflammatory infiltrates in the liver of the immunosuppressed, RHDV-infected young rabbits were mainly constituted by heterophils, contrary to what would be expected in infected young rabbits, i.e., where liver infiltrates contain macrophages and lymphocytes [3,4,6]. These features mimic the typical pathology of RHD in adult rabbits after being infected by RHDV [12,14,21]. Also, similarly to infected adult rabbits, the immunosuppressed, RHDV-infected young rabbits showed a marked dissemination of RHDV throughout the liver. The viral titers registered in the liver of immunosuppressed, RHDV-infected young rabbits were also similar to those found in infected adult rabbits. These data show that young rabbits that are treated with MPA develop the full blown RHD seen in adult animals after RHDV infection. This change of young rabbits from resistance to susceptibility to the calicivirus is likely to result from impairment of their

innate immunity, i.e., the MPA treatment could, for example, be interfering with the process of antigen presentation, with the phagocytic activity, or with the effector roles of activated NK cells, NK T cells or possibly CD8<sup>+</sup> T cells [22-25]. Our results weaken the hypothesis that resistance of young rabbits to RHD derives from a different expression of the viral hepatic cellular receptor(s), since the MPA treatment of the young rabbits made the RHDV capable of infecting the hepatocytes, as observed in adult rabbits.

We also report here a marked increase in proinflammatory and anti-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10) in the serum of the immunosuppressed, RHDV-infected young rabbits. This enhancement in cytokines is similar to what occurs in the blood of infected adult rabbits a few hours prior to death. Others have previously shown that RHDV infection of adult rabbits is related to a strong increase of mRNA levels of proinflammatory cytokines in the liver, target organ of viral replication [26,27]. The histopathological signs of fulminant hepatitis observed in the immunosuppressed, RHDV-infected young rabbits, similarly to what happens in adult rabbits having died from RHD, involved numerous apoptotic liver cells that are due to the cytopathic effect of viral replication and the exacerbated inflammatory response caused by the deregulated expression of cytokines detected in these animals, TNF- $\alpha$  in particular, since it is a well-known cell death mediator [26,27]. A similar phenomenon is seen in B hepatitis, where secretion of TNF- $\alpha$  by macrophages and infected hepatocytes contributes to liver cell death [28,29]. In contrast, young rabbits that are infected with RHDV present an early and only mild increase of proinflammatory cytokines [16]. This corroborates the idea that RHDV infection in young rabbits is associated with an early and adequate inflammatory immune response that may be vital in strongly limiting viral replication, and consequently allowing the more than 3 days that are required for the rabbits to develop a specific immune response against RHDV, similarly to what is observed in the few survivors of Ebola virus infection [10,30].

In conclusion, we demonstrate that the innate immune response of young rabbits is abrogated by the MPA treatment, changing young rabbits into hosts that become as susceptible to fatal calicivirus infection as naïve adult rabbits are. Thus we propose that the resistance of young rabbits to RHDV-infection is mediated by their particular innate immunity that is different from that of adult rabbits. Moreover, this discovery opens the way for a better understanding of the rationale of resistance of young rabbits to RHD.

#### Competing interests

The authors declare they have no competing interests.



# Authors' contributions

RMM designed the study, performed the animal experiments, wrote the manuscript and performed the statistical analysis. LT participated in the animal experiments, helped in the immunohistochemistry analysis and drafting the manuscript. JCR performed the ELISA and TUNEL assays. ACS participated in the animal experiments. APA participated in the study design, interpretation of the results and helped draft the manuscript. PGF contributed to the elaboration of the study design, interpretation of the results and helped draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

# Acknowledgements

We are grateful to Prof. Francisco Parra (University of Oviedo) for the offer of the initial sample of RHDV suspension that was used to infect the rabbits. We thank Ms. Manuela Silva and Ana Pinto for their excellent technical assistance. This work was funded by FCT – Portugal, grant no. PTDC/CVT/122905/2010, COMPETE and FEDER. Luzia Teixeira was supported by Fundo Social Europeu and MCTES through POPH-QREN Tipologia 4.2.

Received: 30 July 2013 Accepted: 21 January 2014

Published: 4 February 2014

# References

- Ohlinger VF, Haas B, Meyers G, Weiland F, Thiel HJ: Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease. *J Virol* 1990, **64**:3331–3336.
- Parra F, Prieto M: Purification and characterization of a calicivirus as the causative agent of a lethal hemorrhagic disease in rabbits. *J Virol* 1990, **64**:4013–4015.
- Abrantes J, van der Loo W, Le Pendu J, Esteves PJ: Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review. *Vet Res* 2012, **43**:12.
- Mikami D, Park JH, Kimura T, Ochiai K, Itakura C: Hepatic lesions in young rabbits experimentally infected with rabbit haemorrhagic disease virus. *Res Vet Sci* 1999, **66**:237–242.
- Ferreira PG, Costa-e-Silva A, Monteiro E, Oliveira MJ, Aguas AP: Transient decrease in blood heterophils and sustained liver damage caused by calicivirus infection of young rabbits that are naturally resistant to rabbit haemorrhagic disease. *Res Vet Sci* 2004, **76**:83–94.
- Ferreira PG, Costa-e-Silva A, Oliveira MJ, Monteiro E, Aguas AP: Leukocyte-hepatocyte interaction in calicivirus infection: differences between rabbits that are resistant or susceptible to rabbit haemorrhagic disease (RHD). *Vet Immunol Immunopathol* 2005, **103**:217–221.
- Ruvoën-Clouet N, Ganière JP, André-Fontaine G, Blanchard D, Le Pendu J: Binding of rabbit hemorrhagic disease virus to antigens of the ABH histo-blood group family. *J Virol* 2000, **74**:11950–11954.
- Nyström K, Le Gall-Reculé G, Grassi P, Abrantes J, Ruvoën-Clouet N, Le Moullac-Vaidye B, Lopes AM, Esteves PJ, Strive T, Marchandeau S, Dell A, Haslam SM, Le Pendu J: Histo-blood group antigens act as attachment factors of rabbit hemorrhagic disease virus infection in a virus strain-dependent manner. *PLoS Pathog* 2011, **7**:e1002188.
- Smid B, Valicek L, Rodak L, Stepanek J, Jurak E: Rabbit haemorrhagic disease: an investigation of some properties of the virus and evaluation of an inactivated vaccine. *Vet Microbiol* 1991, **26**:77–85.
- Shien JH, Shieh HK, Lee LH: Experimental infections of rabbits with rabbit haemorrhagic disease virus monitored by polymerase chain reaction. *Res Vet Sci* 2000, **68**:255–259.
- Ferreira PG, Costa-e-Silva A, Aguas AP: Liver disease in young rabbits infected by calicivirus through nasal and oral routes. *Res Vet Sci* 2006, **81**:362–365.
- Prieto JM, Fernandez F, Alvarez V, Espi A, Garcia Marin JF, Alvarez M, Martin JM, Parra F: Immunohistochemical localisation of rabbit haemorrhagic disease virus VP-60 antigen in early infection of young and adult rabbits. *Res Vet Sci* 2000, **68**:181–187.
- Huang HB: Vaccination against and immune response to viral haemorrhagic disease of rabbits: a review of research in the People's Republic of China. *Rev Sci Tech* 1991, **10**:481–498.
- Ferreira PG, Costa-e-Silva A, Oliveira MJ, Monteiro E, Cunha EM, Aguas AP: Severe leukopenia and liver biochemistry changes in adult rabbits after calicivirus infection. *Res Vet Sci* 2006, **80**:218–225.
- Marques RM, Costa ESA, Aguas AP, Teixeira L, Ferreira PG: Early acute depletion of lymphocytes in calicivirus-infected adult rabbits. *Vet Res Commun* 2010, **34**:659–668.
- Marques RM, Costa-E-Silva A, Aguas AP, Teixeira L, Ferreira PG: Early inflammatory response of young rabbits attending natural resistance to calicivirus (RHDV) infection. *Vet Immunol Immunopathol* 2012, **150**:181–188.
- Teixeira L, Marques RM, Aguas AP, Ferreira PG: A simple and rapid method for isolation of caliciviruses from liver of infected rabbits. *Res Vet Sci* 2011, **91**:164–166.
- Kishimoto C, Thorp KA, Abelman WH: Immunosuppression with high-doses of cyclophosphamide reduces the severity of myocarditis but increases the mortality in murine Coxsackievirus-B3 myocarditis. *Circulation* 1990, **82**:982–989.
- Miller TA, Schaefer FW 3rd: Characterization of a single dose methylprednisolone acetate immune suppression model using *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium parvum*. *Vet Parasitol* 2006, **141**:66–83.
- Miller TA, Schaefer FW 3rd: Methylprednisolone acetate immune suppression produces differing effects on *Cryptosporidium muris* oocyst production depending on when administered. *Vet Parasitol* 2007, **149**:77–84.
- Mitro S, Krauss H: Rabbit hemorrhagic disease: a review with special reference to its epizootiology. *Eur J Epidemiol* 1993, **9**:70–78.
- Kakimi K, Guidotti LG, Koezuka Y, Chisari FV: Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Exp Med* 2000, **192**:921–930.
- Thimme R, Wieland S, Steiger C, Ghayeb J, Reimann KA, Purcell RH, Chisari FV: CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol* 2003, **77**:68–76.
- Freeman BE, Hammarlund E, Raue HP, Slifka MK: Regulation of innate CD8 + T-cell activation mediated by cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, **109**:9971–9976.
- Heydtmann M: Macrophages in hepatitis B and hepatitis C virus infections. *J Virol* 2009, **83**:2796–2802.
- Sanchez-Campos S, Alvarez M, Culebras JM, Gonzalez-Gallego J, Tunon MJ: Pathogenic molecular mechanisms in an animal model of fulminant hepatic failure: rabbit hemorrhagic viral disease. *J Lab Clin Med* 2004, **144**:215–222.
- García-Lastra R, San-Miguel B, Crespo I, Jorquera F, Alvarez M, Gonzalez-Gallego J, Tunon MJ: Signaling pathways involved in liver injury and regeneration in rabbit hemorrhagic disease, an animal model of virally-induced fulminant hepatic failure. *Vet Res* 2010, **41**:2.
- González-Amaro R, García-Monzón C, García-Buey L, Moreno-Otero R, Alonso JL, Yagüe E, Pivel JP, López-Cabrera M, Fernández-Ruiz E, Sánchez-Madrid F: Induction of tumor necrosis factor alpha production by human hepatocytes in chronic viral hepatitis. *J Exp Med* 1994, **179**:841–848.
- Lara-Pezzi E, Majano PL, Gomez-Gonzalo M, García-Monzon C, Moreno-Otero R, Levrero M, Lopez-Cabrera M: The hepatitis B virus X protein up-regulates tumor necrosis factor alpha gene expression in hepatocytes. *Hepatology* 1998, **28**:1013–1021.
- Baize S, Leroy EM, Georges AJ, Georges-Courbot MC, Capron M, Bedjabaga I, Lansoud-Soukate J, Mavoungou E: Inflammatory responses in Ebola virus-infected patients. *Clin Exp Immunol* 2002, **128**:163–168.

doi:10.1186/1297-9716-45-14

**Cite this article as:** Marques et al.: Immunosuppression abrogates resistance of young rabbits to Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD). *Veterinary Research* 2014 **45**:14.

## CAPÍTULO 7

---

**Is the expression of the calicivirus (RHDV) receptor on hepatocytes different in young and adult rabbits?**

Marques, R.M., Teixeira, L., Águas, A.P., Costa-e-Silva, A., Ferreira, P.G.

Estudo original não publicado



Is the expression of the calicivirus (RHDV) receptor on hepatocytes  
different in young and adult rabbits?

**Raquel M. Marques \*, Luzia Teixeira, Artur P. Águas, António Costa-e-Silva,**

**Paula G. Ferreira**

*Department of Anatomy, ICBAS (Abel Salazar Institute for Biomedical Science) and*

*UMIB (Unit for Multidisciplinary Biomedical Research), University of Porto, Portugal,*

*European Union.*

**\* Corresponding author**

**E-mail addresses:**

R.M.M.: ramarques@icbas.up.pt

L.T.: lnteixeira@icbas.up.pt

A.P.A.: aguas@icbas.up.pt

A.C.S.: costasilvemail@gmail.com

P.G.F.: pferreir@icbas.up.pt

## Abstract

Millions of adult rabbits are currently dying all over the world due to Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD), a lethal infectious disease caused by a calicivirus that replicates inside hepatocytes and destroys the liver of its host. In contrast, the same calicivirus triggers just a subclinical disorder in young rabbits that present a few infected hepatocytes. Since the hepatocyte is used for calicivirus replication, we decided to investigate the nature of calicivirus receptors and to evaluate its expression on the hepatocyte membrane of adult and young rabbits. We found that this viral receptor is a macroglycolipid; its expression on the hepatocyte membrane appears to be similar in young and adult rabbits. These data favors the view that differences in the expression of calicivirus receptors on the membrane of hepatocytes are not a probable molecular rationale to explain why adult rabbits die from calicivirus infection and young rabbits are resistant to the virus.

**Keywords:** RDHV; receptor; hepatocyte; sialoglycoproteins; macroglycolipids



## 1 Introduction

2 Rabbit Hemorrhagic Disease (RHD) is a lethal infection caused by a virus of the  
3 *Caliciviridae* family (RHDV) that kills 40-90% of adult rabbits of the species *Oryctolagus*  
4 *cuniculus* [1-3]. RHDV has a special tropism for hepatocytes, with the liver being the  
5 main target organ for viral replication and where lethal histopathological lesions are  
6 found in necropsy [2, 4, 5]. Several studies, including our own, have demonstrated that  
7 the number of hepatocytes infected with RHDV is different in adult and young rabbits,  
8 i.e., infected young rabbits showed only a few infected hepatocytes circumscribed by  
9 inflammatory infiltrates, whereas, in infected adult rabbits, most hepatocytes were  
10 infected with RHDV [4, 6-9]. This small number of infected hepatocytes has been seen  
11 by some to reflect a lack of viral receptors on the membrane of most liver cells of young  
12 rabbits and thus could be a resistance factor to the infection. Interestingly, unlike the  
13 epithelium of upper respiratory and digestive tracts, rabbit hepatocytes do not express  
14 the histo-blood group antigens (HBGAs), that work as receptors to the calicivirus, which  
15 suggest that the viral receptor on the membrane of liver cells must be another one [10,  
16 11]. A study of ours showed that RHDV becomes able to cause a massive infection of  
17 hepatocytes in immunosuppressed young rabbits and this infection is alike what is  
18 observed in adult rabbits that die from RHD [12]. Thus, these data weaken the  
19 hypothesis that resistance of young rabbits to RHDV infection derives from a different  
20 expression of the viral receptor in the liver. In the present work, we have investigated  
21 the chemical nature of the viral receptor on the membrane and we have compared the  
22 expression of the viral receptor in livers of young and adult rabbits.

## 25 Material and methods

26 Two adult rabbits (10 weeks-old) and 2 youngsters (4 weeks-old) were euthanized  
27 as previously described by Marques et al. (2012) [13]. Liver samples of each rabbit

1 were collected and used for RHDV receptor isolation/quantification and others were  
2 preserved in OCT at -80 °C for posterior immunodetection of the receptor as described  
3 below.

4 We have isolated membrane suspensions from hepatocytes of young and adult  
5 rabbits (3 g of liver / animal) and then fractionated them in sialoglycoproteins and  
6 macroglycolipids using an adaptation of the protocol previously described by Ruvoën-  
7 Clouet et al. 1995 [14] (Figure 1). These fractions were used in an ELISA-inhibition test  
8 in order to determine which one was able to inhibit the binding of RHDV to specific  
9 antibodies coated in the plate. The ELISA was performed according to manufacturer's  
10 instructions (INGEZIM RHDV 17.RHD.K2 kit, Ingenasa), except in the step of  
11 incubation with RHDV (Ast/89 strain; titre,  $2^4$ ) or with the purified control liver  
12 suspension. In this case, the virus was initially incubated, 10min., with the respective  
13 fraction of macroglycolipids or sialoglycoproteins titrated, and later these conjugates  
14 were added to each well of the plate.

15 Liver cryosections (7 µm thick) of adult and young rabbits were used to detect, by  
16 immunocytochemical analysis, the presence of RHDV bound to viral receptor in the  
17 hepatocyte membrane. The cryosections were removed from -80°C and left to air-dry  
18 during 2 hours. Afterwards, they were washed 3 x 5 min in PBS. The endogenous  
19 peroxidase was blocked with 1.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol. Then, they were washed 5 min  
20 with H<sub>2</sub>O and 2 x 5 min in PBS. The cryosections were incubated with rabbit normal  
21 serum (1:5) in 10% BSA diluted in PBS, during 30 min. After that they were incubated  
22 with purified RHDV [15], overnight, at 4°C. The next steps were identical to the protocol  
23 described by Marques et al. 2012, with the exception of the substrate used, which in  
24 this case it was AEC substrate (Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

25 Statistical comparison of data from all groups of rabbits was performed using the  
26 Mann-Whitney test calculated with GraphPad Prism, version 5.0a, software.  
27 Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

## Results and Discussion

We have isolated the sialoglycoprotein (SGP) and macroglycolipid (MGL) fractions from liver membrane preparations of young and adult rabbits. These fractions were used in an ELISA-inhibition test, to identify which one was able to inhibit the binding of RHDV to specific antibodies that coated the plates. The MGL fraction was found to inhibit the binding of the virus to the coated antibodies. The receptor seems to bind specifically to the virus since the MGL fraction did not bind to other molecules present in the purified control liver suspension. Additionally, the MGL fraction isolated from hepatocyte membranes [note that membrane preparations were normalized by protein concentration (2mg/mL) before extraction] appears to inhibit the binding of RHDV to the coated antibodies equally in adult and young rabbits (Figure 2).

Immunohistochemical analysis of cryosections of liver tissue corroborated the ELISA results since it showed that RHDV binds similarly to hepatocytes of young and adult rabbits (Figure 3). Interestingly, the staining was heavier in the periportal space than in the intralobular zone; this may contribute to explain why hepatocellular damage in RHD is more severe on the periphery of lobules and in periportal spaces [7, 16]. These data contradict previous histological results documented by others showing that RHDV did not bind to liver cells [10, 17]. This contradiction may derive from the fact that the authors have used fixed tissue samples and we have employed frozen unfixed tissue samples preserved in OCT at -80 °C. It is well established that several immunological epitopes are better preserved in frozen-tissue sections than in fixed tissue samples, since fixatives may interfere with epitope structure [18, 19]. Additionally, we have mimicked the methods used by these authors, i.e., we have used tissue samples, fixed in 95% ethanol and in formaldehyde, and we equally verified that in these cases the RHDV was not able of binding to the membrane of hepatocytes (data not shown).

Our immunohistochemical analysis is consistent with our recent findings that immunosuppressed, RHDV-infected young rabbits bear a heavy labeling for RHDV, in a pattern that is akin to that observed in infected adult rabbits dying from RHD [15].

1 Finally, our data suggest that RHDV is able of infecting equally the hepatocytes of adult  
2 and young rabbits.

### 5 **Acknowledges**

6 We are grateful to Prof. Francisco Parra (University of Oviedo) for the offer of the initial  
7 sample of RHDV suspension. We thank Ms. Manuela Silva for excellent technical  
8 assistance. This work was funded by FCT – Portugal, grant no.  
9 PTDC/CVT/122905/2010, COMPETE and FEDER. Luzia Teixeira was supported by  
10 Fundo Social Europeu and MCTES through POPH-QREN Tipologia 4.2.

## References

1. Xu W: **Viral haemorrhagic disease of rabbits in People's Republic of China - epidemiology and virus characterisation.** *Rev sci tech Off int Epiz* 1991, **10**:393-408.
2. Mitro S, Krauss H: **Rabbit hemorrhagic disease: a review with special reference to its epizootiology.** *Eur J Epidemiol* 1993 **9**:70-78.
3. Ohlinger VF, Haas B, Thiel HJ: **Rabbit hemorrhagic disease (RHD): characterization of the causative calicivirus.** *Vet Res* 1993 **24**:103-116.
4. Shien JH, Shieh HK, Lee LH: **Experimental infections of rabbits with rabbit haemorrhagic disease virus monitored by polymerase chain reaction.** *Res Vet Sci* 2000 **68**:255-259.
5. Marcato PS, Benazzi C, Vecchi G, Galeotti M, Della Salda L, Sarli G, Lucidi P: **Clinical and pathological features of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome.** *Revue scientifique et technique* 1991 **10**:371-392.
6. Mikami D, Park JH, Kimura T, Ochiai K, Itakura C: **Hepatic lesions in young rabbits experimentally infected with rabbit haemorrhagic disease virus.** *Res Vet Sci* 1999 **66**:237-242.
7. Prieto JM, Fernandez F, Alvarez V, Espi A, Garcia Marin JF, Alvarez M, Martin JM, Parra F: **Immunohistochemical localisation of rabbit haemorrhagic disease virus VP-60 antigen in early infection of young and adult rabbits.** *Res Vet Sci* 2000 **68**:181-187.
8. Ferreira PG, Costa-e-Silva A, Monteiro E, Oliveira MJ, Aguas AP: **Transient decrease in blood heterophils and sustained liver damage caused by calicivirus infection of young rabbits that are naturally resistant to rabbit haemorrhagic disease.** *Res Vet Sci* 2004 **76**:83-94.

9. Ferreira PG, Costa ESA, Oliveira MJ, Monteiro E, Aguas AP: **Leukocyte-hepatocyte interaction in calicivirus infection: differences between rabbits that are resistant or susceptible to rabbit haemorrhagic disease (RHD).** *Vet Immunol Immunopathol* 2005 **103**:217-221.
10. Ruvoen-Clouet N, Ganiere JP, Andre-Fontaine G, Blanchard D, Le Pendu J: **Binding of rabbit hemorrhagic disease virus to antigens of the ABH histo-blood group family.** *J Virol* 2000 **74**:11950-11954.
11. Guillon P, Ruvoen-Clouet N, Le Moullac-Vaidye B, Marchandeau S, Le Pendu J: **Association between expression of the H histo-blood group antigen, alpha1,2fucosyltransferases polymorphism of wild rabbits, and sensitivity to rabbit hemorrhagic disease virus.** *Glycobiology* 2009 **19**:21-28.
12. Marques RM, Teixeira L, Aguas AP, Ribeiro JC, Costa-e-Silva A, Ferreira PG: **Immunosuppression abrogates resistance of young rabbits to Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD).** *Vet Res* 2014, **45**:14.
13. Marques RM, Costa-E-Silva A, Aguas AP, Teixeira L, Ferreira PG: **Early inflammatory response of young rabbits attending natural resistance to calicivirus (RHDV) infection.** *Vet Immunol Immunop* 2012 **150**:181-188.
14. Ruvoen-Clouet N, Blanchard D, Andre-Fontaine G, Ganiere JP: **Partial characterization of the human erythrocyte receptor for rabbit haemorrhagic disease virus.** *Research in virology* 1995 **146**:33-41.
15. Teixeira L, Marques RM, Aguas AP, Ferreira PG: **A simple and rapid method for isolation of caliciviruses from liver of infected rabbits.** *Res Vet Sci* 2011 **91**:164-166.
16. Park JH, Itakura C: **Detection of rabbit haemorrhagic disease virus antigen in tissues by immunohistochemistry.** *Res Vet Sci* 1992 **52**:299-306.
17. Nystrom K, Le Gall-Recule G, Grassi P, Abrantes J, Ruvoen-Clouet N, Le Moullac-Vaidye B, Lopes AM, Esteves PJ, Strive T, Marchandeau S, et al: **Histo-blood group antigens act as attachment factors of rabbit**

1        **hemorrhagic disease virus infection in a virus strain-dependent manner.**

2        *PLoS Pathogens* 2011 **7**:e1002188.

3    18.    Oorschot V, de Wit H, Annaert WG, Klumperman J: **A novel flat-embedding**  
4        **method to prepare ultrathin cryosections from cultured cells in their in**  
5        **situ orientation.** *The journal of histochemistry and cytochemistry : official*  
6        *journal of the Histochemistry Society* 2002, **50**:1067-1080.

7    19.    Jiang X, Kalajzic Z, Maye P, Braut A, Bellizzi J, Mina M, Rowe DW:  
8        **Histological analysis of GFP expression in murine bone.** *The journal of*  
9        *histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*  
10       2005, **53**:593-602.

## Captions

**Figure 1** Diagram of the protocol used to isolate sialoglycoproteins and macroglycolipids fractions from membrane isolates of livers from young and adult rabbits.

**Figure 2** Inhibition titre of sialoglycoprotein (SGP) and macroglycolipid (MGL) fractions obtained from the membrane of the hepatocytes of adult and young rabbits; Mann-Whitney test (ns – not significant). The MGL fraction was able to inhibit the binding of RHDV to specific antibodies coated in the plate (monoclonal antibodies anti-RHDV) contrary to SGP fraction.

**Figure 3** Light micrographs of cryosections (7µm) of liver. Positive immunoperoxidase labeling for the RHDV is found on hepatocyte membrane (red staining) and the tissue sections were counterstained with haematoxylin; bars 100 µm. **(A)** Young rabbit (4 weeks-old); liver section was labelled with an anti-VP60 mouse antiserum. **(B)** Adult rabbit (10 weeks-old); liver section labelled with an anti-VP60 mouse antiserum. **(C)** Young rabbit (4 weeks-old); liver section was labelled with control serum. **(D)** Adult rabbit (10 weeks-old); liver section was labelled with control serum.



Figure 1

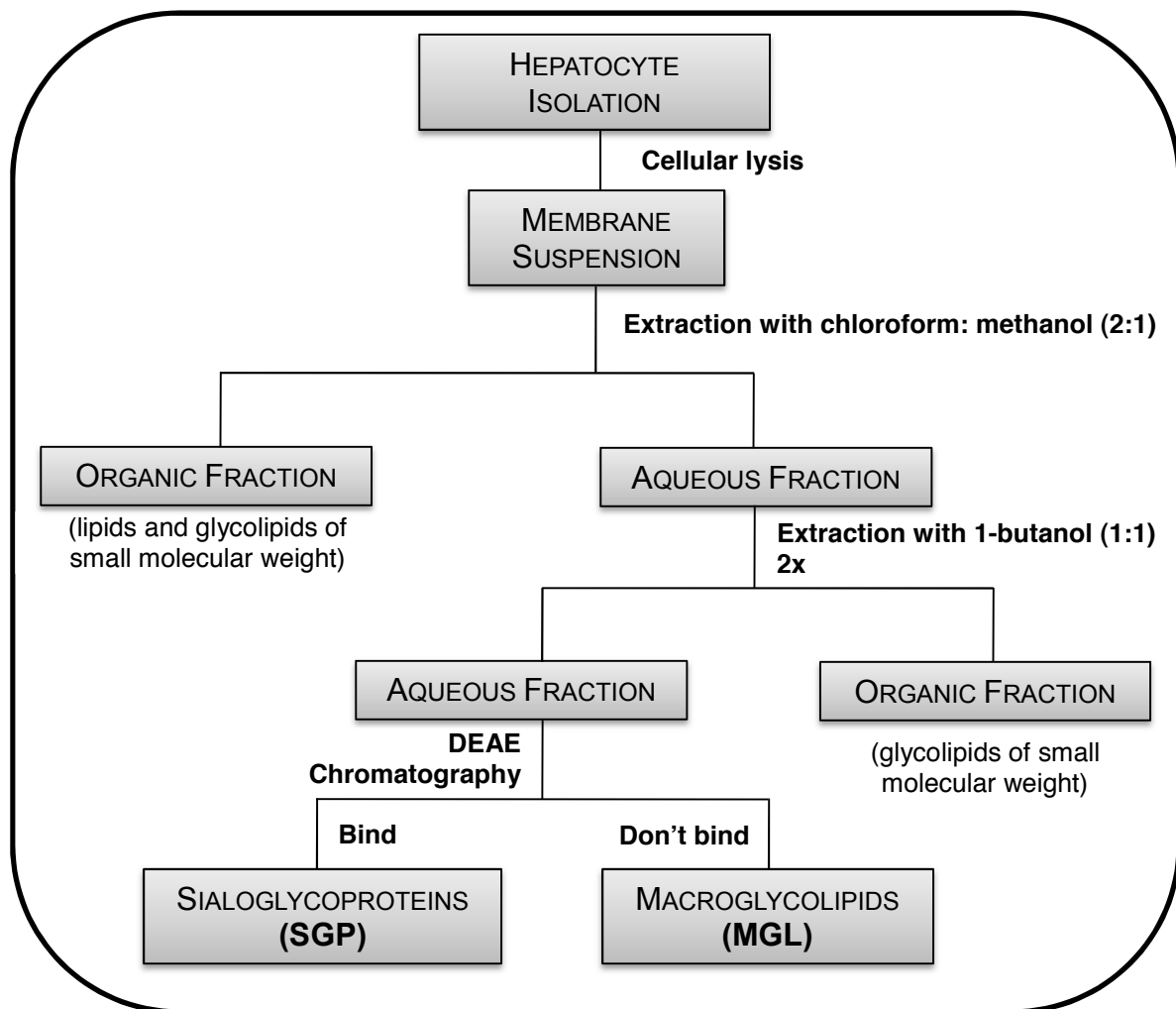


Figure 2

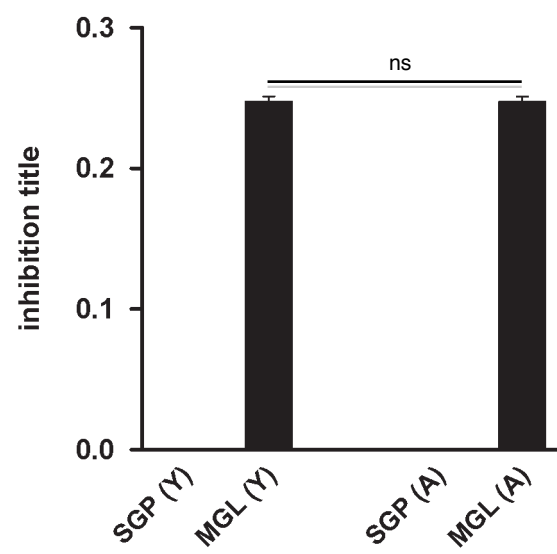
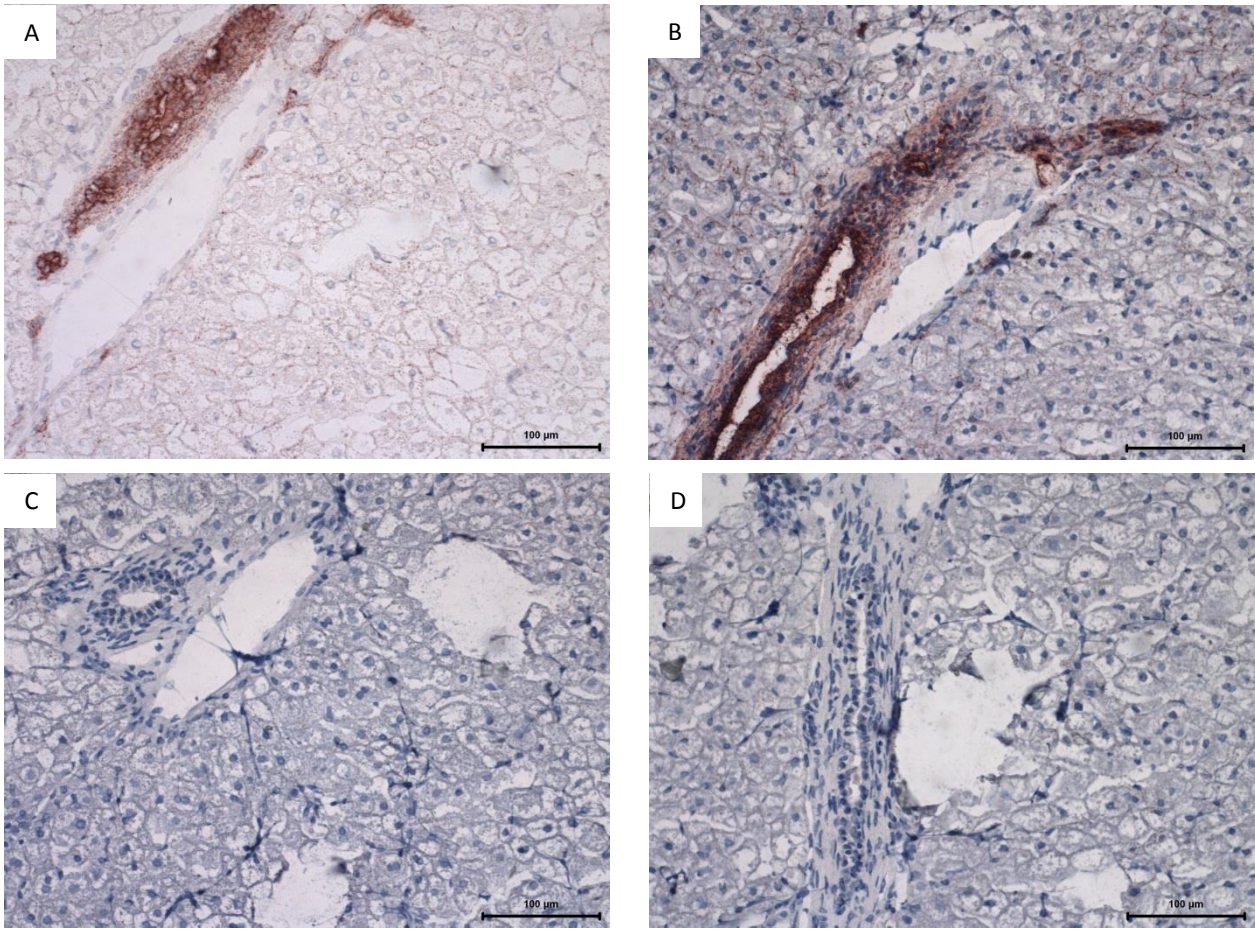


Figure 3





## **CAPÍTULO 8**

---

### **8. Discussão Geral**

**8.1. Caracterização de Populações Leucocitárias após Infecção com VDHC**

**8.2. Produção de Citocinas após Infecção com VDHC**

**8.3. Mecanismos de Evasão do VDHC à Resposta do Hospedeiro**

**8.4. Infecção do Hepatócito em Coelhos Adultos e Jovens**

**8.5. Comentários Gerais à Resistência Natural dos Coelhos Jovens à DHC**

**8.6. Conclusões e Perspetivas Futuras**

**8.7. Referências Bibliográficas**



## 8. Discussão Geral

A Doença Hemorrágica do Coelho (DHC) é uma doença infecciosa altamente contagiosa, causada por um vírus da família *Caliciviridae* específico do coelho europeu (*Oryctolagus cuniculus*), responsável pela morte de 90% dos coelhos adultos infetados [1]. Devido à sua elevada morbilidade e mortalidade, a DHC tem causado perdas económicas importantes e desequilíbrios graves de ecossistemas, já que a carne de coelho faz parte da dieta de países como Portugal e o coelho é tido como o principal meio de subsistência de várias espécies predadoras [1, 2]. O melhor entendimento da patogenia da DHC poderá contribuir para melhorar o controlo da doença, sendo que um dos seus aspetos por clarificar relaciona-se com a evidência, documentada desde 1984 [3], de que os coelhos jovens (idade inferior a 4 semanas) são totalmente resistentes à infeção causada pelo mesmo calicivírus que mata cerca de 90% dos coelhos adultos infetados [4-6]. Os poucos estudos realizados neste âmbito, entre os quais se incluem os do nosso grupo de investigação, mostraram que os coelhos jovens desenvolvem uma doença subclínica, caracterizada por uma diminuição abrupta e transitória dos heterófilos circulantes, e por lesões hepáticas moderadas, e circunscritas, a que se associam infiltrados inflamatórios mononucleares [4, 5, 7, 8]. Pelo contrário, os coelhos adultos desenvolvem uma leucopenia grave, a qual se instala às 12-18 horas de infeção e se mantém até ao culminar da doença, isto é, até ao estabelecimento de uma hepatite necrótica generalizada, que conduz à morte do animal [9]. Ainda muito pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares exatos que estão envolvidos neste fenómeno. Antes dos estudos relatados nesta tese, foram propostos dois mecanismos principais, agindo em combinação ou não, para explicar a resistência ou suscetibilidade dos coelhos à infeção pelo VDHC. Assim foi postulado que a interação entre o VDHC e o sistema imunitário poderia contribuir para as diferentes manifestações da infeção nos coelhos jovens e adultos; em alternativa foi considerado que o menor número de hepatócitos infetados nos coelhos jovens, relativamente, à infeção generalizada dos hepatócitos nos coelhos adultos, seria reflexo de uma escassez de recetores virais na membrana das células hepáticas. Nesta tese documenta-se que a infeção por VDHC induz uma resposta imunológica diferente nos coelhos jovens e

nos adultos. Nos animais adultos provoca a depleção dos linfócitos B e T, alteração que precede a lesão hepática e se acentua até à morte dos animais (capítulo 3). Nos coelhos jovens a infeção induz uma resposta celular e inflamatória que culmina na produção de anticorpos específicos anti-VDHC que são protetores contra a doença (capítulo 4). Interessantemente, se esta resposta imune nos coelhos jovens for suprimida, estes tornam-se suscetíveis à infeção, ou seja desenvolvem o mesmo quadro clínico que os coelhos adultos infetados, morrendo de DHC em 1 a 3 dias (capítulo 6). Posteriormente verificou-se que o recetor no fígado de coelhos é de natureza lipídica, não existindo diferenças na expressão do mesmo na membrana dos hepatócitos entre coelhos jovens e adultos (capítulo 7).

Discutimos de seguida alguns destes aspetos associados à infeção dos coelhos pelo VDHC.

### **8.1. Caracterização de Populações Leucocitárias após Infeção com VDHC**

Apesar de vários dados histopatológicos terem demonstrado que a resposta inflamatória celular à infeção por VDHC é diferente em coelhos que são suscetíveis (adultos) ou resistentes (jovens) à DHC [4, 5, 7, 9, 10], pouco se sabe sobre a dinâmica e fenótipo das subpopulações leucocitárias presentes quer no fígado (órgão primário da replicação viral), como no baço destes animais (essencial no desenvolvimento da resposta imune adaptativa). A importância de se atingir este conhecimento era ainda realçada pelo facto dos coelhos adultos morrerem depois de desenvolverem uma hepatite fulminante que é precedida e acompanhada por uma leucopenia grave [9], enquanto os coelhos jovens sobrevivem depois de desenvolverem uma hepatite moderada e apresentarem, no soro, anticorpos específicos anti-VDHC [5, 11]. Por conseguinte, um estudo mais aprofundado destas populações celulares era fundamental para uma melhor compreensão da patogenia da DHC, nomeadamente dos mecanismos imunológicos que podem estar associados à resistência ou à suscetibilidade. Os trabalhos experimentais relatados nos capítulos 3, 4 e 5 tiveram, em parte, como objetivo preencher essa lacuna na



caraterização das populações que intervêm na resposta imune à infeção por VDHC em coelhos adultos e jovens.

Mostrámos que nos coelhos adultos infetados com VDHC, a ausência de infiltrados mononucleares no fígado, que são comuns nos coelhos jovens [1, 6, 10], e a redução linfocitária no baço [10], estavam associadas à depleção de ambas as populações de linfócitos B e T, 24 horas após a infeção. Essa depleção era resultado de apoptose celular e precedia a hepatite fulminante que mata os coelhos adultos (capítulo 3). Muito provavelmente, a apoptose generalizada será induzida de forma indireta e não será resultado do efeito citopático direto do vírus sobre os linfócitos já que não existe evidência de que o VDHC infete estas células [12]. Segundo os resultados reportados no capítulo 5, a depleção dos linfócitos T no baço deve-se em parte à diminuição significativa da subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, mostrando que a infeção dos coelhos adultos com VDHC induz supressão de populações intervenientes na resposta imune adaptativa (quer humoral, quer mediada por células), comprometendo assim a eficácia da resposta à infeção e a sobrevivência do hospedeiro. É pertinente recordar que este fenómeno é também caraterístico de outras febres hemorrágicas humanas, como é o caso das infeções causadas pelos vírus Ébola e Marburgo que, à semelhança da DHC, apresentam uma elevada taxa de mortalidade (35-90%) e estão associadas a elevados títulos virais, disfunção hepática e coagulopatia [13-15]. Em casos fatais, ambos os vírus induzem uma depleção precoce e extensa dos linfócitos circulantes, esplénicos e presentes nos gânglios linfáticos, que tal como é sugerido para a DHC é resultado de apoptose indireta de células B, T e das subpopulações T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, já que os vírus não infetam linfócitos [14-21]. No caso da infeção pelo vírus Ébola foi sugerido que essa depleção resultava da ação de mediadores expressos ou produzidos por células infetadas, como por exemplo o *TNF- $\alpha$* , tendo-se ainda deduzido que a via extrínseca de ativação de apoptose [via *Fas associated protein with death domain (FADD)*, molécula que todos os recetores de morte celular usam para transmitir o sinal apoptótico] contribui para a apoptose das células [14, 15]. Relativamente à DHC, o *TNF- $\alpha$*  é também um candidato provável à indução da apoptose, já que este está presente em quantidades elevadas no soro dos coelhos adultos (dados não publicados).

Paradoxalmente os doentes que recuperam destas infeções virais (Ébola e Marburgo) desenvolvem uma resposta inflamatória precoce acompanhada por respostas humoral (produção de anticorpos IgM e IgG) e mediada por células (ativação de células citotóxicas responsáveis pela irradicação dos antígenos presentes no sangue) específicas e robustas [19, 22-24]. Tal parece identicamente suceder com os coelhos jovens que são naturalmente resistentes à infeção com o VDHC. Efetivamente, nós reportámos que estes animais após infeção desenvolvem uma resposta inflamatória adequada e precoce (*IFN- $\alpha$* , *IFN- $\gamma$* , *IL-6*, *IL-1*, *IL-8*, *TNF- $\alpha$* , no soro às 6 horas), a qual é acompanhada pelo aumento, às 48 horas, de macrófagos, linfócitos B e T, quer no fígado (local da infeção) quer no baço. O aumento dos linfócitos T deve-se à elevação de ambas as subpopulações, tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup> (capítulo 4). O aumento do número dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> logo após as 24 horas de infeção é indicador de que esta subpopulação pode ter um papel importante na *clearance* viral, fenómeno também observado nas infeções pelos vírus Ébola e Marburgo [25, 26] e que parece ser apoiado pela ausência de partículas virais no fígado dos coelhos jovens aos 7 dias de infeção (capítulo 6). O aumento dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> às 48 horas pode ser indicação de que uma resposta específica está a ser ativada, já que estas células têm um papel essencial na ativação e proliferação das células T citotóxicas e dos linfócitos B (mudança de isotipo e produção de anticorpos), como na maximização da atividade microbicida dos fagócitos [27, 28]. Também observamos um aumento de linfócitos B, quer às 48 horas (fígado e baço) quer aos 7 dias após infeção (no fígado), tempo este que é coincidente com a deteção no soro de anticorpos específicos para o VDHC (capítulo 4). Estes dados são reveladores de que a primeira fase da resposta imune é crucial no controlo da infeção e que ambas as respostas imunes, humoral e mediada por células, são importantes para a sobrevivência do hospedeiro, já que quando suprimidas, como parece estar a acontecer nos coelhos adultos infetados, os animais sucumbem à infeção. O mesmo ocorre nos coelhos jovens que foram imunossuprimidos pelo acetato de metilprednisolona antes da infeção (capítulo 6). Nestes a passagem de um estado de resistência a suscetibilidade pode dever-se, em parte, à supressão da resposta imune inata, isto é, à inibição dos processos de apresentação antigénica, atividade fagocitária, ou

ação efetora das células *NK* (*Natural Killer*), T *NK* ou, possivelmente, T CD8<sup>+</sup>, já que estas têm um papel importante no controlo da replicação viral. Estudos sobre as infeções pelo vírus Ébola e Marburgo mostraram também que quer as células *NK*, quer os linfócitos T *NK* e T CD8<sup>+</sup> são cruciais no controlo da infeção [26, 29, 30].

Ao contrário dos coelhos jovens que desenvolvem uma resposta inflamatória adequada, os coelhos adultos infetados com VDHC desenvolvem uma resposta inflamatória exacerbada, pouco antes da morte, caracterizada pela libertação abrupta e acentuada de citocinas pró-inflamatórias (*TNF- $\alpha$* , *IL-6*, *IL-8*, *IL-1*, *IFN- $\alpha$* , *IFN- $\gamma$* ) e anti-inflamatórias (*IL-10*) no sangue destes animais (dados não publicados). Outros autores mostraram ainda que o aumento destes mediadores no fígado podia contribuir significativamente para a lesão hepatocelular [31]. No capítulo 5, mostrámos que nos coelhos adultos infetados há depleção preferencial das células esplénicas T reguladoras (CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) às 24 horas de infeção. Tendo em conta que uma função importante destas células consiste em regular a inflamação, evitando que esta passe a ser nefasta para o hospedeiro, foi sugerido que a depleção destas células terá influência na evolução natural da doença (capítulo 5). Pode assim concluir-se que para além de suprimir a resposta imune adaptativa, a infeção por VDHC em coelhos adultos é também responsável pela desregulação da resposta imune inata. No caso da infeção pelos vírus Ébola e Marburgo essa desregulação é causada em parte pelos monócitos/macrófagos infetados [32]. Está descrito que macrófagos infetados pelo vírus Ébola (Zaire) libertam mediadores como o óxido nítrico, que provoca a perda do tônus do músculo liso vascular, e que macrófagos infetados com o vírus Ébola ou Marburgo libertam quantidades elevadas de citocinas, especialmente *TNF- $\alpha$* , levando ao aumento da permeabilidade do endotélio [33]. Inclusive foi sugerido que este fenómeno resultará predominantemente do efeito destes mediadores em vez de resultar da infeção das células endoteliais [19, 32-34], o que levou a que fosse proposto que nestas febres hemorrágicas virais os macrófagos desempenham um papel importante quer na disseminação do vírus, quer na patogenia da doença [32]. Também na infeção de coelhos adultos com VDHC está documentado que o vírus está presente nos monócitos circulantes e

macrófagos de vários tecidos, sendo que os primeiros estão frequentemente associados a superfícies endoteliais alteradas [12]. Adicionalmente foi aventado que os macrófagos infectados são uma fonte de citocinas (ex.: *TNF- $\alpha$* ) e quimiocinas, as quais contribuem para estimular a inflamação e, possivelmente, para a lesão do endotélio, constituindo, por conseguinte, um fator importante na patogenia da DHC [12]. Tal como referido no capítulo 1, o facto da via natural de entrada do VDHC ser em parte nasal, levou a que se sugerisse que a presença do vírus nos macrófagos alveolares, associada à sua proximidade à corrente sanguínea podia constituir um fator importante na disseminação do vírus [35].

## **8.2. Produção de Citocinas após Infecção com VDHC**

A infecção por VDHC induz uma resposta inflamatória precoce e adequada nos coelhos jovens, enquanto nos coelhos adultos causa uma resposta inflamatória exacerbada que precede a morte dos animais. Nos coelhos jovens a resposta é caracterizada por aumento precoce e moderado de *TNF- $\alpha$*  no soro (6 horas), o qual atinge o pico às 48 horas e retorna a valores basais aos 7 dias, bem como por um aumento precoce (6 horas) e significativo de *IFN- $\alpha$*  (importante na resposta antiviral) e *IL-1* no soro, os quais se mantêm elevados até às 18 horas de infecção. É também observado um aumento de *IFN- $\gamma$*  às 6 horas de infecção, apesar de não significativo, para além de um aumento moderado de *IL-6* e *IL-8* (capítulo 4). Nos coelhos adultos observa-se um aumento exponencial de *TNF- $\alpha$*  no soro que se inicia às 12 horas após a infecção e um aumento de *IFN- $\alpha$*  e *IL-1* entre as 6 -18 horas, apesar de significativamente inferior ao detetado no soro dos coelhos jovens infectados. A partir das 12 horas regista-se um ligeiro aumento de *IL-6* no soro e a partir das 18 horas de *IL-8*. Relativamente, aos níveis séricos de *IFN- $\gamma$*  e *IL-10* não há alterações até às 24 horas de infecção, momento em que todas as citocinas aumentaram abruptamente no soro dos coelhos adultos (dados não publicados). Estes dados evidenciam que os coelhos jovens infectados com VDHC parecem ser capazes de desenvolver uma resposta antiviral rápida e eficaz, refletida pelo aumento de *IFN- $\alpha$*  e *IL-1*, enquanto nos coelhos adultos infectados esta parece estar ausente, na medida em que se observa uma hipersecreção de

citocinas, pro e anti-inflamatórias, habitualmente designada como “tempestade de citocinas”, um fenómeno altamente deletério para o hospedeiro. Similarmente, os coelhos jovens imunossuprimidos e infetados exibem o mesmo fenómeno, ou seja, um aumento exponencial de citocinas pro e anti-inflamatórias (*TNF- $\alpha$* , *IL-6*, *IL-10*) no soro, momentos antes da morte (capítulo 6). Mais uma vez o mesmo fenómeno é observado em casos fatais causados pela infeção pelo vírus Ébola [18]. A maior parte dos estudos sobre infeção por Ébola mostra produção excessiva de *TNF- $\alpha$* , *IL-1RA* (*interleukin 1 receptor antagonist*), *IL-6* e *IL-10* no soro destes doentes; num estudo mais completo foi mesmo documentado um aumento significativo de *IL-1 $\beta$* , *IL-8*, *IL-15*, entre outras citocinas pró-inflamatórias, não sendo registado nenhum aumento do *IFN- $\alpha$ 2*, o que sugeriu que nestes casos a resposta antiviral está suprimida [18, 19]. Em contrapartida, os doentes sobreviventes à infeção pelo vírus Ébola, tal como os coelhos jovens, desenvolvem uma resposta inflamatória adequada, caracterizada pelo aumento precoce e transitório de *TNF- $\alpha$* , *IL-6*, *IL-1 $\beta$* , *MIP-1 $\alpha$*  (*Macrophage Inflammatory Protein  $\alpha$* ), *MIP-1 $\beta$*  (*Macrophage Inflammatory Protein  $\beta$* ), e numa fase mais tardia (anti-inflamatória) *IL-1RA* e recetores solúveis, *sTNF-R* (*soluble TNF Receptor*) e *sIL-6R* (*soluble IL-6 Receptor*) [24, 36].

No capítulo 5, ficou documentado que quer a *IL-10* como o *TGF- $\beta$* , citocinas anti-inflamatórias, aumentam significativamente 24 horas após a infeção no soro de coelhos adultos, não sofrendo, no entanto, alterações dos seus níveis nos coelhos jovens. Apesar de aumentadas nos coelhos adultos, estas parecem não ser capazes de inibir a resposta inflamatória, já que a morte dos animais, entre 24-72 horas após infeção por VDHC, surge associada à indução do fenómeno de “tempestade de citocinas” causador de toxicidade sistémica.

Outros autores analisaram a expressão e produção de citocinas no fígado de coelhos adultos experimentalmente infetados pelo VDHC, tendo observado um aumento significativo de ARNm de *TGF- $\beta$*  às 24 horas e *TNF- $\alpha$*  às 36 horas de infeção [37], bem como um aumento de *TNF- $\alpha$*  às 12 horas, o qual se manteve elevado durante o decurso da doença, e um aumento transitório de *IL-6* [31]. O grau de lesão celular presente no fígado dos coelhos adultos infetados com VDHC levou estes autores a sugerirem que a produção marcada de *TNF- $\alpha$*  (conhecido mediador de apoptose celular) pode constituir um fator necrotizante

crucial no desenvolvimento da hepatite fulminante que mata os animais adultos [31, 37]. Interessantemente, as nossas observações histológicas do tecido hepático de animais adultos vítimas de DHC parecem corroborar esta hipótese, na medida em que frequentemente se observam células hepáticas com sinais de morte celular, mas que não estão infectadas pelo VDHC (capítulo 2). Adicionalmente, os mesmos autores postularam que tanto os macrófagos como os monócitos infectados podem ser fonte de *TNF- $\alpha$* , bem como os hepatócitos infectados, já que em ratos e pacientes que desenvolvem hepatite fulminante estas células expressam quantidades elevadas de *TNF- $\alpha$*  e do seu recetor [37]. Mais uma vez este putativo mecanismo fisiopatológico poderá ser semelhante ao observado nas infeções causadas pelos vírus Ébola e Marburgo, nas quais foi relatado que os macrófagos infectados produzem não somente quantidades elevadas de *TNF- $\alpha$* , como dito no ponto anterior, mas também *IL-1*, *IL-6* e *IL-8* [32]. Acresce dizer que a ausência de regeneração hepática nos coelhos adultos infectados com VDHC pode estar associada à expressão de *TGF- $\beta$* , um inibidor da expressão do ARNm do *HGF (Hepatocyte Growth Factor)* e do seu recetor (*c-met*), e simultaneamente à não produção de *TGF- $\alpha$* , um fator de crescimento autocrino [31]. Ainda o mesmo grupo de investigadores mostrou que coelhos adultos tratados com cardiotropina-1 (citocina com propriedades hepatoprotetoras) apresentam menor dano hepático e maior taxa de sobrevivência à infeção por VDHC. Este resultado deve-se em parte à diminuição da resposta inflamatória, que se reflete, entre outros fatores, pela redução da expressão de *TNF- $\alpha$* , *IL-6* e *IL-1* [38]. Todos estes dados suportam a convicção de que a resposta inflamatória exacerbada, induzida pela infeção por VDHC, constitui um fator importante no desenvolvimento da hepatite fulminante e, consequentemente, no desfecho da doença.

### **8.3. Mecanismos de Evasão do VDHC à Resposta do Hospedeiro**

O hospedeiro responde a infeções virais ativando o seu sistema imune inato e desenvolvendo respostas imunes específicas de tipo humoral e ou celular. Estas respostas são ativadas com o objetivo de controlar a replicação viral, eliminando o vírus e as células por ele infectadas. Por seu lado, os vírus desenvolveram

mecanismos/estratégias para combater e evadir as respostas antivirais desencadeadas pelo sistema imunológico do hospedeiro. Um dos mecanismos amplamente usado pelos vírus é a supressão da resposta imunológica do hospedeiro, como por exemplo, através da inibição da resposta humoral, da interferência na expressão de *IFNs*, da inibição ou modulação de citocinas e quimiocinas, da evasão ou inibição dos linfócitos citotóxicos e células *NK*, da modulação das funções efectoras das células dendríticas, etc. [39-41]. Devido à sua potente atividade antiviral, o *IFN* tipo I (*IFN-α* e *IFN-β*) é tido como um acontecimento crítico no estabelecimento da resposta imune inata que limita a propagação da infecção e a mobilização subsequente da resposta imune adaptativa. Por conseguinte, a maioria dos vírus desenvolveu mecanismos para o suprimir. No caso da infecção pelo vírus Ébola, a proteína viral VP35 inibe a produção de *IFN-β* ao suprimir a fosforilação e dimerização do *IFN regulatory factor 3 (IRF-3)* e o aumento da SUMOilação do *IRF-7*, e bloqueia a produção de *IFN-α* ao inibir a *double-stranded RNA-dependent protein kinase* [42, 43]. Adicionalmente, na mesma infecção, a VP24 inibe a sinalização do *IFN* tipo I e tipo II (*IFN-γ*) ao suprimir o fator de transcrição nuclear, *signal transducer and activator of transcription 1 (STAT 1)* [44]. Outros vírus, incluindo os arenavírus (ex.: vírus Lassa) bloqueiam a atividade do *IFN* tipo I ao interferirem com a função da *RIG-I-like helicase-mitochondrial antiviral signaling protein (RLH-MAVS)* [45, 46]. Os poxvírus (ex. mixoma vírus), por outro lado, codificam versões solúveis dos recetores de *IFN-α* e *IFN-β (IFN-α/βR)* e *IFN-γ (IFN-γR)*, bloqueando, deste modo, as funções efectoras dos *IFNs* [47, 48]. No caso da infecção por VDHC nós verificamos que os coelhos jovens, resistentes à infecção, desenvolvem uma resposta antiviral vigorosa caracterizada pelo aumento precoce de *IFN-α* e de *IFN-γ* (capítulo 4), enquanto os coelhos adultos suscetíveis apresentam níveis de *IFN-α* significativamente inferiores aos dos jovens (aproximadamente metade), e níveis de *IFN-γ* não detetáveis (dados não publicados), o que nos leva a crer que também na infecção dos coelhos adultos por VDHC a resposta antiviral mediada pelos *IFNs* é inibida. Apesar de ainda não se conhecer o mecanismo que medeia este fenómeno, sabe-se que após infecção destes animais com VDHC, mais precisamente no fígado, o *STAT 3* não é expresso e o *STAT 1* aumenta transitoriamente mas sem significância [31]. Estes fatores de transcrição nuclear

são importantes na sinalização do *IFN* tipo I e tipo II, tendo a sua inibição consequências diretas na expressão destas citocinas [49, 50]. Adicionalmente sabe-se que após a infeção dos coelhos adultos ocorre, concomitantemente, um aumento da expressão do inibidor endógeno de sinalização *STAT*, *SOCS 3*, às 24 horas após infeção, o qual se mantém elevado entre as 36 e 48 horas [31]. Apesar de outros mecanismos poderem estar envolvidos, o facto de o *SOCS3* estar aumentado nos coelhos adultos infetados leva a que se considere a sua contribuição na inibição da expressão *STAT1/3*. Estes dados são sugestivos de que tal como outros vírus o VDHC é capaz de evadir/suprimir a resposta imune inata antiviral mediada pelos *IFNs*.

Outro dos mecanismos desenvolvido pelos vírus para combater a resposta imune do hospedeiro consiste na modulação das ações efetoras e indução da apoptose das populações celulares intervenientes na resposta. No caso da infeção pelo vírus Ébola, em macacos cinomolgos, a infeção precoce e sustentada das células dendríticas (células apresentadoras de antigénio) está associada ao aumento da expressão do *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL), uma proteína que funciona como um ligando capaz de induzir apoptose celular [51]. Adicionalmente, quer na infeção do vírus Ébola como do Marburgo, a infeção destas células bloqueia a sua maturação e ações efetoras, como, por exemplo, produção de *IFN* tipo I e ativação dos linfócitos T, permitindo, por um lado, a disseminação do vírus e, por outro, a inibição de uma resposta imune adaptativa rápida e robusta [13, 29, 52-54]. Na infeção do vírus Ébola (quer em macacos como em humanos) deteta-se ainda a apoptose de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e NK, a qual parece ser induzida via *Fas/FasL* [18, 55]. Acresce dizer que estes animais desenvolvem títulos virais elevados, bem como apresentam lesões graves no fígado, rins, entre outros órgãos, mostrando que a imunossupressão do hospedeiro facilita a disseminação viral e permite o agravamento da lesão. O vírus vaccinia (poxvírus), por sua vez, parece bloquear a sinalização dos *Toll-like receptors* (TLRs, atuam como sistemas de deteção dos subprodutos virais e bacterianos), o que resulta na inibição da maturação das células dendríticas e consequentemente na imunossupressão do hospedeiro [56]. Tal como o vírus Ébola [57] também o vírus do sarampo (paramixovírus), entre outros, infeta as células dendríticas e induz a expressão do *TRAIL* e *FasL* na sua superfície [40, 58]. Tais células não são capazes de apresentar o antigénio e



ativar os linfócitos T. Em contrapartida, elas interagem com os linfócitos T, B e células *NK* e induzem a sua apoptose por via *Fas/FasL* e interação *TRAIL/DR* [40]. Nestas circunstâncias, as células dendríticas infectadas acabam por induzir imunossupressão em vez de uma resposta imune antiviral eficaz. Apesar de se ter indicado o *TNF- $\alpha$*  como um possível indutor da apoptose dos linfócitos T e B evidenciada pelos coelhos adultos infectados, não se pode descartar a possibilidade dos mecanismos supracitados para outras infecções, como é o caso do vírus Ébola, também possam ocorrer na infecção por VDHC. Sublinhe-se ainda que, segundo o retratado no capítulo 3, a depleção dos linfócitos ocorre pouco tempo após a infecção e precede mesmo o estabelecimento da hepatite necrótica [9]. Tal como acontece na infecção pelo vírus Ébola, nos coelhos adultos infectados com VDHC a imunossupressão é acompanhada pelo aumento do título viral no fígado como é mostrado pelos dados de imunohistoquímica e *ELISA* (capítulo 2 e capítulo 6), e o agravamento da lesão hepática. Estes dados, mais a evidência de que a doença progride rapidamente matando os animais entre 24-72 horas após infecção mostram que muito provavelmente o diferente desfecho observado na infecção por VDHC em coelhos adultos suscetíveis e coelhos jovens resistentes está dependente da resposta imune inata do hospedeiro e desta ser capaz de limitar a replicação viral e evitar a supressão da resposta imune adaptativa. Esta hipótese parece ser corroborada pela passagem dos coelhos jovens da condição de resistentes à infecção por VDHC, ao estado de suscetíveis, após imunossupressão com acetato de metilprednisolona. Tal como os animais adultos, também os coelhos jovens imunossuprimidos e infectados mostraram apoptose dos linfócitos no baço, o mesmo grau de lesão hepática e um título viral elevado no fígado (capítulo 6). Possivelmente, a imunossupressão dos coelhos jovens foi responsável pela inibição de vários mecanismos da resposta imune inata necessários na contenção da infecção e ativação de uma resposta imune adaptativa. A imunossupressão parece, deste modo, ter um papel importante na patogenia e desfecho da DHC.

#### **8.4. Infecção do Hepatócito em Coelhos Adultos e Jovens**

Como referido no capítulo 1, o hepatócito é a célula-alvo de replicação do VDHC. No entanto, o número de hepatócitos infetados e o grau de lesão hepática varia entre coelhos adultos e coelhos jovens [4-6, 10, 35, 59-61]. Efetivamente, os coelhos jovens infetados desenvolvem uma lesão hepatocelular focal caracterizada por apenas alguns hepatócitos infetados, que exibem alterações ultraestruturais semelhantes às identificadas nos animais adultos (capítulo 4), enquanto os coelhos adultos infetados desenvolvem uma hepatite fulminante apresentando uma infecção generalizada dos hepatócitos (capítulo 2). O número escasso de hepatócitos infetados nos coelhos jovens levou a que se postulasse que tal pudesse refletir a ausência de recetores virais da maioria das células do fígado e, subsequentemente contribuir para a resistência destes animais à infecção por VDHC. No entanto, nós verificámos que após imunossupressão e infecção, os coelhos jovens ficam suscetíveis à infecção e apresentam o mesmo grau de lesão hepática, associada a uma marcação para o vírus nos hepatócitos semelhante ao observado nos coelhos adultos infetados (capítulo 6). Esta informação enfraquece a hipótese proposta de que a resistência dos coelhos jovens à DHC deriva da diferente expressão do recetor viral na membrana dos hepatócitos.

Dados obtidos posteriormente quer por imunohistoquímica, quer por *ELISA*, sugerem de igual forma que a expressão do recetor viral na membrana dos hepatócitos parece ser idêntica em ambos os grupos etários. Adicionalmente documentou-se que o recetor é de natureza lipídica, mais concretamente um macroglicolípido (capítulo 7). Acresce dizer que apesar de o VDHC ter demonstrado capacidade para se ligar a antígenos dos grupos sanguíneos ABO presentes nas mucosas digestivas e respiratórias dos coelhos, o mesmo não se deve passar no fígado, já que os hepatócitos não expressam estes antígenos [62-64].

Estes dados parecem refutar a hipótese de que a expressão diferencial do recetor viral na membrana dos hepatócitos dos coelhos adultos e jovens contribui para a resistência ou suscetibilidade do hospedeiro após infecção por VDHC.

## **8.5. Comentários Gerais à Resistência Natural dos Coelho Jovens à DHC**

Um dos aspetos mais interessantes da DHC prende-se com o facto dos coelhos jovens serem resistentes à mesma infeção que mata 90% dos coelhos adultos infetados. Conhecer os mecanismos que medeiam a resistência ou suscetibilidade à infeção tornou-se, deste modo, fundamental para a compreensão da patogenia da doença, com muito prováveis implicações na prevenção e epidemiologia da DHC. Curiosamente, não existem muitos trabalhos publicados neste âmbito, na medida em que essencialmente dois grupos de investigadores se têm dedicado a investigar estes mecanismos. São eles, um grupo da Universidade de Nantes, liderado por Jaques Le Pendu, e a nossa equipa de investigação.

Os trabalhos publicados pelo grupo de investigadores da Universidade de Nantes têm enfatizado que a resistência à infeção por VDHC se deve à diferente expressão dos antígenos dos grupos sanguíneos ABO (aos quais o VDHC se liga) presentes nas mucosas digestiva e respiratória dos coelhos jovens e adultos [62, 63]. No entanto, o nosso grupo sugere que este mecanismo pode contribuir, mas não é crucial para a resistência dos coelhos jovens à infeção, uma vez que estes animais quando inoculados pelas vias, intramuscular ou nasal/oral, desenvolvem a mesma forma de doença subclínica, associada a idêntico grau de lesão hepática [8]. Interessantemente, o grupo francês verificou, recentemente, que a baixa expressão destes antígenos a nível do epitélio, confere apenas uma proteção parcial à infeção por VDHC [63]. Tais observações sugerem que outros fatores devem estar a contribuir para a resistência ou suscetibilidade à infeção por VDHC. Assentes nos trabalhos experimentais desenvolvidos anteriormente pelo nosso grupo de investigação [6-9, 11, 65], postulámos que dois mecanismos podiam estar a contribuir para as diferentes manifestações da infeção nos coelhos jovens e adultos: a interação entre o VDHC e o sistema imunitário do hospedeiro e a expressão do recetor viral na membrana do hepatócito. O trabalho desenvolvido nesta tese focou-se nestes dois mecanismos. Os resultados mostraram que a resposta imunitária parece ter um papel importante no desfecho da DHC entre coelhos jovens e adultos, e

que muito, provavelmente, o recetor viral expresso na membrana do hepatócito não tem um papel determinante nesse fenómeno.

A importância da resposta imunológica no decurso da DHC foi reforçada quando após a imunossupressão dos coelhos jovens estes se tornaram completamente suscetíveis à infeção por VDHC, morrendo no mesmo intervalo de tempo que os animais adultos (1 a 3 dias; capítulo 6). Postulou-se subsequentemente que tendo em conta a rápida progressão da DHC (24-72 horas após infeção) a resistência dos coelhos jovens à infeção deve ser mediada em particular pela resposta imune inata. Sublinhe-se ainda que a infeção por VDHC não é a única caracterizada por apresentar um perfil de resistência relacionado com a idade do hospedeiro. Também no caso da infeção por *Babesia bovis* esse fenómeno se observa e, curiosamente, a diferença também parece residir na resposta imune inata [66, 67]. Bezerros infetados desenvolvem uma resposta imune inata robusta contra *Babesia bovis* que permite que o animal desenvolva uma resposta adquirida que se sabe ser protetora por aproximadamente 6 meses [68]. Parte desta resposta parece estar associada à presença de um mediador solúvel celular no soro dos bezerros [69], embora mais recentemente se tenha sugerido que a abundância das células T  $\gamma\delta$  (podem corresponder a 70% das células T circulantes) possa também contribuir para a resistência dos bezerros à infeção por *Babesia bovis* [66, 70]. Refletindo sobre estes mecanismos, será, por conseguinte, apropriado pensar que o mesmo fenómeno possa estar a ocorrer na infeção por VDHC, isto é, os coelhos jovens podem ter em circulação um fator celular solúvel que auxilia a resposta imune inata contra a infeção, fazendo com que estes desenvolvam uma resposta inicial robusta e uma resposta adaptativa eficaz, caracterizada, nomeadamente, pela produção de anticorpos específicos contra o VDHC. Contrariamente, a ausência deste fator nos coelhos adultos pode contribuir para a fácil disseminação do vírus e consequente supressão da resposta imune e agravamento das lesões, culminando com a morte do hospedeiro. Assim, será interessante saber num futuro próximo se esse fator existe, sendo que em caso de resposta afirmativa interessará identifica-lo, bem como conhecer a forma com que interage com a resposta imune inata dos coelhos jovens.

## 8.6. Conclusões e Perspetivas Futuras

O trabalho apresentado nesta tese teve como objetivo contribuir para um melhor entendimento e caracterização dos mecanismos de resistência ou suscetibilidade do hospedeiro à infeção por VDHC e, por conseguinte, melhorar o conhecimento sobre a patogenia da DHC.

Para tal, no decurso do trabalho desenvolveu-se um novo método de isolamento do VDHC que foi útil para os vários ensaios realizados *in vivo*. Pela primeira vez foi realizada uma caracterização das populações celulares intervenientes na infeção por VDHC, no fígado (órgão primário da replicação viral) e no baço, em coelhos jovens e coelhos adultos. Adicionalmente publicámos internacionalmente resultados originais sobre a resposta inflamatória, caracterizada pela cinética de várias citocinas pro e anti-inflamatórias, nos coelhos jovens e adultos infetados com VDHC, bem como corroborámos no último grupo etário resultados de outros autores (dados não publicados). Avaliou-se ainda o efeito da imunossupressão em coelhos jovens infetados com VDHC. Finalmente procedeu-se à caracterização bioquímica do recetor viral presente na membrana dos hepatócitos e à avaliação da sua expressão em ambos os grupos etários de coelhos.

Neste documento foi mostrado que a infeção por VDHC para além de induzir uma hepatite fulminante nos coelhos adultos é responsável pela depleção dos linfócitos T e B, contribuindo assim para a supressão da resposta imune do hospedeiro. Esta depleção está associada a apoptose celular e precede o estabelecimento das lesões hepáticas. Experiências futuras serão necessárias para determinar o mecanismo utilizado pelo vírus para induzir a depleção dos linfócitos.

Nesta tese mostrou-se também que a resistência dos coelhos jovens à infeção por VDHC está associada a uma resposta inflamatória rápida e robusta no fígado, com alguns hepatócitos infetados, e também com um aumento sustentado local e sistémico dos linfócitos T e B. Contudo, novos estudos serão precisos para avaliar a importância da ação efetora das populações aumentadas durante a infeção, isto é, linfócitos B, T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, como por exemplo, avaliando as citocinas produzidas por estas populações.

Mostrou-se ainda que a infeção dos coelhos adultos com VDHC induz uma resposta inflamatória exacerbada, caracterizada pelo aumento substancial do nível de citocinas, especialmente, *TNF- $\alpha$* , pouco tempo antes da morte dos animais. Adicionalmente, o facto dos resultados de imunocitoquímica terem mostrado que a hepatite causada pelo vírus estava associada à apoptose massiva dos hepatócitos, muito dos quais apoptóticos mas não infetados com o VDHC, levou a inferir que a falência hepática pode resultar não só da ação citopática direta do vírus, mas também da inflamação exacerbada causada pela infeção, nomeadamente, pela ação do *TNF- $\alpha$* . Experiências adicionais serão necessárias para avaliar se há um aumento do recetor do *TNF- $\alpha$*  na superfície dos hepatócitos e se existem outros mediadores que possam induzir a sua expressão.

Nesta tese também se documentou que as citocinas que suprimem a inflamação e que podem ser produzidas pelas células Treg, tais como *IL-10* e *TGF- $\beta$* , também aumentam após infeção por VDHC. No entanto, os níveis destas citocinas anti-inflamatórias parecem não ser capazes de inibir a inflamação, já que os coelhos adultos desenvolvem uma hepatite fulminante e morrem entre 24-72 horas após infeção. O facto das células Treg regularem a inflamação e estarem diminuídas após a infeção por VDHC, levou a postular que esta alteração vai favorecer a suscetibilidade do hospedeiro à infeção.

Foi também evidenciado que a imunossupressão dos coelhos jovens altera a sua condição de resistente para suscetível à infeção por VDHC. Foi proposto que a resistência dos coelhos jovens à infeção por VDHC é mediada pela sua imunidade inata que difere da dos coelhos adultos. Tendo em conta estes dados revela-se pertinente caracterizar as populações da resposta imune inata (macrófagos, células dendríticas, células *NK*), quer *in vivo* como *in vitro*, determinar se o vírus as infeta e avaliar as suas ações efectoras (ex.: citocinas produzidas, atividade citotóxica, capacidade de induzir proliferação celular, entre outros). Será também fundamental investigar sobre qual o fator/ molécula que determina que uma resposta imune inata eficaz aconteça nos coelhos jovens, tornando-os resistentes à DHC, ao contrário do observado nos animais adultos.

Neste trabalho foi ainda mostrado que o recetor viral na membrana dos hepatócitos é um macroglicolípido e parece ser expresso da mesma forma nos coelhos jovens e coelhos adultos.





## 8.7. Referências Bibliográficas

- 1 Mitro, S. and Krauss, H. (1993) Rabbit hemorrhagic disease: a review with special reference to its epizootiology. *Eur J Epidemiol* 9 (1), 70-78
- 2 Alda, F., Gaitero, T., Suarez, M., Merchan, T., Rocha, G., and Doadrio, I. (2010) Evolutionary history and molecular epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus in the Iberian Peninsula and Western Europe. *BMC Evol Biol* 10, 347
- 3 Liu, S.J., Xue, H.P., Pu, B.Q., and Qian, N.H. (1984) A new viral disease in rabbit. *Anim Husb Vet Med* 16, 253-255
- 4 Mikami, D., Park, J.H., Kimura, T., Ochiai, K., and Itakura, C. (1999) Hepatic lesions in young rabbits experimentally infected with rabbit haemorrhagic disease virus. *Res Vet Sci* 66 (3), 237-242
- 5 Shien, J.H., Shieh, H.K., and Lee, L.H. (2000) Experimental infections of rabbits with rabbit haemorrhagic disease virus monitored by polymerase chain reaction. *Res Vet Sci* 68 (3), 255-259
- 6 Ferreira, P.G., Costa-e-Silva, A., Oliveira, M.J., Monteiro, E., and Águas, A.P. (2005) Leukocyte-hepatocyte interaction in calicivirus infection: differences between rabbits that are resistant or susceptible to rabbit haemorrhagic disease (RHD). *Vet Immunol Immunopathol* 103 (3-4), 217-221
- 7 Ferreira, P.G., Costa-e-Silva, A., Monteiro, E., Oliveira, M.J., and Águas, A.P. (2004) Transient decrease in blood heterophils and sustained liver damage caused by calicivirus infection of young rabbits that are naturally resistant to rabbit haemorrhagic disease. *Res Vet Sci* 76 (1), 83-94
- 8 Ferreira, P.G., Costa-e-Silva, A., and Águas, A.P. (2006) Liver disease in young rabbits infected by calicivirus through nasal and oral routes. *Res Vet Sci* 81 (3), 362-365
- 9 Ferreira, P.G., Costa-e-Silva, A., Oliveira, M.J., Monteiro, E., Cunha, E.M., and Águas, A.P. (2006) Severe leukopenia and liver biochemistry changes in adult rabbits after calicivirus infection. *Res Vet Sci* 80 (2), 218-225
- 10 Prieto, J.M., Fernandez, F., Alvarez, V., Espi, A., García Marín, J.F., Alvarez, M., Martín, J.M., and Parra, F. (2000) Immunohistochemical localisation of rabbit haemorrhagic disease virus VP-60 antigen in early infection of young and adult rabbits. *Res Vet Sci* 68 (2), 181-187

- 11 Ferreira, P.G., Dini, M., Costa-e-Silva, A., and Águas, A.P. (2008) Adult rabbits acquire resistance to lethal calicivirus infection by adoptive transfer of sera from infected young rabbits. *Vet Immunol Immunopathol* 121 (3-4), 364-369
- 12 Ramiro-Ibáñez, F., Martín-Alonso, J.M., García Palencia, P., Parra, F., and Alonso, C. (1999) Macrophage tropism of rabbit hemorrhagic disease virus is associated with vascular pathology. *Virus Res* 60 (1), 21-28
- 13 Zampieri, C.A., Sullivan, N.J., and Nabel, G.J. (2007) Immunopathology of highly virulent pathogens: insights from Ebola virus. *Nat Immunol* 8 (11), 1159-1164
- 14 Bradfute, S.B., Swanson, P.E., Smith, M.A., Watanabe, E., McDunn, J.E., Hotchkiss, R.S., and Bavari, S. (2010) Mechanisms and consequences of ebolavirus-induced lymphocyte apoptosis. *J Immunol* 184 (1), 327-335
- 15 Geisbert, T.W., Hensley, L.E., Gibb, T.R., Steele, K.E., Jaax, N.K., and Jahrling, P.B. (2000) Apoptosis induced in vitro and in vivo during infection by Ebola and Marburg viruses. *Lab Invest* 80 (2), 171-186
- 16 Baize, S., Leroy, E.M., Mavoungou, E., and Fisher-Hoch, S.P. (2000) Apoptosis in fatal Ebola infection. Does the virus toll the bell for immune system? *Apoptosis* 5 (1), 5-7
- 17 Bradfute, S.B., Braun, D.R., Shamblin, J.D., Geisbert, J.B., Paragas, J., Garrison, A., Hensley, L.E., and Geisbert, T.W. (2007) Lymphocyte death in a mouse model of Ebola virus infection. *J Infect Dis* 196 Suppl 2, S296-304
- 18 Wauquier, N., Becquart, P., Padilla, C., Baize, S., and Leroy, E.M. (2010) Human fatal zaire ebola virus infection is associated with an aberrant innate immunity and with massive lymphocyte apoptosis. *PLoS Negl Trop Dis* 4 (10), e837
- 19 Paessler, S. and Walker, D.H. (2013) Pathogenesis of the viral hemorrhagic fevers. *Annu Rev Pathol* 8, 411-440
- 20 Baize, S., Leroy, E.M., Georges-Courbot, M.C., Capron, M., Lansoud-Soukate, J., Debre, P., Fisher-Hoch, S.P., McCormick, J.B., and Georges, A.J. (1999) Defective humoral responses and extensive intravascular apoptosis are associated with fatal outcome in Ebola virus-infected patients. *Nat Med* 5 (4), 423-426

- 21 Gupta, M., Spiropoulou, C., and Rollin, P.E. (2007) Ebola virus infection of human PBMCs causes massive death of macrophages, CD4 and CD8 T cell subpopulations in vitro. *Virology* 364 (1), 45-54
- 22 Leroy, E.M., Baize, S., Volchkov, V.E., Fisher-Hoch, S.P., Georges-Courbot, M.C., Lansoud-Soukate, J., Capron, M., Debre, P., McCormick, J.B., and Georges, A.J. (2000) Human asymptomatic Ebola infection and strong inflammatory response. *Lancet* 355 (9222), 2210-2215
- 23 Qiu, X., Audet, J., Wong, G., Fernando, L., Bello, A., Pillet, S., Alimonti, J.B., and Kobinger, G.P. (2013) Sustained protection against Ebola virus infection following treatment of infected nonhuman primates with ZMAb. *Sci Rep* 3, 1-9
- 24 Leroy, E.M., Baize, S., Debre, P., Lansoud-Soukate, J., and Mavoungou, E. (2001) Early immune responses accompanying human asymptomatic Ebola infections. *Clin Exp Immunol* 124 (3), 453-460
- 25 Wilson, J.A. and Hart, M.K. (2001) Protection from Ebola virus mediated by cytotoxic T lymphocytes specific for the viral nucleoprotein. *J Virol* 75 (6), 2660-2664
- 26 Warfield, K.L. and Olinger, G.G. (2011) Protective role of cytotoxic T lymphocytes in filovirus hemorrhagic fever. *J Biomed Biotechnol* 2011, 1-3
- 27 Broere, F., Apasov, S.G., Sitkovsky, M.V., and van Eden, W. (2011) T cell subsets and T cell-mediated immunity. In *Principles of Immunopharmacology* (Nijkamp, F.P. and Parnham, M.J., eds), pp.15-27, Springer Basel AG
- 28 Swain, S.L., McKinstry, K.K., and Strutt, T.M. (2012) Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses. *Nat Rev Immunol* 12 (2), 136-148
- 29 Warfield, K.L., Perkins, J.G., Swenson, D.L., Deal, E.M., Bosio, C.M., Aman, M.J., Yokoyama, W.M., Young, H.A., and Bavari, S. (2004) Role of natural killer cells in innate protection against lethal ebola virus infection. *J Exp Med* 200 (2), 169-179
- 30 Gupta, M., Mahanty, S., Greer, P., Towner, J.S., Shieh, W.J., Zaki, S.R., Ahmed, R., and Rollin, P.E. (2004) Persistent infection with ebola virus under conditions of partial immunity. *J Virol* 78 (2), 958-967
- 31 García-Lastra, R., San-Miguel, B., Crespo, I., Jorquera, F., Alvarez, M., González-Gallego, J., and Tuñón, M.J. (2010) Signaling pathways involved in liver injury and regeneration in rabbit hemorrhagic disease, an animal model of virally-induced fulminant hepatic failure. *Vet Res* 41 (1), 2

- 32 Stroher, U., West, E., Bugany, H., Klenk, H.D., Schnittler, H.J., and Feldmann, H. (2001) Infection and activation of monocytes by Marburg and Ebola viruses. *J Virol* 75 (22), 11025-11033
- 33 Bray, M. and Geisbert, T.W. (2005) Ebola virus: the role of macrophages and dendritic cells in the pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever. *Int J Biochem Cell Biol* 37 (8), 1560-1566
- 34 Mahanty, S. and Bray, M. (2004) Pathogenesis of filoviral haemorrhagic fevers. *Lancet Infect Dis* 4 (8), 487-498
- 35 Kimura, T., Mitsui, I., Okada, Y., Furuya, T., Ochiai, K., Umemura, T., and Itakura, C. (2001) Distribution of rabbit haemorrhagic disease virus RNA in experimentally infected rabbits. *J Comp Pathol* 124 (2-3), 134-141
- 36 Baize, S., Leroy, E.M., Georges, A.J., Georges-Courbot, M.C., Capron, M., Bedjabaga, I., Lansoud-Soukate, J., and Mavoungou, E. (2002) Inflammatory responses in Ebola virus-infected patients. *Clin Exp Immunol* 128 (1), 163-168
- 37 Sánchez-Campos, S., Alvarez, M., Culebras, J.M., González-Gallego, J., and Tuñón, M.J. (2004) Pathogenic molecular mechanisms in an animal model of fulminant hepatic failure: Rabbit hemorrhagic viral disease. *J Lab Clin Med* 144 (4), 215-222
- 38 Tuñón, M.J., San Miguel, B., Crespo, I., Riezu-Boj, J.I., Larrea, E., Alvarez, M., Gonzalez, I., Bustos, M., González-Gallego, J., and Prieto, J. (2011) Cardiotrophin-1 promotes a high survival rate in rabbits with lethal fulminant hepatitis of viral origin. *J Virol* 85 (24), 13124-13132
- 39 Alcamí, A. and Koszinowski, U.H. (2000) Viral mechanisms of immune evasion. *Trends Microbiol* 8 (9), 410-418
- 40 Iannello, A., Debbeche, O., Martin, E., Attalah, L.H., Samarani, S., and Ahmad, A. (2006) Viral strategies for evading antiviral cellular immune responses of the host. *J Leukoc Biol* 79 (1), 16-35
- 41 Tortorella, D., Gewurz, B.E., Furman, M.H., Schust, D.J., and Ploegh, H.L. (2000) Viral subversion of the immune system. *Annu Rev Immunol* 18, 861-926
- 42 Hartman, A.L., Bird, B.H., Towner, J.S., Antoniadou, Z.A., Zaki, S.R., and Nichol, S.T. (2008) Inhibition of IRF-3 activation by VP35 is critical for the high level of virulence of ebola virus. *J Virol* 82 (6), 2699-2704

- 43 Leung, L.W., Park, M.S., Martinez, O., Valmas, C., Lopez, C.B., and Basler, C.F. (2011) Ebola virus VP35 suppresses IFN production from conventional but not plasmacytoid dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 89 (7), 792-802
- 44 Zhang, A.P., Abelson, D.M., Bornholdt, Z.A., Liu, T., Woods, V.L., Jr., and Saphire, E.O. (2012) The ebolavirus VP24 interferon antagonist: know your enemy. *Virulence* 3 (5), 440-445
- 45 Bowie, A.G. and Unterholzner, L. (2008) Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 8 (12), 911-922
- 46 Versteeg, G.A. and Garcia-Sastre, A. (2010) Viral tricks to grid-lock the type I interferon system. *Curr Opin Microbiol* 13 (4), 508-516
- 47 Smith, G.L., Symons, J.A., and Alcami, A. (1998) Poxviruses: Interfering with Interferon. *Semin Virol* 8 (5), 409-418
- 48 Mossman, K., Nation, P., Macen, J., Garbutt, M., Lucas, A., and McFadden, G. (1996) Myxoma virus M-T7, a secreted homolog of the interferon-gamma receptor, is a critical virulence factor for the development of myxomatosis in European rabbits. *Virology* 215 (1), 17-30
- 49 Meraz, M.A., White, J.M., Sheehan, K.C., Bach, E.A., Rodig, S.J., Dighe, A.S., Kaplan, D.H., Riley, J.K., Greenlund, A.C., Campbell, D., Carver-Moore, K., DuBois, R.N., Clark, R., Aguet, M., and Schreiber, R.D. (1996) Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* 84 (3), 431-442
- 50 Zhu, H., Shang, X., Terada, N., and Liu, C. (2004) STAT3 induces anti-hepatitis C viral activity in liver cells. *Biochem Biophys Res Commun* 324 (2), 518-528
- 51 Geisbert, T.W., Hensley, L.E., Larsen, T., Young, H.A., Reed, D.S., Geisbert, J.B., Scott, D.P., Kagan, E., Jahrling, P.B., and Davis, K.J. (2003) Pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever in cynomolgus macaques: evidence that dendritic cells are early and sustained targets of infection. *Am J Pathol* 163 (6), 2347-2370
- 52 Bosio, C.M., Aman, M.J., Grogan, C., Hogan, R., Ruthel, G., Negley, D., Mohamadzadeh, M., Bavari, S., and Schmaljohn, A. (2003) Ebola and Marburg viruses replicate in monocyte-derived dendritic cells without inducing the production of cytokines and full maturation. *J Infect Dis* 188 (11), 1630-1638
- 53 Mohamadzadeh, M., Chen, L., and Schmaljohn, A.L. (2007) How Ebola and Marburg viruses battle the immune system. *Nat Rev Immunol* 7 (7), 556-567

- 54 Mahanty, S., Hutchinson, K., Agarwal, S., McRae, M., Rollin, P.E., and Pulendran, B. (2003) Cutting edge: impairment of dendritic cells and adaptive immunity by Ebola and Lassa viruses. *J Immunol* 170 (6), 2797-2801
- 55 Reed, D.S., Hensley, L.E., Geisbert, J.B., Jahrling, P.B., and Geisbert, T.W. (2004) Depletion of peripheral blood T lymphocytes and NK cells during the course of Ebola hemorrhagic fever in cynomolgus macaques. *Viral Immunol* 17 (3), 390-400
- 56 Bowie, A., Kiss-Toth, E., Symons, J.A., Smith, G.L., Dower, S.K., and O'Neill, L.A. (2000) A46R and A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (18), 10162-10167
- 57 Olejnik, J., Ryabchikova, E., Corley, R.B., and Muhlberger, E. (2011) Intracellular Events and Cell Fate in Filovirus Infection. *Viruses-Basel* 3 (8), 1501-1531
- 58 Vidalain, P.O., Azocar, O., Lamouille, B., Astier, A., Rabourdin-Combe, C., and Servet-Delprat, C. (2000) Measles virus induces functional TRAIL production by human dendritic cells. *J Virol* 74 (1), 556-559
- 59 Alexandrov, M., Peshev, R., Yanchev, I., Bozhkov, S., Doumanova, L., Dimitrov, T., and Zacharieva, S. (1992) Immunohistochemical localization of the rabbit haemorrhagic disease viral antigen. *Arch Virol* 127 (1-4), 355-363
- 60 Park, J.H., Ochiai, K., and Itakura, C. (1992) Detection of rabbit haemorrhagic disease virus particles in the rabbit liver tissues. *J Comp Pathol* 107 (3), 329-340
- 61 Collins, B.J., White, J.R., Lenghaus, C., Morrissy, C.J., and Westbury, H.A. (1996) Presence of rabbit haemorrhagic disease virus antigen in rabbit tissues as revealed by a monoclonal antibody dependent capture ELISA. *J Virol Methods* 58 (1-2), 145-154
- 62 Ruvoën-Clouet, N., Ganière, J.P., André-Fontaine, G., Blanchard, D., and Le Pendu, J. (2000) Binding of rabbit hemorrhagic disease virus to antigens of the ABH histo-blood group family. *J Virol* 74 (24), 11950-11954
- 63 Nyström, K., Le Gall-Reculé, G., Grassi, P., Abrantes, J., Ruvoën-Clouet, N., Le Moullac-Vaidye, B., Lopes, A.M., Esteves, P.J., Strive, T., Marchandeu, S., Dell, A., Haslam, S.M., and Le Pendu, J. (2011) Histo-blood group antigens act as attachment factors of rabbit hemorrhagic disease virus infection in a virus strain-dependent manner. *PLoS Pathog* 7 (8), e1002188

- 64 Abrantes, J., van der Loo, W., Le Pendu, J., and Esteves, P.J. (2012) Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review. *Vet Res* 43 (1), 12
- 65 Ferreira, P.G., Costa-e-Silva, A., Monteiro, E., Oliveira, M.J., and Águas, A.P. (2006) Liver enzymes and ultrastructure in rabbit haemorrhagic disease (RHD). *Vet Res Commun* 30 (4), 393-401
- 66 Brown, W.C., Norimine, J., Knowles, D.P., and Goff, W.L. (2006) Immune control of *Babesia bovis* infection. *Vet Parasitol* 138 (1-2), 75-87
- 67 Trueman, K.F. and Blight, G.W. (1978) The effect of age on resistance of cattle to *Babesia bovis*. *Aust Vet J* 54 (6), 301-305
- 68 Goff, W.L., Johnson, W.C., Parish, S.M., Barrington, G.M., Tuo, W., and Valdez, R.A. (2001) The age-related immunity in cattle to *Babesia bovis* infection involves the rapid induction of interleukin-12, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase mRNA expression in the spleen. *Parasite immunol* 23 (9), 463-471
- 69 Levy, M.G., Clabaugh, G., and Ristic, M. (1982) Age resistance in bovine babesiosis: role of blood factors in resistance to *Babesia bovis*. *Infect Immun* 37 (3), 1127-1131
- 70 Hein, W.R. and Mackay, C.R. (1991) Prominence of gamma delta T cells in the ruminant immune system. *Immunol Today* 12 (1), 30-34