UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

RESPOSTA CELULAR NO ENCÉFALO DE COELHOS EXPERIMENTALMENTE INOCULADOS COM HERPESVIRUS BOVINO 5 (BoHV-5)

Francisco Javier Pedraza-Ordóñez
Médico Veterinário

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL
2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

RESPOSTA CELULAR NO ENCÉFALO DE COELHOS EXPERIMENTALMENTE INOCULADOS COM HERPESVIRUS BOVINO 5 (BoHV-5)

Francisco Javier Pedraza-Ordóñez

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Alessi
Co-orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Noeme Sousa Rocha

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Patologia Animal).

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL
Janeiro de 2012

Pedraza Ordóñez, Francisco Javier
P371r Resposta celular no encéfalo de coelhos experimentalmente inoculados com herpesvírus bovino 5 (BoHV-5). / Francisco Javier Pedraza Ordóñez. – – Jaboticabal, 2012
xiv, 59 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012
Orientador: Antonio Carlos Alessi
Co-orientadora: Noeme Sousa Rocha
Banca examinadora: Gisele Fabrino Machado, Mary Suzan Varaschin, Rosemery de Oliveira Vasconcelos, Luiz Carlos Marques.
Bibliografia

1. Doença nervosa. 2. Quantificação viral. 3. Bovinos. 4. Marcadores moleculares. 5. Infecção por herpesvirus. 6. Modelo animal. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.83:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: RESPOSTA CELULAR NO ENCÉFALO DE COELHOS EXPERIMENTALMENTE INOCULADOS COM HERPESVÍRUS BOVINO 5 (BoHV-5)

AUTOR: FRANCISCO JAVIER PEDRAZA ORDOÑEZ

ORIENTADOR: Prof. Dr. ANTONIO CARLOS ALESSI

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. NOEME SOUSA ROCHA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MEDICINA VETERINÁRIA , Área: PATOLOGIA ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ANTONIO CARLOS ALESSI
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. GISELE FABRINO MACHADO
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Profa. Dra. MARY SUZAN VARASCHIN
Departamento de Medicina Veterinária / Universidade Federal de Lavras

Profa. Dra. ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS
Departamento de Patologia Veterinaria / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. LUIZ CARLOS MARQUES
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 30 de janeiro de 2012.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

FRANCISCO JAVIER PEDRAZA-ORDOÑEZ – nasceu em São Sebastião, Colômbia, em agosto de 1967. Formado no colégio Champagnat de Popayán (primeira a quarta series), Colégio São Francisco de Popayán (quinta a oitava series), Colégio São Francisco de Tuluá (ensino médio). Graduou-se em Medicina Veterinária na Universidade de Antioquia em Medellín-Colômbia (1993), Especialista em Patologia Animal pela mesma Instituição (1996) e Mestrado em Medicina Veterinária (Patologia Animal) da Universidade Estadual Paulista (FCAV-UNESP), câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil (2003). Professor substituto na Universidade de La Paz em Barrancabermeja, Colômbia (1996), Professor efetivo na área de Patologia na Universidade (privada) Antonio Nariño, em Popayán (1997-1999). Prestou concurso de méritos para ingressar como Professor efetivo na Universidade de Caldas em 1999, atuando na área da Patologia Veterinária. Membro fundador do Grupo de pesquisa CIENVET (Ciências Veterinárias), categorizado A1 por Colciencias (Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia, Ministério da Educação da Colômbia), membro fundador e atual Diretor do Grupo de Pesquisa em Patologia Veterinária (2004), classificado na categoria B de Colciencias. Promoveu a criação do Programa de Mestrado em Ciências Veterinárias, na Universidade de Caldas (2005) que atualmente possui 8 profissionais formados e 18 estudantes em formação. Desde 2009 é doutorando no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da FCAV-UNESP, sob orientação do Prof. Dr. Antonio Carlos Alessi.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização desta Tese e de forma particular agradeço:

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Alessi, da FCAV-UNESP, câmpus de Jaboticabal, pela confiança, amizade e pela honrosa oportunidade de trabalhar sob a sua orientação e exemplo, como profissional e ser humano.

À Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha, da FMVZ-UNESP, câmpus de Botucatu, pela co-orientação, amizade, conselhos, ajuda e disponibilização do Laboratório de Patologia Investigativa e Comparada, para a elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Eduardo Furtado Flores, da UFSM, Rio Grande do Sul, por gentilmente ter cedido os blocos contendo encéfalos de coelhos experimentalmente infectados com o BoHV-5 e o anticorpo monoclonal 2F9 para a realização das avaliações imuno-histoquímicas no presente estudo.

Ao Prof. Dr. João Pessoa Araujo Jr., do Instituto de Biociências da UNESP, câmpus de Botucatu, pela ajuda e disponibilização do Laboratório de Virologia, para a elaboração deste trabalho.

À Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva, da UNESP, Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, pela doação do kit e conselhos para extração do DNA viral a partir de tecidos com parafina.

Aos colegas, Ricardo Yamatogui, Breno Salgado, Fabrizio Grandi, Larissa Doddi Marcolino, da UNESP em Botucatu, pela oportuna ajuda no Laboratório.

À Universidad de Caldas em Manizales, Colombia por facilitar meu afastamento para fazer o Doutorado.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) de Brasil, pela concessão da bolsa de Doutorado.

Um agradecimento especial à minha família, minha esposa Lina Fernanda e meu filho Samuel, por me acompanhar nesta bela experiência chamada Doutorado, com paciência, carinho e dedicação, sem eles não teria logrado o triunfo.

Agradeço também a meu Pai Fúlvio Antonio, meu Irmão Dúmer Antonio, aos todos meus sobrinhos e demais familiares que apesar da distância, sempre estão na torcida por mim. Especialmente agradeço a minha Mãe, María Dora, que desde o Céu me fortalece e da energia para alcançar cada objetivo na minha vida.

Este trabalho foi possível graças ao apoio de muitas pessoas mais, que me incentivaram para continuar sempre para a frente, a todas elas, muito obrigado.

SUMÁRIO **Pag**

SUMARIO vi
LISTA DE TABELAS viii
LISTA DE FIGURAS ix
LISTA DE ABREVIATURAS xi
RESUMO xiii
SUMMARY xiv

1. INTRODUÇÃO 1

2. REVISÃO DE LITERATURA 3

2.1. Descrição do BoHV-5 3
2.1.1. Epidemiologia 3
2.1.2. Patogenia 4
2.1.3. Achados clínicos e diagnóstico diferencial 6
2.1.4. Alterações macroscópicas 7
2.1.5. Alterações microscópicas 8
2.1.6. Diagnóstico 8
2.2. Características moleculares do BoHV-5 9
2.3. Patogenia da malacia ocasionada pelo BoHV-5 10

3. JUSTIFICATIVA 12

4. OBJETIVOS 13

4.1. Geral 13
4.2. Específicos 13

5. MATERIAL E MÉTODOS 14

5.1. Amostras de encéfalo 14
5.2. Análise imuno-histoquímica 16
5.3. Real time PCR (qPCR) 18
5.3.1. Extração do DNA 18
5.3.2. Quantificação das amostras 18
5.4. Análise estatística 20

6. RESULTADOS 21

6.1. Achados histopatológicos 21
6.2. Achados imuno-histoquímicos 22
6.2.1. Imunodetecção de linfócitos T 23
6.2.2. Imunodetecção de linfócitos B 24
6.2.3. Imunodetecção de macrófagos 25
6.2.4. Imunodetecção de astrócitos 26
6.2.5. Imunodetecção do BoHV-5 28
6.3. Quantificação viral pela real time PCR (qPCR) 29

7. DISCUSSÃO 32

8. CONCLUSÕES 44

9 REFERÊNCIAS 45

9. ANEXOS 56

LISTA DE TABELAS

Pag

Tabela 1. Relação de anticorpos utilizados para detectar células inflamatórias e agente viral em cérebro de coelhos experimentalmente infectados pelo BoHV-5..... 17

Tabela 2. Aspectos morfológicos pesquisados em diferentes regiões do encéfalo de um coelho experimentalmente infectado com o BoHV-5 21

Tabela 3. Percentagem de partículas víricas detectadas no encéfalo de coelhos experimentalmente infectados com o BoHV-5..... 30

Tabela 4. Valores médios dos diâmetros maior e menor, assim como da área de astrócitos medidos no hipocampo dos coelhos D4 e C1..... 58

LISTA DE FIGURAS

Pag

Figura 1. Representação gráfica das regiões do encéfalo de coelho usadas na presente pesquisa. Na parte superior uma vista sagital do encéfalo mostrando as regiões do hipocampo (HI/CP), tálamo (TA), córtex anterior (CA), bulbo olfatório e córtex olfatório (BO/CO). Na parte inferior uma vista dorsal mostrando a região do córtex ventro lateral e dorso lateral (CVL/CDL)..... 15

Figura 2. Curva de dissociação (95 °C por 15 s, 60 °C por 30 s e 95 °C por 15 s), no eixo da X aparecem os valores relativos da quantidade de BoHV-5 achado, no eixo Y os valores de temperatura de fusão na qual foi possível a amplificação das amostras positivas (incluídos dois controles), iniciador utilizado sugerido por Gomes et al. (2002)..... 19

Figura 3. Fotomicrografia do encéfalo de coelho experimentalmente infectado com o BoHV-5. Coloração de H&E, 40X. Notar a presença de neurônios necróticos (setas). A. Imagem histológica do hipocampo (HI/CP) do coelho controle. B. Discreto manguito perivascular no Tálamo (TA) do coelho D4 22

Figura 4. Fotomicrografia do encéfalo do coelho experimentalmente infectado com o BoHV-5 mostrando um manguito perivascular com imunomarcação para Linfócitos T (anti-CD3 policlonal). Note a participação dos linfócitos T na resposta inflamatória nas áreas 1 (manguito perivascular) e 2 do fragmento tecidual (Barra = 50 µm, streptavidina HRP, objetiva 40X). A. Controle negativo, linfonodo de coelho, 40 X. B. Controle positivo, linfonodo de coelho 23

Figura 5. Fotomicrografia do encéfalo de coelho experimentalmente infectado com o BoHV-5, mostrando um manguito perivascular com imunomarcação para Linfócitos B (anti-BLA monoclonal). Pode-se notar algumas células que fazem parte da reação ao redor do vaso sanguíneo (Barra = 50 µm, streptavidina HRP, objetiva 40X). A. Controle negativo, linfonodo de coelho. B. Controle positivo, linfonodo de coelho 24

Figura 6. Fotomicrografia do hipocampo de coelho experimentalmente infetado com o BoHV-5 mostrando imunomarcação para macrófagos nas setas pretas e fragmentos do núcleo dos neurônios necróticos na seta branca (anti-MAC, monoclonal. Barra = 50 µm, streptavidina HRP, objetiva 20X). A. Controle negativo, linfonodo de coelho (40X). B. Controle positivo, linfonodo de coelho (40X) 25

Figura 7. Fotomicrografia do hipocampo de coelho mostrando imunomarcação para astrócitos, (Barra = 50 µm, streptavidina HRP, objetiva 40X). A. As setas mostram alguns astrócitos imunomarcados no hipocampo do coelho D4. B. Hipocampo do coelho D4 mostrando um padrão de marcação similar quando comparado com o hipocampo do coelho controle. C. Hipocampo do coelho controle (40X) 26

Figura 8. Mensurações dos astrócitos no HI/CP do encéfalo de coelho. As barras representam a media do valor das mensurações dos diâmetros maior e menor dos astrócitos, assim como da área obtida a partir desses dados 27

Figura 9. Fotomicrografia do hipocampo de coelho experimentalmente infetado com o BoHV-5 mostrando imunomarcação para o vírus usando o anticorpo monoclonal 2F9 (Barra = 50 µm streptavidina HRP, objetiva 40X). A. Controle positivo córtex cerebral de coelho, as setas indicam a imunomarcação positiva. B. Controle positivo, córtex cerebral de bovino experimentalmente infectado com o BoHV-5. Note os corpos de inclusão, setas brancas. C. Hipocampo do Coelho D4, a imunomarcação aconteceu no núcleo e no citoplasma dos neurônios 28

Figura 10. Observa-se picos bem definidos da qPCR mostrando os casos positivos (incluindo os controles) usando os iniciadores sugeridos por Gomes et al. (2002). Os controles foram testados como esta descrito no Anexo D 31

Figura 11. Na parte superior observa-se os casos positivos por qPCR com os iniciadores sugeridos por Gomes et al. (2002), inclui dois controles e dois casos das amostras. Na parte inferior observa-se a qPCR usando os iniciadores sugeridos por Campos et al. (2009), note-se a quantidade de picos inespecíficos que não permitem supor a positividade dos casos analisados..... 59

LISTA DE ABREVIATURAS

AOP-1	Proteína antioxidante 1
BO	Bulbo olfatório
BoHV	Herpesvírus bovino
CA	Córtex anterior
CO	Córtex olfatório
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CVL/CDL	Córtex ventro e dorso lateral
DR	Rafe dorsal
EEB	Encefalopatia espongiforme bovina
EVI-340/96	Estirpe viral (BoHV-5)
gC	Glicoproteína C
gD	Glicoproteína D
gE	Glicoproteína E
gI	Glicoproteína I
HI/CP	Hipocampo e córtex posterior
IBR	Rinotraqueite infecciosa bovina
LC	*Locus coerulus*
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MDBK	Linhagem celular (Madin Darby Bovine Kidney)
MMPs	Metaloproteinase de matriz
ON	Oxido nítrico
PEM	Polioencefalomalacia
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa (tempo real
SV-507/99	Estirpe viral (BoHV-5)

TA	Tálamo
TG	Gânglio trigêmeo
$TICD_{50}$	Doses infecciosas (50%) em cultura de tecido
TX-89	Estirpe viral (BoHV-5)
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
Us9	Proteína viral (BoHV-5)
VEV	Vírus da estomatite vesicular
α tif	Proteína viral (BoHV-5)

RESPOSTA CELULAR NO ENCÉFALO DE COELHOS EXPERIMENTALMENTE INOCULADOS COM HERPESVIRUS BOVINO 5 (BoHV-5)

RESUMO

O BoHV-5 é um alfa herpesvírus neurovirulento, que causa meningoencefalite fatal em bezerros. A morbidade é baixa contrastando com uma alta mortalidade, embora alguns animais possam-se recuperar. Varias pesquisas tem sido desenvolvidas para determinar a patogênese deste tipo de doença. No presente trabalho coelhos experimentalmente infectados com o Herpesvírus Bovino 5 (BoHV-5) foram submetidos a análise imuno-histoquímica e molecular, mediante a real time PCR, para descrever a resposta inflamatória em seis diferentes regiões do seu encéfalo. Todos os animais mostraram sinais neurológicos severos e foram eutanasiados vinte dias após a infecção inicial. Microscopicamente foi descrita uma meningoencefalite não supurativa, caracterizada por meningite, manguitos perivasculares mononucleares e malacia, mas não foram observados corpúsculos de inclusão viral. Os linfócitos T constituíram uma alta percentagem das células mononucleares envolvidas na neuroinflamação. Não foram encontradas diferenças significativas na resposta astrocitária quando comparados o grupo experimental e o grupo controle ($p > 0,05$). A quantificação viral pela qPCR permitiu achar partículas virais em todas as regiões encefálicas, de todos os animais do grupo experimental, sendo diretamente proporcional a quantidade de vírus e a visualização de lesões histológicas no encéfalo dos coelhos, assim como a imunodetecção do BoHV-5 pela imunohistoquímica. É possível suspeitar de um forte envolvimento do sistema imunitário do hospedeiro que fez a maioria dos animais reagir de maneira diferente ante a mesma quantidade do inóculo viral ministrado.

Palavras-Chave: Encefalite viral, Estudo comparativo, Infecção por herpesvirus, Marcadores moleculares, Modelo animal, Quantificação viral.

CELLULAR RESPONSE IN BRAIN OF RABBITS EXPERIMENTALLY INOCULATED WITH BOVINE HERPESVIRUS 5 (BoHV-5).

SUMMARY

The BoHV-5 is a neurovirulent alpha herpesvirus, which causes fatal meningoencephalitis in calves. The morbidity is low in contrast with a high mortality, although some animals can heal. Several surveys have been developed trying to better understand the pathogenesis of this type of disease. In this study rabbits experimentally infected with bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) were subjected to immunohistochemical and molecular analysis by real time PCR, to describe the inflammatory response in six different regions of his brain. All animals showed severe neurological signs and were euthanized twenty days after the initial infection. Microscopically was described a meningoencephalitis characterized by nonsuppurative meningitis, mononuclear perivascular cuffs and malacia, but were not observed viral inclusion corpuscles. T lymphocytes constituted a high percentage of mononuclear cells involved in neuroinflammation and there were no significant differences in astrocyte response when comparing the experimental and control groups ($p > 0.05$). The viral quantification by qPCR allowed found viral particles in all brain regions of all experimental animals, being directly proportional to the amount of virus and the visualization of lesions in the brain of rabbits, as well as immunodetection of BoHV-5 by immunohistochemistry. It is possible to suspect a strong engagement of the host immune system that made the majority of animals respond differently compared to the same administered amount of viral inoculum.

Keywords: Animal model, Comparative study, Herpesvirus infection, Molecular markers, Viral quantification, Viral encephalitis.

1. INTRODUÇÃO

O herpesvírus bovino (BoHV-1 e BoHV-5) causa doenças respiratórias, reprodutivas e nervosas em animais susceptíveis. São vírus DNA, da família Herpesviridae, subfamília Alphaherpesviridae, gênero Varicellovírus (ROIZMAN & PELLETT 2001). O BoHV-1 é um agente patogênico do gado, cuja infecção resulta numa doença respiratória conhecida como IBR (rinotraqueite infecciosa bovina) (WEIBLEN et al., 1989). A forma reprodutiva, se manifesta com vulvovaginite em fêmeas ou balanopostite em machos (WEIBLEN et al., 1989; KAHRS, 2001; ZAPATA et al., 2002). Outros transtornos associados à infecção com o BoHV-1 incluem conjuntivite, queratoconjuntivite, enterite, morte embrionária, morte fetal e aborto (TAKIUCHI et al., 2005). O BoHV-1 também causa doença no sistema nervoso central (SILVA et al., 2007).

O BoHV-5 encontra-se estreitamente relacionado com o BoHV-1, e são semelhantes em aspectos estruturais, biológicos, antigênicos e moleculares. Sua principal diferença está na capacidade de invadir e replicar no sistema nervoso central e causar doença neurológica no gado bovino (BELTRÃO et al., 2000; FREITAS et al., 2007). Os dois subtipos de herpesvírus possuem 85% de homologia de DNA, o que é traduzido numa alta porcentagem de reações cruzadas, em testes que usam anticorpos policlonais, inclusive, em alguns casos, com anticorpos monoclonais (ANDRADE & BARBOSA-STANCIOLI, 2006). Como consequência disso, é muito difícil a implantação de programas específicos de controle e erradicação para cada agente (PEDRAZA et al., 2010).

A distribuição e apresentação da doença causada pelo BoHV-1 têm caráter mundial (KAHRS, 2001), já a causada pelo BoHV-5 é mais restrita. A baixa ocorrência da síndrome neurológica associada ao BoHV-5 em diferentes países é muito discutida, poderia dever-se ao desconhecimento do verdadeiro número de animais acometidos pela doença ou também pela proteção cruzada que poderia conferir a vacinação realizada em zonas endêmicas contra o BoHV-1 ou pela alta homologia antigênica existente entre ambos agentes virais (CASCIO et al., 1999; BELTRÃO et al., 2000).

A meningoencefalite herpética dos bovinos pode ser confundida clinicamente com doenças como a raiva, pseudo-raiva, polioencefalomalacia por deficiência de tiamina, intoxicação por chumbo e intoxicação por sal (LEMOS et al., 2002; SANCHES et al., 2000; SPILKI et al., 2003). Praticamente todas elas tem sido relatadas na America do Sul. Alguns casos de raiva por exemplo, têm sido diagnosticados claramente pelo uso de anticorpos monoclonais contra o vírus ou por testes biológicos. Entretanto, aqueles casos negativos, às vezes não são conclusivos de nenhuma entidade, permanecendo sem diagnóstico (LEMOS, 2005).

A neuroinflamação está envolvida em múltiples mecanismos patológicos da encefalite herpética bovina. Alguns estudos em humanos sugerem que a inflamação e ativação das células gliais precedem o dano neuronal e que o estresse oxidativo acontece antes da citopatología característica da meningoencefalite causada por herpesvirus (CONTI et al., 2000). Algumas moléculas tipo radicais livres e proteínas antioxidantes estão elevadas na infecção com o BoHV-5 no encéfalo de bovinos naturalmente afetados por este vírus (CARDOSO et al., 2010). Evidencia experimental sugere que as condiciones pro-inflamatórias promovem o desenvolvimento de malacia (DEZENGRINI et al., 2009).

Por outro lado, o BoHV-1 tem sido associado frequentemente a esse tipo de patogênese em bovinos. FLORES et al. (2009) a partir de múltiplos experimentos usando coelhos, concluíram que a inoculação do BoHV-1 para desenvolver doença neurológica nem sempre tem resultados bons que permitam descrever de maneira adequada o que acontece no encéfalo desses animais. Além disso, os estudos de reativação viral usando dexametasona como imunodepressor nos coelhos que sobrevivem à infecção, deve ser feita com animais diferentes em experimentos separados devido a que as doses infectantes devem ser menores, para evitar a morte por doença aguda, e os animais devem ser preferencialmente adultos, que são mais resistentes.

Mesmo que existam pesquisas orientadas à procura de dados nesse sentido, ainda faltam muitas informações especificamente sobre a neuroinflamação causada pelo BoHV-5.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Descrição do BoHV-5

O BoHV-5 é um alfa herpesvírus neurovirulento, que causa meningoencefalite fatal em bezerros e também é conhecido como herpesvírus da Encefalite Bovina (CHOWDHURY et al., 1997; CHOWDHURY et al., 2000; COLODEL et al., 2002; FIELDS et al., 1996). Inicialmente, o BoHV-5 foi classificado como um subtipo neurovirulento do BoHV-1 (BHV-1.3), no entanto, com base em suas características moleculares, finalmente foi descrito como um vírus distinto (CHOWDHURY et al., 1997; COLODEL et al., 2002; MEYER et al., 1996; MEYER et al., 1999). Os alfa herpesvírus têm um ciclo reprodutivo relativamente curto, em cultivo celular rapidamente destroem as células infectadas e tem capacidade para estabelecer de forma primária, infecções latentes, mais exclusivamente nos gânglios sensoriais.

2.1.1. Epidemiologia

Para entender a epidemiologia do herpesvírus responsável pela meningoencefalite dos bovinos (BoHV-5) é preciso considerar que na maioria das vezes ele está acompanhado do herpesvírus que atinge o sistema respiratório desses animais (BoHV-1). Isto porque eles estão compartilhando aspectos estruturais, biológicos, antigênicos e moleculares de maneira muito estreita (BELTRÃO et al., 2000; FLORES et al., 2009). Desta forma, o estabelecimento das porcentagens de animais verdadeiramente infectados com o BoHV-5 é muito difícil, pelas reações cruzadas nos testes sorológicos (ROEHE et al., 1997). Num estudo feito na Colômbia, usando as cepas Cooper do BoHV-1 e SV507 do BoHV-5, foi possível separar sorologicamente animais positivos para cada um destes agentes etiológicos. Entretanto, os autores concluíram que o teste de soroneutralização para BoHV-1 (sempre que interpretado por profissionais habilitados) e muito útil e permite supor a infecção com o BoHV-5 devido à co-existência destes agentes nos rebanhos bovinos (PEDRAZA et al., 2011a) .

O BoHV-5 é transmitido por contato direto com aerossóis contaminados ou com fômites e também pelo sêmen (GOMES et al., 2003). Pode infectar animais jovens e adultos, sendo os bezerros e animais até 24 meses os mais susceptíveis (COLODEL et al., 2002). RISSI et al. (2006) observaram que os surtos podem ocorrer em grupos de animais (com idades entre um e dez e oito meses), embora também existam casos esporádicos.

Os dados sobre morbidade indicam que só um pequeno grupo de animais num rebanho pode ser atingido, no máximo 5% (SALVADOR et al., 1998; RISSI et al., 2006). No entanto, COLODEL et al. (2002) afirmam que a morbidade pode ser baixa, mas que a mortalidade pode atingir até 22%. Dados mais extremos indicam que os animais podem morrer em um percentual de quase 100% depois de adoecerem (SALVADOR et al., 1998). Em outros estudos, as observações clínicas indicaram que alguns animais podem se recuperar e dessa forma, a mortalidade pode diminuir de 100% até 75% aproximadamente (ELIAS et al., 2004).

Aparentemente, a meningoencefalite pelo herpesvírus pode acontecer em qualquer época do ano, sem predileção pela raça ou sexo do animal afetado. Devido à sua capacidade para estabelecer latência, afeta com maior frequência os animais mantidos em pastagens pelas diferenças de manejo (com maior probabilidade de estresse pelo desmame, castração, vacinação, mudança de pastagens e transporte para comercialização, entre outros), quando comparado com os animais submetidos a confinamento (SALVADOR et al., 1998; COLODEL et al., 2002; ELIAS et al., 2004; RISSI et al., 2006). Um aspecto importante na epidemiologia é a dificuldade de impedir a migração de animais doentes (provavelmente assintomáticos) que nas práticas comerciais são transladados e introduzidos em rebanhos aparentemente livres (COLODEL et al., 2002; SALVADOR et al., 1998).

2.1.2. Patogenia

Tanto o BoHV-1 como o BoHV-5, são vírus neurotrópicos e estabelecem latência no gânglio trigêmeo (TG), logo depois da inoculação intranasal e conjuntival.

Geneticamente tem 85% de homologia em seu DNA, mas diferem em sua capacidade de causar doença neurológica em bezerros. Após sua inoculação intranasal em coelhos, o BoHV-5 invade o encéfalo, via nervo olfativo, resultando em sinais neurológicos agudos comparáveis aos que se têm encontrado nos bezerros. As partículas virais e os danos neurais foram observados no encéfalo de coelhos afetados dentro das áreas ligadas através da via do nervo olfativo como são, bulbo olfativo, núcleo olfativo anterior, córtex piriforme/entorrinal, córtex frontal/cíngulado, giro hipocampo/dentado, amígdala, rafe dorsal (DR) e *locus coeruleus* (LC). Estes coelhos tiveram poucos neurônios afetados no TG e nenhuma invasão viral desde a ponte até o núcleo trigêmeo espinal que são os neurônios de segunda ordem na via do nervo trigêmeo (CHOWDHURY et al., 2000). No encéfalo de coelhos infectados experimentalmente com BoHV-5 (cepa TX-89) o vírus foi isolado do bulbo olfativo, córtex anterior (córtex frontal, trato olfativo e a porção anterior do córtex olfativo), córtex posterior (córtex temporal, parietal, piriforme, entorrinal e occipital), amígdala e hipocampo. Menos frequentemente o BoHV-5 foi isolado do mesencéfalo e diencéfalo, ponte e medula; e do cerebelo e gânglio trigêmeo. Nos coelhos experimentalmente inoculados com BoHV-1 (cepa cobre), o vírus não foi recuperado de nenhuma região do encéfalo (CHOWDHURY et al., 1997). De maneira similar, coelhos inoculados com BoHV-5 evidenciaram replicação extensiva do vírus no encéfalo, mas os inoculados com BoHV-1 não a apresentaram lesões e também não foi possível recuperar o vírus a partir dessas amostras (SILVA et al., 2007).

Os sinais clínicos de bezerros que morreram de encefalite, logo após serem inoculados por via intranasal com cepa americana (TX-89) do BoHV-5, foram tremores musculares, marcha em círculos, bruxismo e ataxia, seguido de decúbito lateral, convulsões, movimentos de pedalagem e opistótono. As lesões no encéfalo destes animais consistiram em uma difusa meningoencefalite não supurativa, caracterizada por necrose neural, gliose e manguitos perivasculares linfocíticos (CHOWDHURY et al., 1997).

As glicoproteínas que se localizam na superfície do envoltório do vírus, desempenham um papel importante na patogenia da doença, porque atuam na entrada

do vírus na célula hospedeira, na maturação do vírus, na dispersão do vírus célula a célula e na liberação do mesmo. Analisando-se as sequências dos genes que codificam as glicoproteínas entre BoHV-1 e o BoHV-5 foi demonstrado que estes têm 72% de identidade e 77% de similaridade (CHOWDHURY et al., 2000). Os resultados de um experimento com coelhos, deixaram antever que a glicoproteína C (gC) do BoHV-5 não é necessária para permitir a entrada do vírus, via nervo olfativo, mas é importante para a dispersão neural eficiente. A virulência dentro do SNC foi diferente (menor) quando usaram a gC do BoHV-1 ao invés da gC do BoHV-5 (CHOWDHURY et al., 2000).

Vários trabalhos foram feitos na procura de dados importantes relacionados com a patogênese da meningoencefalite causada pelo BoHV-5 (CARDOSO et al., 2010), a grande maioria deles tem comparado o BoHV-5 com o BoHV-1 devido a sua estreita relação molecular mesmo que tenham diferenças importantes na hora de ingressar no sistema nervoso central (CHOWDHURY et al., 2002). Recentemente tem sido comprovado que sete genes (UL5, UL48, UL39, UL19, UL14, UL29 e UL15) são muito conservados (95 a 97%) entre o BoHV-5 e BoHV-1, no entanto que, quatorze (UL44, UL3, BICP4, UL24, US8, UL11, UL49, US4, BICP0, UL3.5, LR ORF2, US2, BICP22 e UL0.7) tem uma baixa conservação entre os dois vírus (entre 41 e 75%), destacando-se neste grupo os genes UL44, US8 e US4, que codificam respectivamente para as glicoproteínas gC, gE e gG, podendo explicar a diferença entre os mecanismos usados pelos dois vírus para ingressar no sistema nervoso central (DEL MEDICO ZAJAC et al., 2010).

2.1.3. Achados clínicos e diagnóstico diferencial

Os principais sinais clínicos nos bovinos incluem, depressão, anorexia, isolamento do rebanho, secreção serosa ocular e nasal, sialorréia, tremores musculares mais evidentes na cabeça e no pescoço, hiperestesia ao tato ou ao som, seguido por perda dos reflexos sensoriais, principalmente visual, descrevendo-se também a afecção dos reflexos auditivos e cutâneos (VASCONCELOS et al., 1993; SALVADOR et al., 1998; LEMOS et al., 2002). Observa-se também andar em círculo, ataxia, choque com

obstáculos, trismo, diminuição do tônus lingual, dificuldade para a apreensão do alimento e deglutição da água, nistagmo, bruxismo, catatonia, posição em decúbito prolongado, com dificuldade para voltar à normalidade e finalmente, prostração em decúbito ventral, decúbito lateral, movimentos de pedalagem e morte (BELTRÃO et al., 2000; COLODEL et al., 2002; PEREZ et al., 2002).

A meningoencefalite causada pelo BoHV-5 deve ser diferenciada clinicamente de outras doenças que atingem o encéfalo dos bovinos, como a raiva, botulismo, polioencefalomalacia por deficiência de tiamina, listeriose, meningoencefalite bacteriana, intoxicação por chumbo e até a encefalopatia espongiforme bovina (EEB), que apresentam sintomatologia clínica que eventualmente pode gerar confusão (GOMES et al., 2003; LEMOS 2005; SANT'ANA & BARROS, 2010).

2.1.4. Alterações macroscópicas

No sistema nervoso central muitas vezes não são encontradas lesões, mas pode-se observar achatamento das circunvoluções cerebrais e malacia cortical, caracterizada por áreas multifocais irregulares que podem medir entre 0,5 e 3 cm, geralmente de cor amarelo e superfície deprimida. Ao corte pode-se observar um aspecto finamente granular e algumas vezes associado com hemorragias, principalmente submeningeais (COLODEL et al., 2002; PEREZ et al., 2002). Outras alterações podem incluir protrusão do cerebelo através do forâmen magno, congestão dos vasos meningeanos, aumento do líquido cefalorraquidiano, ou ainda malacia, as quais são observadas principalmente em casos com evolução prolongada (LEMOS et al., 2002). Em bezerros acometidos pela forma sistêmica, além das lesões do sistema nervoso, observam-se ulcerações no sistema digestório, principalmente em abomaso e rúmen e ainda, hepatomegalia, pericardite e pneumonia (RIET-CORREA et al., 1989).

2.1.5. Alterações microscópicas

As lesões histopatológicas correspondem a uma meningoencefalite necrosante aguda, não supurativa, amplamente distribuída, que pode variar entre os graus leve até acentuado. A lesão é caracterizada por necrose neuronal, gliose, ruptura do neurópilo e manguitos perivasculares mononucleares constituídos principalmente por linfócitos, na substância cinzenta do encéfalo (SALVADOR et al., 1998). Podem ser encontrados corpúsculos de inclusão eosinofílicos intranucleares, os quais estão presentes nos astrócitos e neurônios e podem se correlacionar com diferentes graus da infecção. Nas infecções leves pode-se observar um corpúsculo de inclusão por campo, nas infecções moderadas dois e nas severas três ou mais (COLODEL et al., 2002; LEMOS et al., 2002; SALVADOR et al., 1998).

2.1.6. Diagnóstico

Devido à semelhança clínica com outras doenças, o diagnóstico clínico da meningoencefalite herpética dos bovinos é muito subjetivo e pode dar lugar a procedimentos epidemiológicos equivocados (PEDRAZA & ALESSI, 2004). Embora possa haver suspeita com base na somatória de dados clínicos e epidemiológicos, a análise histopatológica é necessária para a determinação do diagnóstico (SALVADOR et al., 1998; COLODEL et al., 2002). O achado dos corpúsculos de inclusão intranucleares em astrócitos e neurônios podem facilitar o diagnóstico (ELIAS et al., 2004), mas, nem sempre eles são observados (SANCHES et al., 2000). Dessa forma, são necessárias técnicas mais sofisticadas, como o isolamento viral a partir do encéfalo e das secreções nasais, para confirmar-se o envolvimento deste agente etiológico na meningoencefalite. Para isso precisa-se de material fresco, eficientemente coletado e que chegue rápido ao laboratório. Também são necessárias técnicas imunológicas, para a caracterização do agente, sendo muito usados os anticorpos monoclonais (ROEHE et al., 1997). Segundo HÜBNER et al. (2005), a imuno-histoquímica é uma boa técnica para a identificação do agente em amostras de tecido fixado em formalina e na

padronização utilizada pelos autores foi possível marcar o BoHV-5 em neurônios, células da glia e células mononucleares do infiltrado celular. O uso de testes moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) é apropriado para detectar o BoHV-5 e diferenciá-lo do BoHV-1, em amostras de campo ou procedentes de experimentos no laboratório (ALEGRE et al., 2001; GOMES et al., 2003).

2.2. Características moleculares do BoHV-5

Devido às diferenças nos mecanismos patogênicos dos herpesvírus bovinos foi preciso focalizar as pesquisas nas características moleculares de cada um deles para encontrar detalhes que facilitem a compreensão do comportamento patogênico dos mesmos. Para o BoHV-5, foram descritas inicialmente, as características moleculares de glicoproteínas de membrana como a glicoproteína C (gC), associada ao ingresso do BoHV-5 no encéfalo (CHOWDHURY et al., 2000) e posteriormente foram procuradas moléculas associadas ao estabelecimento de latência, sempre tentando identificar a rota provável de ingresso e permanência do vírus no sistema nervoso central do hospedeiro (MEYER et al., 1999). As principais diferenças na estrutura molecular antigênica dos herpesvírus 1 e 5 encontram-se nas glicoproteínas da cápside. As glicoproteínas que se localizam no envoltório viral tem sido identificadas como: B, C, D, E, G, H e I (MEYER et al., 1996; MEYER et al., 1999) e as proteínas Us9 e α-tif (CHOWDHURY et al., 2002; GILLETTE et al., 2002). Recentemente foi concluído o estudo do genoma do BoHV-5, encontrando 138,390 pb, contendo 75% de composição pelas bases Guanina e Citosina e as sequências longa UL104,054 pb e curta US 9,548 pb, sendo a curta rodeada pelos elementos IR e TR cada um com 12, 109 pb (DELHON et al., 2003). Sabe-se que a glicoproteína D (gD) é critica e essencial como receptor que propicia a união em muitos α herpesvírus. Entre o BoHV-5 e BoHV-1 existe 82% de identidade de aminoácidos, sendo por isso, que a replicação deles é muito semelhante (GABEV et al., 2010). Pela divergência na identidade de aminoácidos relacionados com a latência entre BoHV-1 e BoHV-5 (menos do 75% nas moléculas BICP0, BICP4 e BICP22, e 74% entre gE1 e gE5) e sabendo-se que a gE junto com a proteína Us9 são

as responsáveis pela capacidade do BoHV-5 para invadir o encéfalo, a gE deste vírus constituí-se numa das principais diferenças entre eles, para invadir o sistema nervoso dos bovinos (GABEV et al., 2010; CHOWDHURY et. al., 2002). A proteína Us9 do BoHV-1 é crucial para a reativação do vírus no TG e a mesma proteína no BoHV-5 tem um papel importante no transporte viral desde os receptores de neurônios olfatórios até os neurônios de segunda ordem dentro do bulbo olfatório (SILVA et al., 2009). Em um experimento em que se utilizou um recombinante de BoHV-5 carente de Us9, foi demonstrada sua incapacidade para invadir o cérebro de coelhos (CHOWDHURY et al., 2002). Por outro lado, aparentemente a glicoproteína I (gI) forma um complexo com a gE (gI/gE) que potencializa o ingresso do vírus na célula. SILVA et al. (2009) usaram um recombinante de BoHV-5 sem gE/gI/Us9 resultando em diminuição, mas não bloqueio total, do ingresso do vírus no SNC.

2.3. Patogenia da malacia ocasionada pelo BoHV-5

Inicialmente houve confusão pelo termo polioencefalomalacia (necrose cerebrocortical) que significa malacia da sustância cinzenta do cérebro, mas já foi estabelecido que o termo pode ser usado para definir a condição mórbida ocasionada pela deficiência de tiamina e também para descrever lesões características de várias doenças incluindo a meningoencefalite pelo BoHV-5 (LEMOS, 2005; SANT'ANA & BARROS, 2010). Existem algumas proteases dependentes do zinco, denominadas metaloproteinases da matriz (MMPs) que têm um papel importante na resposta inflamatória, principalmente a MMP-9, que aparentemente participa na ruptura da barreira hematoencefálica atuando diretamente na membrana basal, depois do ingresso do vírus no hospedeiro (CARDOSO et al., 2010). Por outro lado, o radical oxido nítrico (ON) é muito importante na resposta imune contra o BoHV-5. Especificamente a enzima óxido nítrico sintetase é que converte a L-arginina em óxido nítrico e tem três isoformas, uma endotelial, outra neuronal e finalmente uma induzível. Esta última aparentemente é a responsável pelos efeitos tóxicos na célula, logo depois de ser ativada pela interleucina 1β (IL-1β) e pelo interferon γ (DEZENGRINI et al., 2009). A proteína

antioxidante 1 (AOP-1) funciona como uma peroxidase que compacta e coleta radicais livres como o H_2O_2. A participação desta molécula na patogenia das encefalites foi testada também para BoHV-5, mas a conclusão é que são precisos novos estudos para se ter certeza do envolvimento destas moléculas na geração do dano tissular na meningoencefalite herpética (CARDOSO et al., 2010).

3. JUSTIFICATIVA

Atualmente não se conhece completamente os mecanismos da resposta inflamatória do sistema nervoso central em bovinos infectados naturalmente com o herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5). O conhecimento sobre a patogenia do BoHV-5 na doença neurológica dos bovinos é relativamente recente e, por conseguinte, ainda encontra-se em estudo uma grande parte dos eventos que ocorrem neste tipo de entidade. Outras doenças do sistema nervoso central, como a infecção pelo vírus da raiva em casos naturais e experimentais, têm sido mais estudadas pela sua condição de zoonose. Da mesma forma, têm sido realizados vários estudos experimentais com vírus que apresentam neurotropismo, como o Vírus da Estomatite Vesicular (VEV), procurando dados que permitam aprofundar o conhecimento da forma como o encéfalo responde à agressão. O desconhecimento dos eventos que ocorrem durante a inflamação do encéfalo, numa infecção viral, impede o avanço no conhecimento da doença, levando a um planejamento escasso das estratégias de controle e ou erradicação da mesma. A realização desta pesquisa, utilizando-se os coelhos como modelo experimental, permite aprofundar o conhecimento da patogenia da encefalite causada por BoHV-5, em primeira instância pela descrição dos eventos inflamatórios ocorridos pela infecção, mas no futuro, revelar-se-á como base para interpretar se a resposta inflamatória é benéfica para o hospedeiro ou se pelo contrário, é a responsável pelo grande transtorno necrótico que acompanha o quadro de meningoencefalite não supurativa característico deste tipo de doença. Existem vários animais que servem como modelo de infecção do BoHV-5, mas o coelho tem sido o melhor descrito.

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

Descrever a participação celular na resposta inflamatória e relacioná-la com a quantidade de vírus em diferentes regiões do encéfalo de coelhos experimentalmente infectados com herpesvírus bovino 5 (BoHV-5).

4.2. Específicos

Determinar a participação de linfócitos T, linfócitos B, astrócitos e macrófagos, , na encefalite induzida em coelhos infectados pelo BoHV-5.

Quantificar, mediante a técnica de PCR em tempo real (qPCR), a carga viral em seis regiões diferentes do encéfalo de coelhos experimentalmente infectados com o BoHV-5.

Detectar partículas virais do BoHV-5 no encéfalo de coelhos experimentalmente infectados com o vírus.

Comparar a resposta inflamatória, a carga viral e a presença do BoHV-5 nas diferentes regiões do encéfalo de coelhos inoculados experimentalmente com o vírus.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Amostras de encéfalo

Neste trabalho foram usadas amostras de encéfalo de coelhos (n=5) com encefalite de origem viral, experimentalmente induzida por BoHV-5, no Laboratório de Virologia, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Os blocos fazem parte de um grupo de amostras usadas em outros experimentos[1]. As amostras permaneceram por 12 horas em solução tamponada de formol e logo após foram incluídas em parafina para análise microscópica.

A resposta inflamatória foi avaliada em seis regiões diferentes do encéfalo, de cinco coelhos inoculados com o BoHV-5. Um coelho foi usado como controle e não foi inoculado com o vírus. Os blocos de parafina contendo os encéfalos dos coelhos experimentalmente infectados foram identificados com a letra “D” para representar o grupo de animais doentes. Os blocos do coelho controle foram identificados com a letra C. Conforme mostrado na figura 1, o encéfalo de cada animal foi dividido em seis partes, bulbo olfatório (BO), córtex olfatório (CO), córtex anterior (CA), córtex ventro e dorso lateral (CVL/CDL), hipocampo e córtex posterior (HI/CP) e tálamo (TA), para fazer comparações na resposta inflamatória em cada um deles. Apenas dois coelhos D4 e D5 tinham as seis regiões do encéfalo disponíveis; o coelho D1 não tinha os blocos

---

[1] No laboratório de Virologia da UFSM, coelhos Nova Zelândia desmamados (30-35 dias de idade) foram anestesiados com Zoletil (Tiletamina e Zolazepam, Virbac ®, SP, Brasil) e logo inoculados pela via intra-nasal com 1 mL de uma suspensão de vírus contendo 10 $^{7.1}$ doses infetantes ($TCID_{50}$) de dois estirpes virais de BoHV-5 (SV-507/99 e EVI-340/96). Todos os animais foram monitorados para sinais neurológicos diariamente, por 20 dias depois da inoculação. No dia 20 os coelhos D1, D2 e D5 convulsionaram e pelo estado de saúde, todos os coelhos foram eutanasiados nesse dia. Esfregaços nasais foram feitos a cada três dias até o dia 12 pós-inoculação para fazer isolamento viral em células MDBK, segundo o protocolo padronizado na UFSM. Os experimentos com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética e Bem Estar Animal, Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, segundo os Princípios Éticos para experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a Lei Federal no. 6638 de 8 de maio de 1979 (FLORES et al., 2009).

correspondentes ao córtex anterior e o córtex olfatório; o coelho D2 não tinha o hipocampo e o coelho D3 o córtex anterior, o hipocampo e o córtex ventro e dorsolateral. Em resumo, de 30 amostras possíveis, só foram testadas 24 devido à carência de amostras completas em três dos animais.

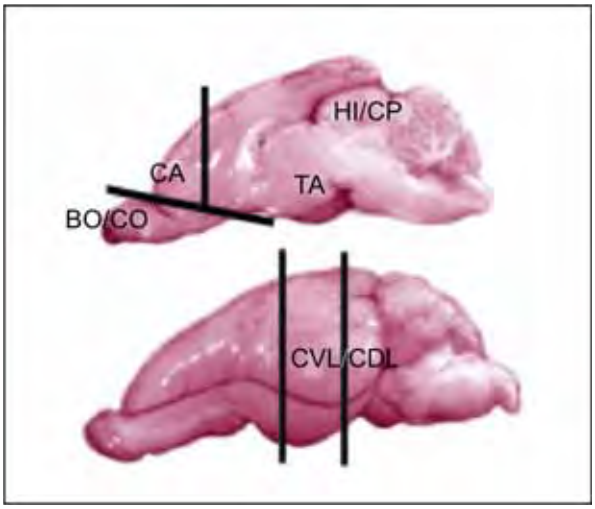


Figura 1. Representação gráfica das regiões do encéfalo de coelho usadas na presente pesquisa. Na parte superior uma vista sagital do encéfalo mostrando as regiões do hipocampo (HI/CP), tálamo (TA), córtex anterior (CA), bulbo olfatório e córtex olfatório (BO/CO). Na parte inferior uma vista dorsal mostrando a região do córtex ventro lateral e dorso lateral (CVL/CDL).

O critério para a análise microscópica incluiu a observação de mudanças morfológicas no encéfalo, tais como malacia, manguitos perivasculares, corpúsculos de inclusão intranucleares compatíveis com o herpes vírus 5 (BoHV-5) e a presença de células “gitter”. Igualmente, foram observadas as mudanças na morfologia dos astrócitos, determinando se teriam reatividade ou não, comparando-os com aqueles do grupo controle. Para interpretação da magnitude das lesões, as mesmas foram classificadas de forma qualitativa em quatro categorias representadas por cruzes, assim, quando aproximadamente menos do 20% do tecido foi afetado, a quantificação denominou-se discreta, representada por uma cruz (+); entre 21 e 60% foi moderada, representada por duas cruzes (++) e mais do que 60% considerou-se acentuada,

representada por três cruzes (+++). A ausência de lesões foi representada como o número zero (0).

5.2. Análise imuno-histoquímica

A técnica de imuno-histoquímica para a detecção de células inflamatórias no sistema nervoso central foi feita com o mesmo protocolo usado por PEDRAZA et al. (2008), no Laboratório de Neuropatologia da FCAV-UNESP. Para a detecção do herpesvirus bovino 5 foi seguido o protocolo proposto por HÜBNER et al. (2005).

A detecção de cada antígeno conserva um protocolo básico que inclui vários passos como: desparafinização, hidratação, recuperação antigênica, bloqueio de peroxidase endógena, bloqueio de antígenos inespecíficos, adição de anticorpo primário, adição de anticorpo secundário, adição de um sistema amplificador da reação (Streptavidina – HRP), adição de um cromógeno (Diaminobenzidina), contra-coloração (Hematoxilina de Harris) e montagem da lâmina. Os anticorpos utilizados estão descritos na Tabela 1.

Houve uma variação sobre o protocolo usado por PEDRAZA, et al. (2008), sendo substituído o sistema de amplificação do complexo Avidina-Biotina pela Streptavidina-HRP. Para a detecção do BoHV-5 foi usada a diluição 1:100, a recuperação antigênica foi incubada em 10 minutos.

De um coelho clinicamente sadio, submetido a eutanásia para fins de ensino, no Biotério da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, do campus de Botucatu foram usados fragmentos de seus linfonodos como controles positivos para marcação de linfócitos T, linfócitos B e macrófagos, e como controle positivo dos astrócitos, um fragmento do seu encéfalo.

Para o BoHV-5 foram usados como controles positivos um bloco contendo encéfalo de coelho experimentalmente infectado com o BoHV-5 (mesmas estirpes virais usadas nos coelhos doentes), incluído nas amostras procedentes da UFSM. Além disso, foi utilizado também um bloco contendo córtex anterior do encéfalo de um bovino experimentalmente infectado com o BoHV-5, gentilmente cedido pelo Dr. Didier

Quevedo Cagnini da FMVZ-UNESP. Como controle negativo de todas as reações, foi omitida a adição do anticorpo primário e em seu lugar foi usado um tampão substrato TRIS pH 7,4. Além disso, os fragmentos do coelho C1 (grupo controle) foram usadas também para este fim.

Tabela 1. Relação de anticorpos utilizados para detectar células inflamatórias e agente viral em cérebro de coelhos experimentalmente infectados pelo BoHV-5.

Reativação / Recuperação Antigênica	**Anticorpos Primários**	**Diluição / Tempo**	**Marca**	**Anticorpo secundário**
Banho Maria 37 °C [1]	Anti-linfócito B [4] NCL-BLA 36 Clone A2742	1:100 12 – 18 horas	Dako	Universal DAKO
Câmara Pascal de pressão [2]	Anti-linfócito T CD_3 [5] Clone A-0452	1:100 2 horas	Dako	Universal DAKO
Câmara Pascal de pressão [2]	Anti-GFAP [5] Clone Z-0334	1:50 12 - 18 horas	Dako	Universal DAKO
Câmara Pascal de pressão [2]	Anti-macrófago [4] MAC 387 Clone M-0747	1:100 12 - 18 horas	Novocastra	Universal DAKO
Proteinase K [3]	Anti BoHV-5 Clone 2F9 [4]	1:100 12 - 18 horas	SV-UFSM [6]	Universal DAKO

[1] Sistema de aquecimento (Water Bath LS Logen), 20 min. (solução citrato pH 6.0)
[2] Microprocessador câmara controlada de pressão DAKO (Cytomation), por 20 min.
[3] Recuperação enzimática 10 minutos
[4] Anticorpo monoclonal
[5] Anticorpo policlonal
[6] Setor de Virologia, Universidade Federal de Santa Maria.

Os diâmetros maior e menor de quarenta astrócitos (vinte em cada grupo) foram medidos usando o programa ImageJ (versão 1.44o, 2010) [2] a fim de estabelecer

[2] ImageJ é programa de processamento de imagem baseado em Java, de domínio público, desenvolvido no instituto Nacional de Saúde nos Estados Unidos.

diferenças entre os grupos infectado e controle e determinar a presença de astrócitos reativos. Mediante a formula $\pi r_1 r_2$ foram obtidos os valores da área dos astrócitos em ambos grupos.

5.3. Real time PCR (qPCR)

5.3.1. Extração do DNA

Para a extração do material genético total dos tecidos incluídos em parafina foi usado o illustra ^{TM} Tissue & Cells genomic Prep Mini Spin Kit (GE Health care biosciences, Pittsburg Pennsylvania, USA), segundo as instruções do fabricante; duas reações em branco (só reagentes sem as amostras) foram extraídos junto a cada grupo de 10 cortes de tecido parafinado, com o fim de avaliar uma possível reação cruzada. Finalmente, a concentração do DNA foi determinada pela leitura de densidade óptica a 260 nm.

5.3.2. Quantificação das amostras

Para a reação de qPCR foi utilizado 4 µL do DNA extraído, 400 nm dos iniciadores (primers) senso: TACGGACTGCCGGATTAACA, anti-senso: GTCACCACTA CCACCGCCGCCA ACAT segundo GOMES et al. (2002), 10 µL de 2X Power Sybr ® Green PCR Master Mix (PROMEGA, USA) e água livre de nucleases até obter o volume final de 20 µL. As condições da reação foram as seguintes: 95 °C/10 minutos para a desnaturação inicial, amplificação com 40 ciclos (95 °C por 15s de desnaturação, 60 °C por 1 minuto para o anelamento e extensão), e para a confirmação do produto foi realizado uma curva de dissociação (95 °C for 15 s, 60 °C for 30 s e 95 °C for 15 s) para posterior análise. Os dados da fluorescência foram coletados durante o anelamento e extensão e o “threshold cycle numbers” (CT) foram determinados usando ABI PRISM®

7300 Sequence Detector (Applied Biosystems, USA) e software SDS versão1.2.3 (“Sequence Detection Systems” 1.2.3 – 7300 Real Time PCR System – Applied Biosystems,USA). Como controle negativo a amostra foi substituída por água livre de nucleases. Todas as amostras de qPCR foram realizadas em duplicatas.

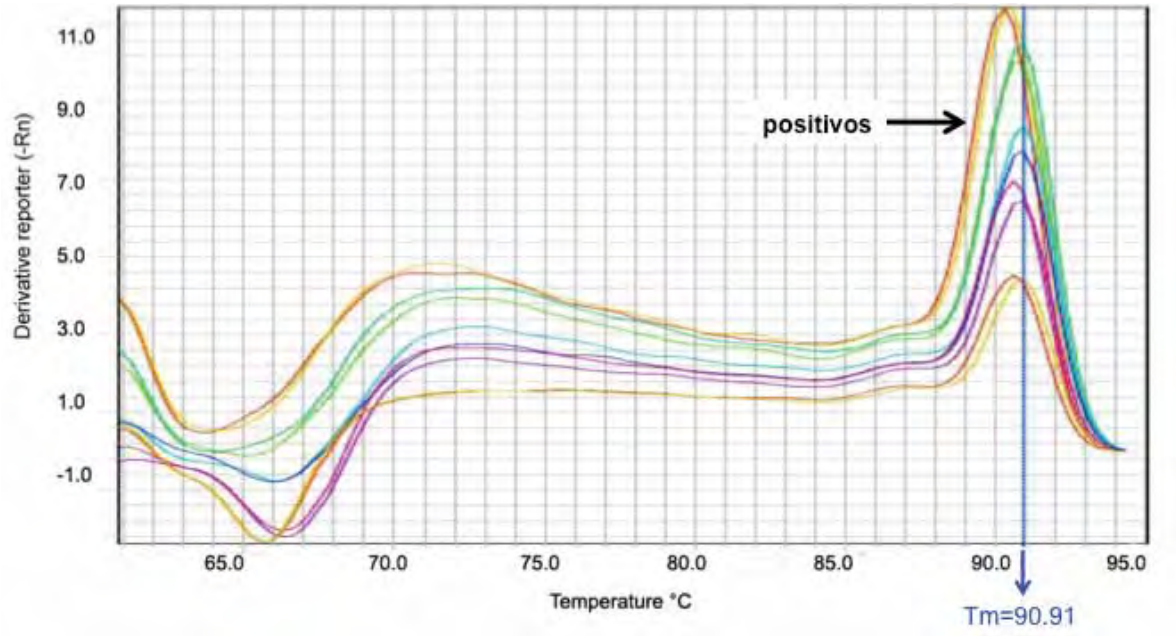


Figura 2. Curva de dissociação (95 °C por 15 s, 60 °C por 30 s e 95 °C por 15 s), no eixo da X aparecem os valores relativos da quantidade de BoHV-5 achado, no eixo Y os valores de temperatura de fusão na qual foi possível a amplificação das amostras positivas (incluídos dois controles), iniciador utilizado sugerido por Gomes et al. (2002).

A curva padrão foi realizada por meio de diluições decimais seriadas. A amostra mais positiva, ou seja, com maior quantidade de fitas de DNA foi utilizada para gerar uma curva padrão relativa, considerando um total de 5 pontos e sendo a maior diluição o valor de 100, e a menor diluição o valor de 0,01. Para avaliação de cada amostra considerou o valor de R2 com valores acima de 0,99 da curva padrão relativa e obtidas, deste modo, valores para a analise estatística (Figura 2). Um controle

endógeno, a expressão do gene Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) foi incluído para verificar a existência do DNA de coelho nas amostras.

5.4. Analise estatística

A imunomarcação de células inflamatórias foi analisada mediante razões e proporções como tem sido usado para estudos descritivos. Para analisar a quantidade de vírus nas diferentes regiões do encéfalo foi usada em primeiro lugar uma ANOVA, teste de Fischer (Anexo A) estabelecendo de forma geral a diferença entre as medias obtidas e posteriormente o teste de Duncan para saber qual das regiões tinha sido mais atingida pelo BoHV-5. Para comparar as medias das mensurações dos astrócitos entre o grupo experimental e o grupo controle foi usado o teste T de student (Anexo B). Em todos os casos verificou-se a coincidência dos dados com uma curva normal.

6. RESULTADOS

6.1. Achados histopatológicos

Na análise microscópica, nem todos os coelhos tiveram lesões compatíveis com a infecção pelo BoHV-5, apenas o animal D4 mostrou uma resposta típica da neuroinflamação herpética (meningite e encefalite não supurativa) caracterizada pela presença de manguitos perivasculares e infiltrado inflamatório meningeano, constituído principalmente por monócitos e macrófagos, mas não foram observados corpúsculos de inclusão. Os detalhes podem ser observados na Tabela 2 e na Figura 3. O coelho D3 nas regiões do BO e CO, o coelho D1 no HI/CP e o coelho D5 no CO também apresentaram discretas alterações inflamatórias.

Tabela 2. Aspectos morfológicos pesquisados em diferentes regiões do encéfalo de um coelho experimentalmente infectado com o BoHV-5.

Aspecto morfológico	**Regiões do encéfalo**					
	BO	**CA***	**CO***	**TA**	**HICP***	**VLDL**
Malacia	0	+	0	0	++	0
Manguitos perivasculares	0	+	+	0	+++	0
Corpos de inclusão viral	0	0	0	0	0	0
Gliose difusa	0	0	0	0	0	0
Satelitose	0	0	0	0	0	0
Células gitter	0	+	0	0	++	0

* Os achados foram referidos nas regiões do córtex anterior (CA), córtex olfatório (CO) e hipocampo (HICP) do animal D4. A quantificação foi estabelecida como uma cruz (+) para a intensidade discreta, duas cruzes (++) na moderada e três cruzes (+++) na acentuada. Para a ausência dos achados foi utilizado o numero zero (0).

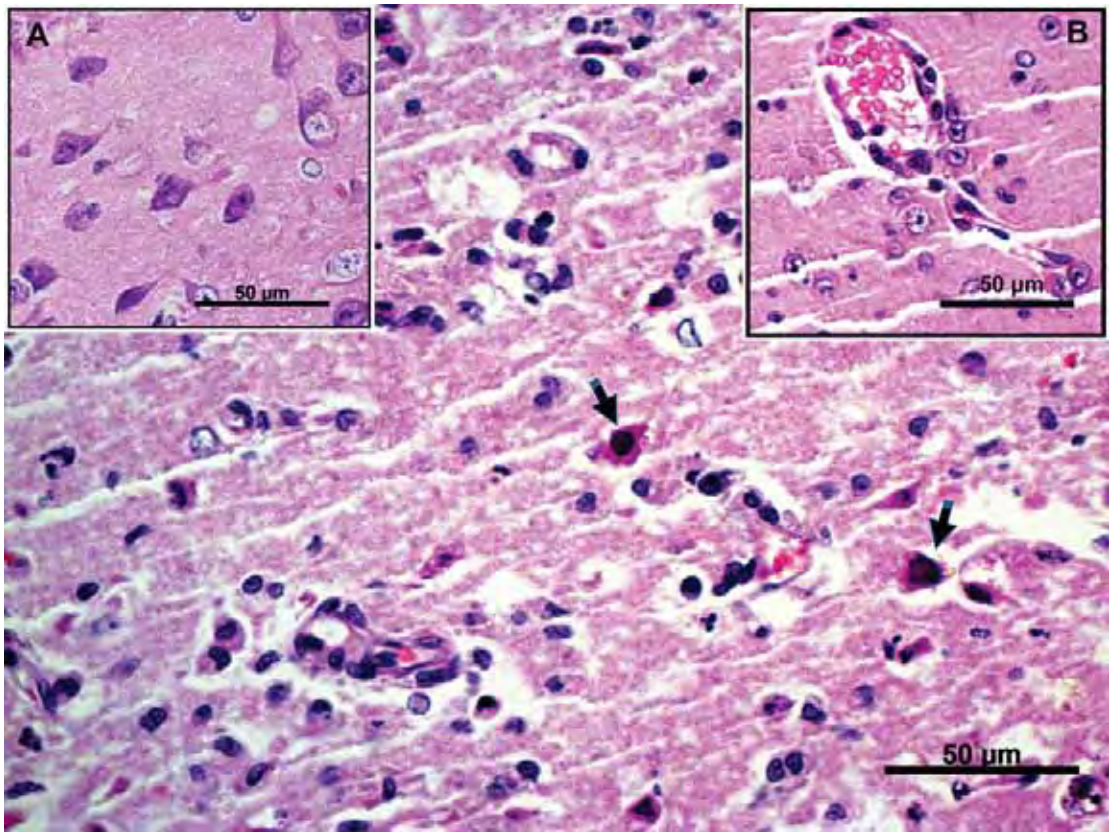


Figura 3. Fotomicrografia do encéfalo de coelho experimentalmente infectado com o BoHV-5. Coloração de H&E, 40X. Notar a presença de neurônios necróticos (setas). **A**. Imagem histológica do hipocampo (HI/CP) do coelho controle. **B**. Discreto manguito perivascular no Tálamo (TA) do coelho D4.

6.2. Achados imuno-histoquímicos

A imunodetecção de células inflamatórias foi realizada em todos os cortes do encéfalo dos animais doentes e do controle. Só o animal identificado como D4 apresentou marcação positiva para as células inflamatórias e para o vírus. Para a análise, os fragmentos de tecido foram divididos em duas áreas, a primeira denominada área 1, correspondendo à periferia dos vasos sanguíneos (constituída pelos manguitos perivasculares) e outra denominada área 2, constituída pelos neurônios, o neurópilo e a porção restante do tecido.

Pelo fato de nem todos os animais apresentarem alterações inflamatórias, a limitada quantidade de tecido em cada lâmina e, o pequeno número de células marcadas, a comparação da neuroinflamação com base na presença de linhagens celulares diferentes foi limitado à análise do hipocampo do animal D4, seguindo um sistema semelhante ao descrito para a interpretação dos achados histopatológicos por H&E.

6.2.1. Imunodetecção de Linfócitos T.

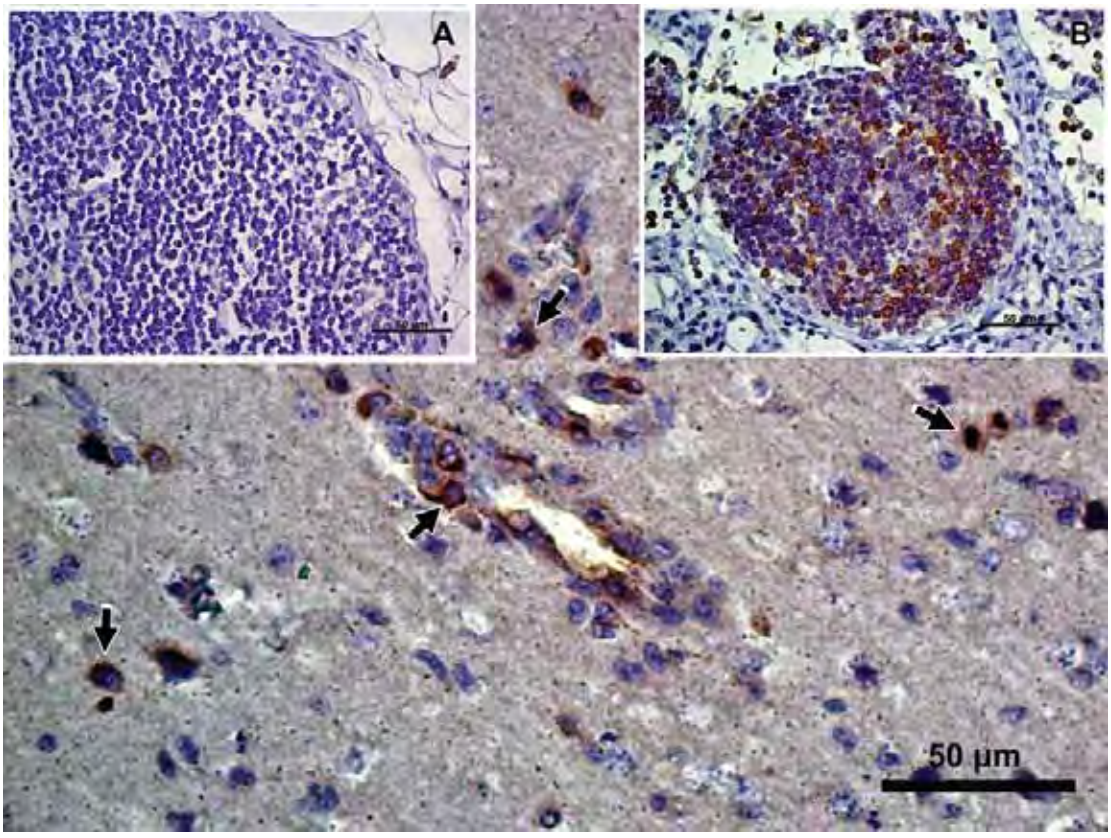


Figura 4. Fotomicrografia do encéfalo do coelho experimentalmente infectado com o BoHV-5 mostrando um manguito perivascular com imunomarcação para Linfócitos T (anti-CD_3 policlonal). Note a participação dos linfócitos T na resposta inflamatória nas áreas 1 (manguito perivascular) e 2 do fragmento tecidual (Barra = 50 µm, streptavidina HRP, objetiva 40X). **A.** Controle negativo, linfonodo de coelho, 40 X. **B.** Controle positivo, linfonodo de coelho.

Após analisar a presença de Linfócitos T no encéfalo do coelho mediante a detecção do antígeno CD_3 na superfície celular, observou-se que nas áreas 1 e 2 dentro do fragmento do encéfalo, este tipo de célula sempre esteve presente em relativo alto grau de infiltração quando comparado com as outras linhagens celulares (Figura 4).

6.2.2. Imunodetecção de Linfócitos B.

Os Linfócitos B evidenciados pela detecção do antígeno BLA na superfície celular apresentaram-se em menor proporção quando comparados com os Linfócitos T, tanto na área 1 como na 2, no fragmento de tecido (Figura 5).

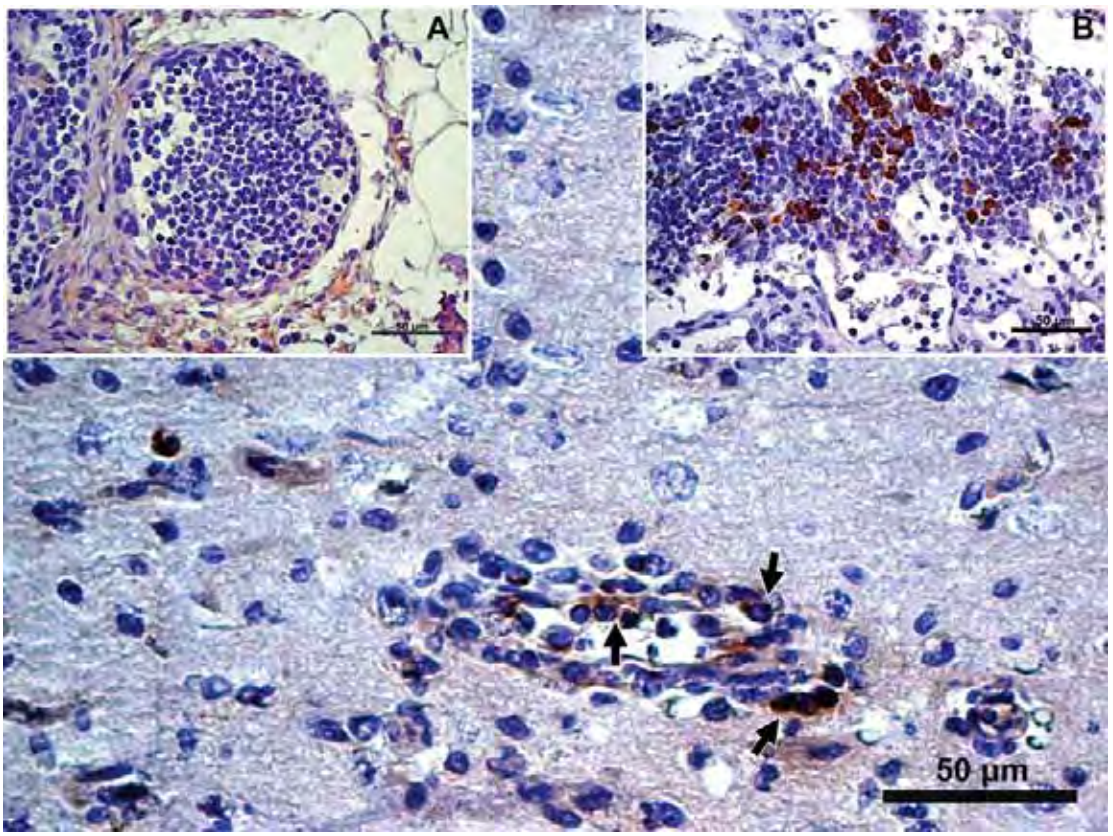


Figura 5. Fotomicrografia do encéfalo de coelho experimentalmente infectado com o BoHV-5, mostrando um manguito perivascular com imunomarcação para Linfócitos B (anti-BLA monoclonal). Pode-se notar algumas células que fazem parte da reação ao redor do vaso sanguíneo (Barra = 50 μm, streptavidina HRP, objetiva 40X). **A.** Controle negativo, linfonodo de coelho. **B.** Controle positivo, linfonodo de coelho.

6.2.3. Imunodetecção de macrófagos

Os macrófagos integraram o infiltrado inflamatório geralmente acompanhando as áreas de malacia, embora não exclusivamente nesta localização. Nenhum dos outros coelhos mostrou infiltrado severo destas células no encéfalo, exceto no coelho D4 no qual foi evidente em semelhante proporção quando comparado com os linfócitos T (Figura 6).

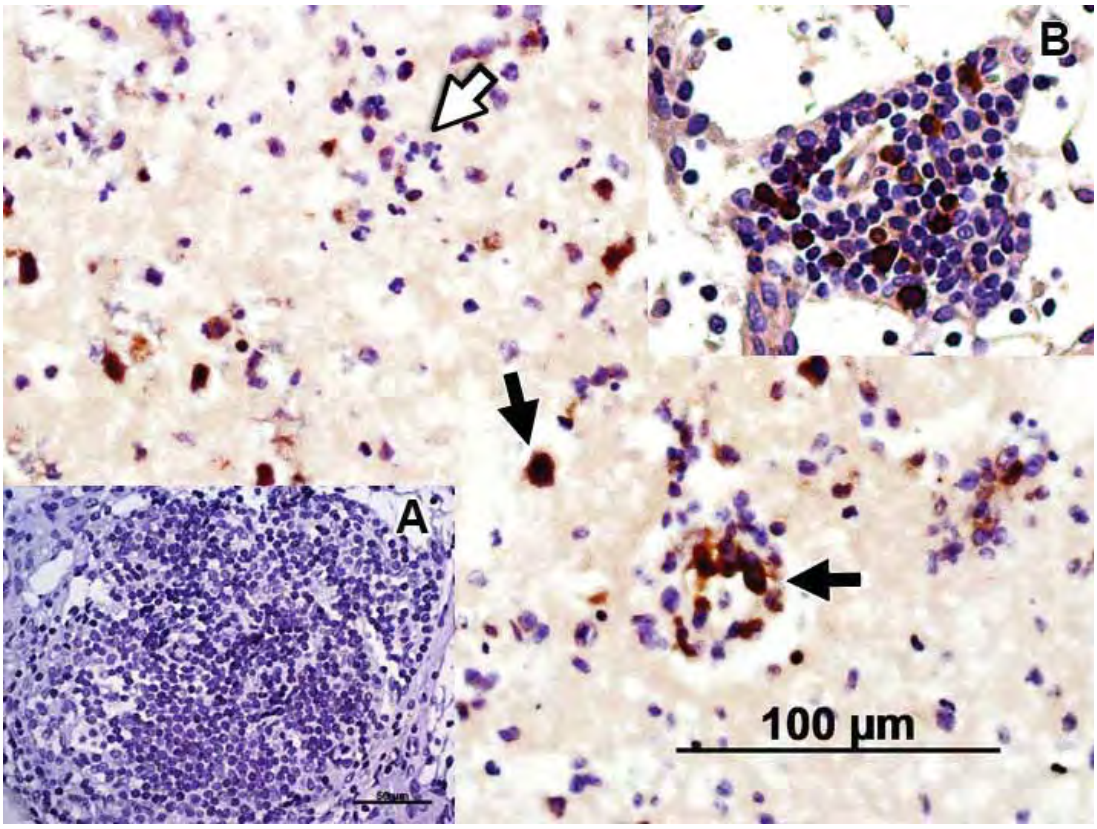


Figura 6. Fotomicrografia do hipocampo de coelho experimentalmente infetado com o BoHV-5 mostrando imunomarcação para macrófagos nas setas pretas e fragmentos do núcleo dos neurônios necróticos na seta branca (anti-MAC, monoclonal. Barra = 50 µm, streptavidina HRP, objetiva 20X). **A.** Controle negativo, linfonodo de coelho (40X). **B.** Controle positivo, linfonodo de coelho (40X).

6.2.4. Imunodetecção de astrócitos

A análise do grau de participação dos astrócitos na inflamação dos encéfalos de coelho esteve limitada a sítios diferentes onde havia manguitos perivasculares (área 2). As diferentes partes do encéfalo do coelho do grupo controle (BO, CA, TA, HI/CP, VL/DL) também mostraram marcação positiva para este tipo de células, mas na região do hipocampo uma quantidade maior de astrócitos foram vistos. Além disso, a analise foi restrita a esta área devido à necessidade na comparação com a região afetada pelo BoHV-5 a qual foi o HI/CP do coelho D4 (Figura 7).

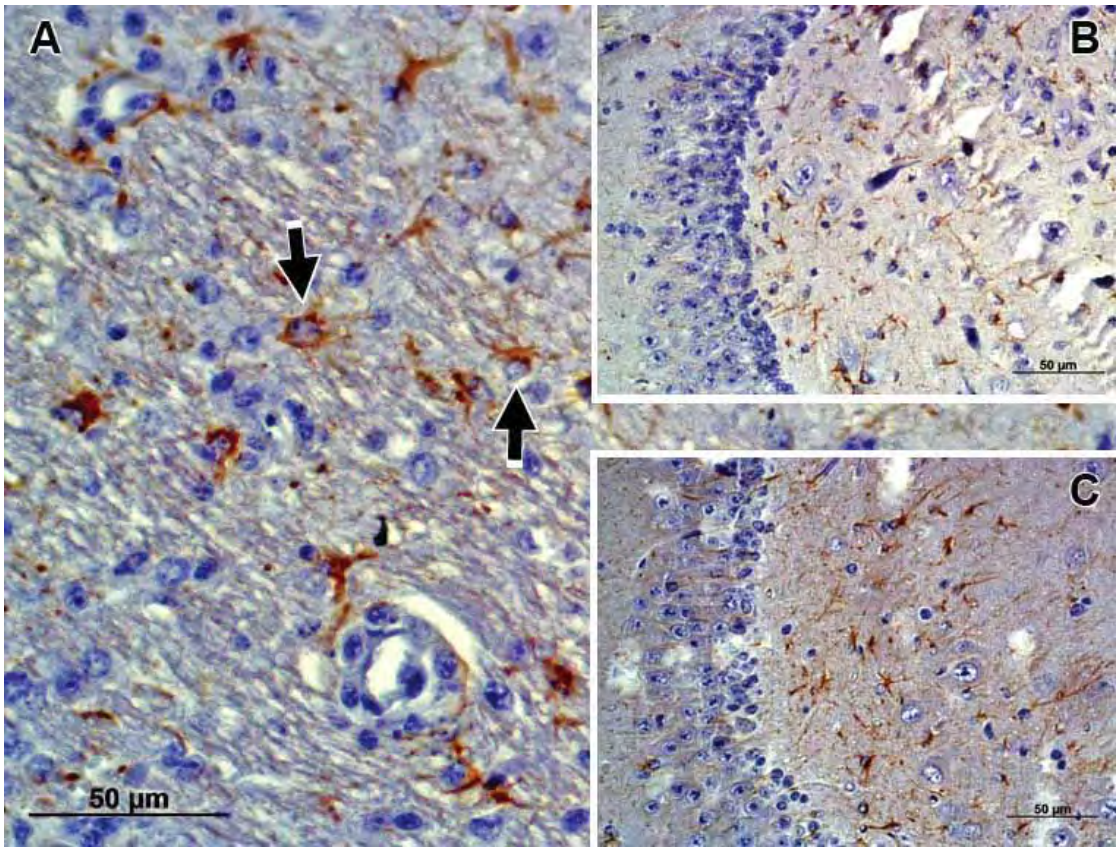


Figura 7. Fotomicrografia do hipocampo de coelho mostrando imunomarcação para astrócitos, (Barra = 50 µm, streptavidina HRP, objetiva 40X). **A.** As setas mostram alguns astrócitos imunomarcados no hipocampo do coelho D4. **B.** Hipocampo do coelho D4 mostrando um padrão de marcação similar quando comparado com o hipocampo do coelho controle. **C.** Hipocampo do coelho controle (40X).

Os astrócitos estiveram similares nos coelhos do grupo experimental e no grupo controle, em ambos casos, esses astrócitos mostravam-se moderadamente corados em marrom (imunorreatividade moderada), o núcleo tendia a se apresentar aparentemente maior no hipocampo do coelho D4, acompanhando o que poderia se considerar um aumento de volume celular e o nucléolo tornava-se ligeiramente mais visível. Quando comparados os astrócitos no hipocampo dos coelhos D4 e C1, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nas medias dos diâmetros maior (respectivamente 7,5 vs 6,8) e menor (5,2 vs 4,8), também não na media da área do corpo celular (30,4 vs 25,7) como observado na Figura 8. As mensurações individuais podem ser observadas no Anexo C. Os processos astrocíticos apresentavam-se aparentemente mais espessos no hipocampo do coelho D4, no entanto, as suas ramificações não eram nítidas, principalmente nas regiões onde ocorria necrose, por isso, o comprimento desses prolongamentos não foi medido.

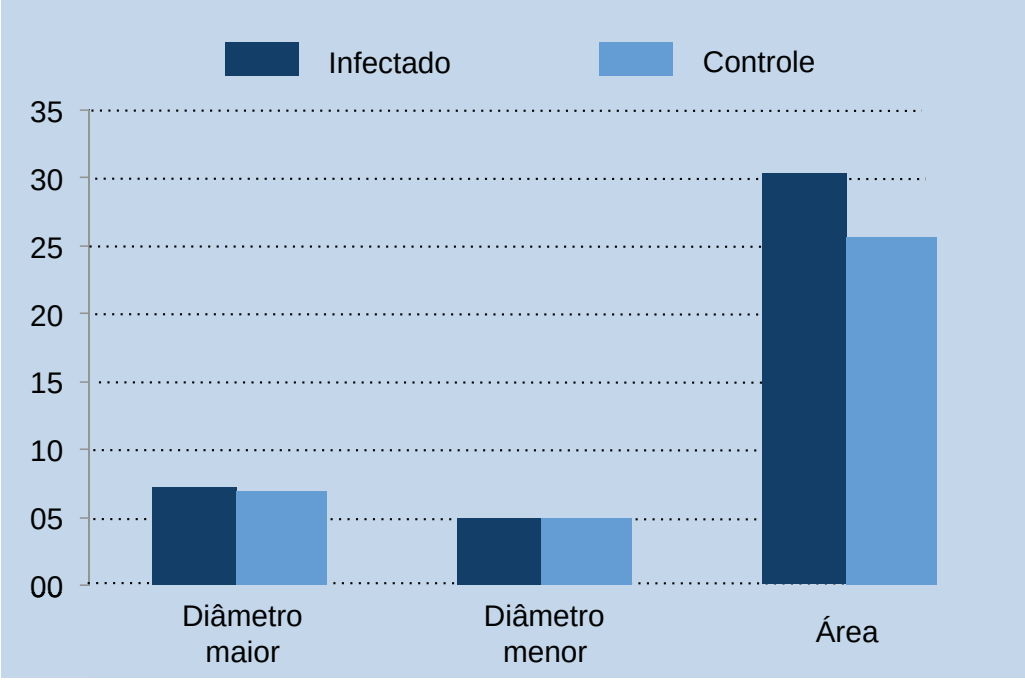


Figura 8. Mensurações dos astrócitos no HI/CP do encéfalo de coelho. As barras representam a media do valor das mensurações dos diâmetros maior e menor dos astrócitos, assim como da área obtida a partir desses dados.

6.2.5. Imunodetecção do BoHV-5

O BoHV-5 foi detectado somente no encéfalo do coelho D4. A imunodetecção das partículas virais foi observada como agregados pequenos no citoplasma dos neurônios e alguns astrócitos, mostrando um padrão de forma arredondada ou ovóide e um número variável de corpúsculos de inclusão. Não foram observadas as mesmas características no interior dos núcleos neuronais, exceto em alguns neurônios como é mostrado na figura 9.

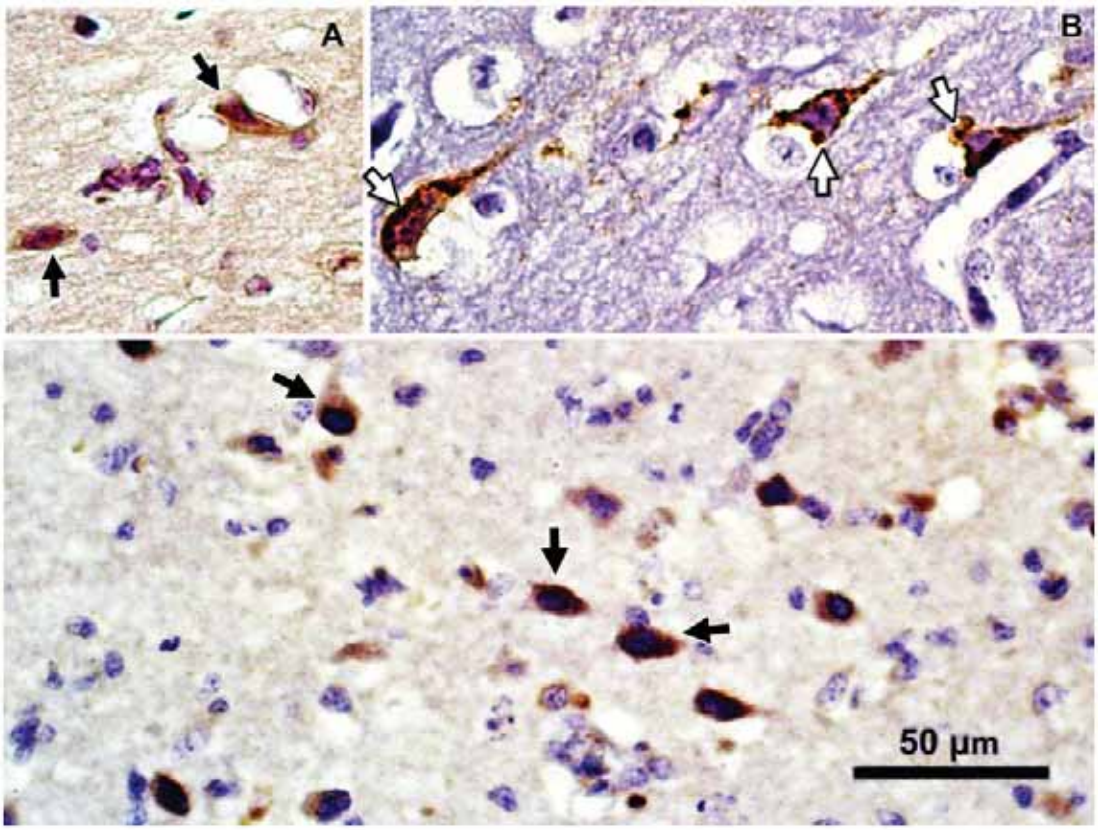


Figura 9. Fotomicrografia do hipocampo de coelho experimentalmente infetado com o BoHV-5 mostrando imunomarcação para o vírus usando o anticorpo monoclonal 2F9 (Barra = 50 µm streptavidina HRP, objetiva 40X). **A.** Controle positivo córtex cerebral de coelho, as setas indicam a imunomarcação positiva. **B.** Controle positivo, córtex cerebral de bovino experimentalmente infectado com o BoHV-5. Note os corpos de inclusão, setas brancas. **C.** Hipocampo do Coelho D4, a imunomarcação aconteceu no núcleo e no citoplasma dos neurônios.

6.3. Quantificação viral pela real time PCR (qPCR)

Uma quantificação relativa do BoHV-5 em encéfalos de coelhos foi realizada usando uma curva – padrão baseada no método para processo de PCR em tempo real (OLIVEIRA et al., 2010). Neste método o fragmento de encéfalo com a maior quantidade do vírus foi o hipocampo do coelho D4 e o mesmo foi usado como referência para comparar as quantidades de vírus nos demais fragmentos do encéfalo dos animais infectados (48 amostras). Cada reação de qPCR foi testada em duplicata. O hipocampo de todos os animais infectados testados foi significativamente mais atingido pelo BoHV-5 ($p<0,05$), quando comparado com as demais regiões do encéfalo, segundo o teste de Fisher (Anexo A).

Proporcionalmente, o hipocampo foi quase 80 vezes mais afetado que o córtex anterior, que foi a segunda região do encéfalo com maior quantidade de vírus. No terceiro lugar, o córtex olfatório, posteriormente o tálamo, o bulbo olfatório e finalmente o córtex ventral e dorso lateral, (teste de Duncan, $p<0,05$). Os resultados da comparação podem ser observados na Tabela 3.

As 10 amostras (5 regiões disponíveis do encéfalo testadas em duplicata) do coelho controle resultaram negativas para o BoHV-5 e positivas quando foram testadas com o controle endógeno GAPDH, confirmando que a sua negatividade para o BoHV-5 não correspondia a uma perda do material no momento da extração do DNA. Na Figura 10, podem-se observar as curvas de dissociação representando os casos positivos (48 casos) obtidos pela quantificação relativa feita pela qPCR.

Para a análise estatística foram incluídos os dados dos animais infectados porque o interesse foi determinar as diferentes quantidades de vírus (nas diferentes regiões do encéfalo). Por outro lado, as regiões do encéfalo do coelho controle não continham vírus como foi comprovado pela qPCR

Tabela 3. Percentagem de partículas víricas detectadas no encéfalo de coelhos experimentalmente infectados com o BoHV-5.

Animais *	Regiões do encéfalo **					
	BO	**CA**	**CO**	**TA**	**HI/CP**	**VL/DL**
D1	0,03	-	-	0,01	3,78	0,00 †
D1	0,03	-	-	0,01	3,03	0,00 †
D2	0,00 †	0,00 †	0,01	0,00 †	-	0,08
D2	0,00 †	0,00 †	0,01	0,00 †	-	0,10
D3	2,03	-	2,55	0,91	-	-
D3	1,72	-	2,67	0,95	-	-
D4	0,00 †	14,90	4,66	2,00	100,00 ‡	1,32
D4	0,00 †	14,05	5,72	2,23	100,00 ‡	1,94
D5	0,02	0,01	1,77	0,00 †	0,02	0,01
D5	0,01	0,02	1,97	0,00 †	0,02	0,01
Media	**0,38**	**4,83**	**2,42**	**0,61**	**34,48**	**0,43**

(**) Bulbo olfatório (BO), córtex olfatório (CO), córtex anterior (CA), córtex ventro e dorso lateral (CVL/CDL), hipocampo e córtex posterior (HI/CP) e tálamo (TA)

(*) Cada amostra foi processada em duplicata. Os animais D1, D2 e D5 apresentaram convulsões no dia da eutanásia.

(-) Ausência de amostra.

(‡) 100% (amostra de hipocampo do coelho D4 que representa a maior quantidade de vírus detectada e que foi a usada como referência para o cálculo das diferentes proporções observadas nos demais locais do encéfalo).

(†) Amostras positivas para BoHV-5, porém sem significado estatístico.

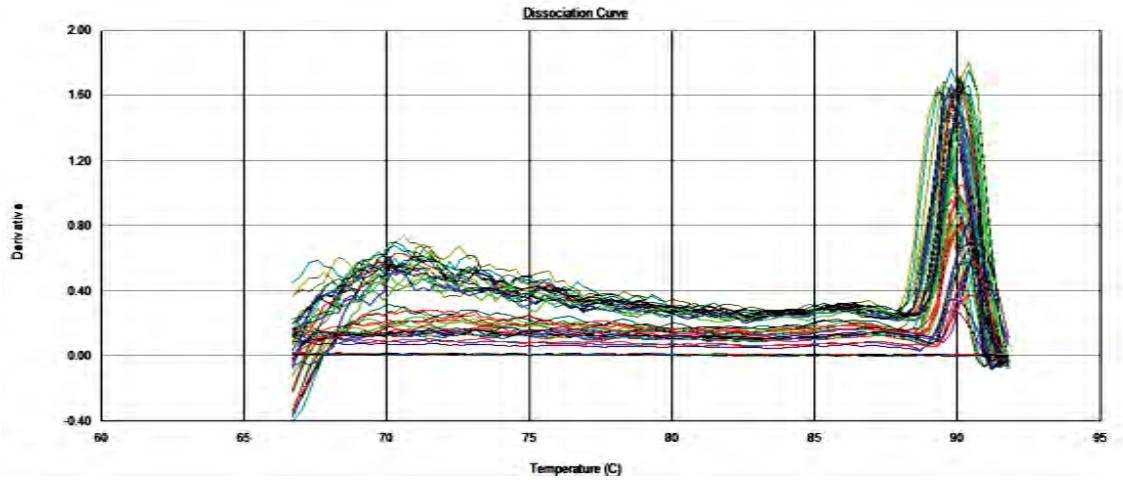


Figura 10. Observa-se picos bem definidos da qPCR mostrando os casos positivos (incluindo os controles) usando os iniciadores sugeridos por Gomes et al. (2002). Os controles foram testados como esta descrito no Anexo D.

.

7. DISCUSSÃO

Os herpesvirus bovinos 1 e 5 (BoHV-1 e BoHV-5) pertencem à subfamília Alphaherpesvirinae e são patógenos estreitamente relacionados em bovinos; o primeiro é o agente causal de infecções nos tratos respiratório e genital e raramente está associado com desordens do sistema nervoso central, entretanto o segundo, causa severa encefalite em bezerros e em coelhos logo após a infecção experimental (ABRIL et al., 2004). A literatura disponível no momento possuí poucos trabalhos direcionados à identificação das células que fazem parte do infiltrado inflamatório nos casos de encefalite herpética bovina (causada pelo BoHV-5) e este é o primeiro que compara essa resposta inflamatória com as quantidades de vírus presentes no encéfalo de animais experimentalmente infectados com o BoHV-5. Estudos realizados no Laboratório de neuropatologia da FCAV-UNESP tem permitido aprofundar o conhecimento da resposta celular do SNC ante uma injúria viral. VASCONCELOS, (2003) infectando experimentalmente camundongos com o vírus da estomatite vesicular (VEV) demonstrou que este vírus causa lesão direta nos neurônios. Além disso, evidenciou astrocitose e expressão de moléculas de adesão sugerindo uma interação entre as células residentes do SNC frente a um estímulo viral. Em um modelo similar, JARDIM (2003) evidenciou, a presença de quimiocinas no SNC de camundongos, as quais demonstraram ter efeito pró-inflamatório nos animais infectados. Mais tarde, PEDRAZA et al. (2008) descreveram a resposta inflamatória no cérebro de bovinos naturalmente infectados pelo BoHV-5 demonstrando uma intensa resposta astrocitária e a maior participação dos linfócitos T no infiltrado mononuclear dos manguitos perivasculares. A quantificação viral e a imuno-localização do vírus no encéfalo dos coelhos usados na presente pesquisa foi a principal diferença na descrição da neuroinflamação causada pelo BoHV-5 quando comparado com o trabalho feito por PEDRAZA et al. (2008), descrevendo a neuroinflamação em bovinos naturalmente infectados pelo mesmo vírus. No estudo feito com bovinos, não se tinha diferentes regiões do encéfalo disponíveis para efetuar uma comparação, deixando como hipótese para outra pesquisa a possibilidade de evidenciar a rota seguida pelo vírus na infecção.

Na presente pesquisa, na coloração de H&E foram observadas lesões só no coelho D4 e além disso limitadas a algumas regiões do encéfalo, no entanto, foram sugestivas da meningoencefalite não supurativa que caracteriza à encefalite herpética. Um foco principal de malacia no hipocampo do coelho D4 permitiu a visualização de neurônios necróticos acompanhados de outras células que na marcação imuno-histoquímica foi possível determinar como linfócitos T, astrócitos e células gitter o que corrobora a relação direta entre o dano tecidual, a presencia do BoHV-5 (cuja marcação aparece positiva em neurônios e astrócitos da mesma área) e a resposta inflamatória contra o vírus. Não foram observados corpúsculos de inclusão intranucleares eosinofílicos em astrócitos ou neurônios, fato que não foi muito determinante, devido a que mesmo em bovinos com infecção natural ou experimental, são difíceis de acharem. As inclusões intranucleares são úteis no diagnostico diferencial com o vírus da raiva, onde se sabe, que as inclusões eosinofilícas são intracitoplasmáticas e denominam-se corpúsculos de Negri, cuja localização mais frequente em bovinos é nos neurônios de Purkinje do cerebelo, embora possam estar nos neurônios de outras regiões do encéfalo (LEMOS, 2005, RIET-CORREA et al., 1989; WEIBLEN et al., 1989). Uma possível explicação para a carência de lesões histopatológicas pode estar relacionada com a quantidade de vírus achada 20 dias p.i., que variou muito entre as amostras, sendo que a maioria não tinha uma quantidade adequada do mesmo, quando comparadas com o hipocampo do coelho D4.

Na imuno-histoquímica, as reações feitas nos encéfalos para detectar células inflamatórias e partículas do BoHV-5 permitiram a sua clara visualização no caso de maior quantidade viral, mas, a imunodetecção das mesmas nas diferentes regiões dos encéfalos deixaram ver marcações inespecíficas que aumentaram a coloração de fundo das lâminas. Isso pode ser atribuído a uma falta de bloqueio da biotina endógena uma vez que foi usado um sistema de detecção que usa esta proteína na sua reação, o que nos permite sugerir a realização destas imuno-histoquímicas com sistemas mais modernos de detecção que usam polímeros que evitam reações inespecíficas com o tecido analisado. Testes prévios usando tecidos de outras espécies diferentes dos

coelhos, com os mesmos reagentes e protocolo permitiram uma clara visualização (sem coloração de fundo) dos linfócitos, macrófagos e astrócitos em linfonodos e encéfalo de caninos e bovinos e das partículas do BoHV-5 em encéfalo bovino. Na produção de anticorpos contra os vírus são usadas várias espécies de animais incluindo coelhos, e nesses casos poder-se-ia supor a existência de reações cruzadas entre as proteínas teciduais e os reagentes originados nesta espécie animal como causa da coloração inespecífica de fundo, no entanto, os anticorpos monoclonais usados neste estudo contra a gC do BoHV-5 (clone-2F9) foram produzidos pela imunização de camundongos. A imuno-histoquímica feita nos controles bovinos permitiu observar uma reação muito “limpa” deixando dúvidas sobre uma possível reação cruzada por moléculas compartilhadas entre coelhos e camundongos.

A respeito da resposta inflamatória observada no HI/CP e CA dos animais que fizeram parte deste estudo, foi vista uma proporção similar à descrita no encéfalo de bovinos naturalmente infectados, relatada por PEDRAZA et al. (2008), onde os linfócitos T sempre estiveram presentes em elevado numero na infiltração, seguidos pelos linfócitos B; os macrófagos e os astrócitos.

Grande parte dos estudos sobre a patogênese do BoHV-5 realizados até agora foram direcionados a dois aspectos fundamentais: os fatores específicos do agente e a resposta do hospedeiro ante a agressão viral. No primeiro aspecto tem sido bem explorados os mecanismos moleculares utilizados pelo vírus para ingressar na célula hospedeira, levando em conta, as características do envelope viral com suas 10 glicoproteínas (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, gM), além de outras moléculas (as proteínas US9, BICP0, BICP4 e BICP22), envolvidas em complexos mecanismos de ingresso do vírus à célula, assim como a transcrição, replicação e latência do mesmo no hospedeiro (CHOWDHURY et al., 2002; SILVA et al., 2009). Também a respeito dos fatores específicos do agente, recentemente foi publicado um trabalho que visou elucidar os mecanismos pelos quais a barreira hematoencefálica é danificada (através da interação entre as metaloproteinases de matriz MMP-2 e MMP-9 com as junções e a proteína caveoline-1), o que traz como consequência o fácil ingresso e multiplicação do BoHV-5 nas células nervosas do hospedeiro (CARDOSO et al., 2010). Já falando do

segundo aspecto, a resposta do hospedeiro frente à agressão viral, uma das pesquisas mais importantes revelou que camundongos carentes de receptor para o interferon (INF) α e β, tiveram incapacidade para produzir linfócitos T e B e sucumbiram à doença neurológica, morrendo após da infecção pelo BoHV-5. Estas observações tornam possível concluir que o INF (α e β) teve efeito protetor uma vez que os animais do grupo controle controlaram a infecção e até sobreviverem (ABRIL et al., 2004). No presente trabalho, os resultados confirmam que as células mais envolvidas na resposta inflamatória na encefalite herpética são os linfócitos T, coincidindo com o observado em bovinos naturalmente infetados com o mesmo vírus, indicando sua importância na defesa de encéfalo nos animais afetados pelo BoHV-5 (PEDRAZA et al., 2008).

É importante desenvolver pesquisas direcionadas ao esclarecimento do papel destas células na defesa do organismo contra os herpesvirus que afetam o sistema nervoso central. Até o momento, sabe-se que a apresentação de antígeno para os linfócitos implica o processamento do antígeno por parte das células apresentadoras do mesmo e a sua expressão nos receptores de superfície dos linfócitos. Estes mecanismos são diferentes para as células B e T, sendo que os primeiros só requerem de uma união apropriada do epítopo com a região variável do anticorpo, já os linfócitos T reconhecem o antígeno por meio de uma molécula de complexo maior de histocompatibilidade (GERSHWIN, et al., 1995). A respeito dos linfócitos B no encéfalo dos coelhos experimentalmente infetados com o BoHV-5, eles estiveram discretamente presentes, talvez pelo caráter agudo da doença (neste experimento não foram inclusos animais com reativação viral, e dizer, animais recuperados da infecção e submetidos à dexametasona como tratamento imunodepressor) mas coincidindo com os achados de PEDRAZA et al. (2008) na sua descrição da neuroinflamação natural em bovinos afetados pelo mesmo vírus, conclui-se que a resposta imune predominante ocorre com as células T e que a resposta imune humoral tem uma participação menor na reação. Em pessoas infectadas pelo herpesvirus humano 6 (HHV-6), que foram inclusas num estudo para detectar a união do vírus a receptores em diferentes linhagens celulares, constatou-se que a máxima união foi detectada nos linfócitos T, sugerindo que componentes da proteína da membrana celular dessas células desempenham um papel

essencial na ligação e infecção do HHV-6 e que a interação do vírus e o receptor pode ser uma chave importante para evitar o ingresso do agente no hospedeiro (CONTI et al., 2000).

O entendimento da resposta celular envolvida em animais afetados pela encefalite herpética é fundamental para planejar programas de controle da infecção, como tem sido sugerido para bovinos nos que se propõe o uso de vacinas contra BoHV-1 (TEXEIRA, et al., 1998; HALFEN et al., 2000), sem esse entendimento é arriscado propor grandes programas de controle do BoHV-5 nas pecuárias de corte.

Os macrófagos como células apresentadoras de antígeno são capazes de processá-lo e expressar moléculas do complexo maior de histocompatibilidade classe II na superfície da sua membrana, e são ativados por citocinas dependentes dos linfócitos T (GERSHWIN et al., 1995). Na encefalite herpética dos bovinos tem sido relatada com frequência a participação de macrófagos denominados células gitter observados em áreas de malacia, o é uma característica neste tipo de reação inflamatória (RIET-CORREA et al., 1989), e sua função e remover grandes quantidade de lipídeos característicos do tecido nervoso, posteriormente elas desaparecem lentamente (JUBB et al., 1993; JONES et al., 1997).

A utilização do termo “polioencefalomalacia” tem gerado confusão, uma vez que este pode ser utilizado com dois significados: o primeiro indicando lesão de necrose laminar do córtex cerebral que ocorre em diversas doenças, incluindo intoxicação por cloreto de sódio e síndrome de privação de água em suínos e bovinos, envenenamento por chumbo em bovinos, encefalite herpética em bovinos, envenenamento por cianeto em várias espécies e intoxicação por enxofre em bovinos e ovinos; o segundo, para descrever uma doença neurológica de distribuição mundial causada por distúrbios no metabolismo da tiamina, que apresenta também necrose laminar do córtex cerebral (LEMOS 2005; SANT’ANA & BARROS, 2010). No presente estudo os macrófagos estiveram acompanhando áreas de malacia no único animal que apresentou esta condição, mas nos casos restantes, provavelmente apareceriam se houvesse uma reação inflamatória maior.

As células gitter provavelmente tem um papel importante como células

apresentadoras de antígeno e também no processo de fagocitose de células afetadas pelas partículas virais (GERSHWIN et al., 1995). Estudos feitos em camundongos com herpesvirus humanos tem revelado que de forma excepcional os herpes simplex 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2) causam meningoencefalite, com células inflamatórias perivasculares, com muitas áreas de necrose focal e necrose neuronal seletiva com neuronofagia (WALEV et al., 1995). Por outro lado, em pacientes imunodeprimidos, o herpes zoster (Varicella-Zoster Vírus) pode ocasionar encefalite com desmielinização e necrose, além disso, corpúsculos de inclusão podem ser encontrados nos neurônios e células da glia (GIROLAMI et al., 1994).

No presente estudo, no que tange à encefalomalacia, não foi um achado frequente e tampouco contundente, em contraste com o reportado para bovinos afetados natural ou experimentalmente. Embora, o motivo pelo qual apresenta-se este tipo de lesão no SNC de bovinos afetados pelo BoHV-5 não é conhecido, mesmo que tenham sido estudadas outras causas da polioencefalomalacia como reportado por SANT'ANA & BARROS, (2010), que relatam como regra de ouro para diferenciar a PEM convencional da PEM produzida pelo BoHV-5 a consideração da quantidade de infiltrado inflamatório que no caso da encefalite herpética é maior. Os macrófagos são capazes de fagocitar e matar alguns agentes infecciosos; sabe-se que eles produzem citocinas pro-inflamatórias como TNF, IL-1, IL-2, IL-8 e radicais de oxigênio para facilitar essa tarefa (BADHE et al., 2007; GUO et al., 2011). Como tem sido sugerido, é preciso estabelecer se a malacia deve-se a um efeito citopático direto do vírus sobre neurônios e células gliais; se é causada pela ação de radicais livres ou outros produtos celulares de macrófagos e linfócitos que interagem na inflamação do cérebro ou se trata-se de um mecanismo meramente vascular que leva a hipoxia severa. É provável que na primeira instância as células infetadas pelo BoHV-5 emitam sinais que facilitem a sua fagocitose por parte dos macrófagos ou outras células apresentadoras de antígeno e numa etapa posterior à mesma reação inflamatória termine destruindo o parênquima nervoso. Recentemente DEZENGRINI et al. (2009) descreveram que o radical oxido nítrico (ON) e muito importante na resposta imune contra o BoHV-5; sendo transformado pela enzima oxido nítrico sintetase (iNOS) a partir da L-arginina, mas que

é a ONS a que deve ser melhor estudada desde que tem três iso-formas, uma endotelial, outra neuronal e uma denominada induzível, que finalmente esta envolvida nos efeitos tóxicos sobre a célula logo após a sua ativação pela IL-1β e o INF-γ. Elucidar esses mecanismos pelos quais os radicais livres atuam seria fundamental para instaurar um protocolo de tratamento que poderia incluir o uso de anti-inflamatórios e medicamentos como o dimetil sulfóxido (DMSO) para impedir ou controlar a ação dos radicais livres.

Outras células que também podem apresentar antígenos são os astrócitos que são células gliais das quais sabe-se que são capazes de expressar produtos do complexo maior de histocompatibilidade classe II (logo após de serem estimuladas com o interferon gama INF-γ) como sabe-se também que citocinas pro-inflamatórias como INF-γ o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e a interleucina 1 (IL-1) são capazes de estimular a expressão de moléculas de adesão (ICAM-1, LFA- , VCAM e VLA) sobre eles (KETTENMANN & RANSOM, 1995). No presente estudo foi descrita a presença de astrócitos sem diferença aparente entre os diâmetros destas células quando comparados os animais dos grupos experimental e controle, ou seja, não foi possível verificar a condição de reatividade astrocitária desde que as suas características morfológicas foram similares em todos os encéfalos, talvez, esta condição tenha a ver com a quantidade de vírus ou a virulência da cepa viral ou a resposta do hospedeiro, mas de qualquer jeito não houve diferença significativa entre eles. Diferentemente, PEDRAZA et al. (2008), em um trabalho feito com bovinos naturalmente infetados com o BoHV-5, descreveram a presença de dois tipos de astrócitos denominados reativos e não reativos. MACHADO & ALESSI (1997) observaram diferentes graus de reatividade dos astrócitos no hipocampo e o giro dentato em cérebro de bovinos naturalmente infectados com o vírus da raiva, quando comparados com bovinos normais. Os astrócitos têm funções vantajosas e desvantajosas para o hospedeiro, porque interagem com os linfócitos T, sendo que, apresentam antígenos para os fagócitos e depois os linfócitos secretam citocinas pró-inflamatórias e estimulam a expressão de moléculas de adesão que favorecem a proliferação glial e a fibrose; da mesma forma, podem ter atividade mediadora para formação de edema tóxico, inflamação, liberação

de citotoxinas e formação de cicatrizes que impedem a regeneração axonal (SOFRONIEW, 2005). Tanto os linfócitos como os astrócitos foram células abundantes nos casos analisados na presente pesquisa, coincidência que permite supor a existência de uma cooperação celular entre elas como tem sido relatado para humanos (CONRADY et al., 2010).

Os astrócitos são estimulados ante uma injúria celular, são as células gliais mais abundantes no cérebro dos mamíferos e sua função e suportar e reparar os neurônios danificados (PETERSON & REMINGTON, 2000); além disso, participam no transporte das células inflamatórias para o interior do sistema nervoso central através da barreira hematoencefálica. Esta barreira é danificada por uma combinação de alterações hemodinâmicas, estruturais e moleculares na injúria encefálica aguda (NAG et al., 2011). Em bezerros infectados com o BoHV-5, foi detectada a proteína antioxidante 1 (AOP-1) no neurópilo e em diferentes tipos de células do cérebro, tais como neurônios, células endoteliais e células gliais. No mesmo estudo, a MMP-9 foi detectada no parênquima na área cortical do córtex frontal, com um padrão de marcação da MMP-9 muito semelhante ao de AOP-1, contudo, os autores afirmam que a participação de destas moléculas no estresse oxidativo, a integridade da barreira hematoencefálica e sinapses ainda precisa ser totalmente elucidada (CARDOSO et al., 2010).

Além das células inflamatórias no encéfalo dos coelhos foram detectadas as partículas virais do BoHV-5, as quais coincidiram no hipotálamo do coelho D4 com os demais achados histológicos e imuno-histoquímicos. Alguns trabalhos procuraram evidenciar, utilizando-se a imuno-histoquímica, partículas do BoHV-5 em encéfalo de bovinos e coelhos, mas todos coincidiram na marcação do citoplasma do neurônio (às vezes o neurônio completo) em lugar de marcar os corpúsculos bem definidos só no núcleo celular (VOGEL et al., 2003; OLDONI, et al., 2004; HÜBNER et al., 2005; FLORES et al., 2009). Da mesma forma, nesta pesquisa foram vistos agregados pequenos no citoplasma de neurônios e de alguns astrócitos o que finalmente permite supor que as partículas virais podem ser detectadas em quaisquer fases desde o ingresso do vírus na célula até sua saída. Sugere-se a utilização de marcação simples com fluorescência e marcação de DAPI para evidenciar os núcleos dos neurônios e

astrócitos, desta forma, no momento de fazer a fusão dos canais no microscópio de fluorescência convencional, poder-se-ia determinar as diferentes localizações do vírus nas células.

No presente estudo, a detecção pela imuno-histoquímica das células inflamatórias e o BoHV-5 em diferentes regiões do encéfalo de coelhos, foi comparada com a quantificação relativa do BoHV-5 pela qPCR. Essa quantificação viral coincidiu de maneira diretamente proporcional com os achados histoquímicos e imuno-histoquímicos na detecção do vírus, isto é, no encéfalo do coelho com a maior quantidade de vírus foi possível detectar o BoHV-5 pela imuno-histoquímica e algumas regiões do encéfalo apresentaram lesões histopatológicas; e naqueles casos onde a quantidade do vírus foi muito baixa não foi possível a detecção da glicoproteína viral e tampouco apresentaram lesões teciduais compatíveis com a neuroinflamação. Isto concorda com o relatado por CAGNINI, (2011), sobre a morte de dois bovinos que faziam parte de um grupo de seis animais experimentalmente infectados com o BoHV-5, que foram os únicos que mostraram sintomatologia clínica (mais acentuada no animal 1 que foi sacrificado devido à severidade do quadro neurológico, no entanto, o animal 2 desenvolveu quadro de morte súbita) e dos quais foi possível detectar mediante a PCR seu DNA em várias regiões do encéfalo (14/18 no bovino 1 e 11/18 no bovino 2), enquanto que os quatro animais restantes não apresentaram sinais clínicos neurológicos e também não, lesões histopatológicas significativas, sendo positivos pela PCR só em alguns regiões encefálicas (3/18 em três casos e 4/18 no caso restante).

A PCR em tempo real (qPCR) tem revolucionado a trajetória dos laboratórios de microbiologia clínica no diagnóstico de patógenos de humanos (ESPY et al., 2006). Devido a que ainda não tinham sido feitos trabalhos utilizando esta técnica (PCR em tempo real) para detectar o BoHV-5, foi preciso fazer na primeira instância um estudo piloto no qual, foram testadas duas sequências de iniciadores para detectar BoHV-5. Além dos iniciadores sugeridos por GOMES et al. (2002), foram também testados os iniciadores (PF 5′-GTGGAGCGCCGCTTCGC-3′ e PR 5′-TATCGCGGAGAGCAGGCG-3′) sugeridos por CAMPOS et al. (2009). Um total de 22 amostras de DNA extraído de encéfalo de bovinos, dos quais cinco já tinham resultados positivos para BoHV-5 por

nested PCR (segundo PEDRAZA et al., 2010), foram analisadas na padronização da qPCR. Os iniciadores sugeridos por CAMPOS et al. (2009), não apresentaram boa performance obtendo vários picos inespecíficos para detecção do vírus e por isso foram descartados para a sua utilização neste trabalho, no entanto, os iniciadores propostos por GOMES, et al. (2002) resultaram em picos bem definidos na sua positividade mostrando quatro casos positivos (incluídos dois controles). A comparação feita entre os dois tipos de iniciadores pode ser observada na figura 6 (Anexo D). A diferença do desempenho entre os iniciadores pode estar relacionada com vários fatores como por exemplo, condições do mix de amplificação, qualidade da extração ou mesmo a própria característica do iniciador. Outra diferença encontrada foi entre os testes, já que das amostras processadas pela qPCR, duas amostras resultaram positivas para BoHV-5, enquanto, cinco tinham sido positivas para o mesmo vírus pela nested PCR realizado por PEDRAZA et al. (2010). Esta diferença pode acontecer devido a vários fatores, em primeiro lugar, pela maior sensibilidade da nested PCR, quando comparada com a qPCR, lembrando que no trabalho de PEDRAZA et al. (2010), o primeiro produto da nested PCR não mostrou resultados positivos. Só no segundo produto da amplificação foram detectados os cinco casos. Outro fator importante de analisar é que o presente trabalho foi realizado a partir de amostras incluídas em parafina, e devido ao processo de fixação (com formol 10%) o DNA pode ter sofrido danos que o tenham prejudicado para a amplificação na qPCR. Para encerrar esta parte da discussão e com base nos dois resultados positivos pela qPCR em uma única amplificação (que permitem supor uma boa sensibilidade do teste), poderia se levantar a hipótese no sentido que usando uma nested-q-PCR resultariam em mais casos positivos dos que foram relatados por PEDRAZA et al. (2010) usando nested PCR.

No presente caso, a qPCR permitiu quantificar o BoHV-5 em diferentes partes do encéfalo dos coelhos experimentalmente infetados, mas a qPCR pode ser usada também como um teste qualitativo para detectar casos positivos de encefalite herpética em bovinos. Como já foi demonstrado, pode-se recuperar para diagnóstico material conservado em blocos de parafina que tenham sido arquivados sem diagnóstico específico e dessa forma aportar informação valiosa no momento de levantar mapas

epidemiológicos das diferentes doenças que atingem o encéfalo dos bovinos (PEDRAZA et al., 2011b).

DEZENGRINI et al. (2009) na UFSM em Santa Maria, RG, usaram coelhos em dois experimentos para comparar as quantidades de BoHV-5 em diferentes regiões do encéfalo (BO/CO, CA, CVL/CDL, HI/CP e TA) e a produção de óxido nítrico (ON). No primeiro experimento foi possível isolar o BoHV-5 vírus em todas as regiões encefálicas entre os dias 8 e 10 após a infecção, no entanto, no segundo experimento só foi possível isolar o agente nas regiões BO/CO, CA, CVL/CDL. Nos dois experimentos a produção de ON foi maior nos animais infectados com o BoHV-5 sendo diretamente proporcional à quantidade viral mas não necessariamente acompanhada de alterações histológicas. LEE et al. (1999), na Universidade de Kansas nos Estados Unidos, localizaram o BoHV-5 em seis, de dez e seis coelhos inoculados experimentalmente. Só em três casos foi possível o isolamento viral nas regiões BO, CA e CO, no entanto, nos outros três coelhos foi detectado o vírus usando a técnica da imuno-histoquímica nas regiões BO, HI/CP, amígdala e gânglio trigêmeo. Nos restantes dez animais mesmo nos que morreram em até 12 dias após a inoculação viral não foi possível a detecção do agente; além disso, nenhum dos dez e seis animais apresentou lesões histopatológicas significativas nas regiões estudadas do encéfalo. A necrose neuronal e os infiltrados perivasculares linfocitários foram achadas no BO de alguns animais (dados não mostrados).

Em suma, em todas as regiões do encéfalo de todos os coelhos do grupo experimental foi possível detectar o BoHV-5 e na quantificação viral foi estabelecido que o HI/CP do animal D4 apresentou a maior quantidade do agente, sendo que o CA do mesmo animal era a segunda maior região com apenas 14,5% (em média da duplicata) da quantidade viral encontrada no HI/CP e as restantes 44 amostras (de 48 testadas) tinham menos do 5,19% dessa quantidade. é possível suspeitar que o sistema imunitário do hospedeiro fez os animais reagir de maneira diferente ante a mesma quantidade do inóculo viral, da mesma forma como acontece em camundongos carentes do sistema interferon alfa/beta (INF) que frente a um desafio com BoHV-5 sucumbiram ante a doença neurológica quando comparados com camundongos que

tinham o sistema imune normal (ABRIL et al., 2004). Na presente pesquisa, alguns coelhos estiveram não mais que 20 dias doentes e não foram observadas lesões histológicas exceto no coelho D4, o que concorda com resultados obtidos em coelhos infectados experimentalmente com o BoHV-5 que desenvolvem doença precoce (5 a 6 dias p.i.) e de curta duração (12h) onde as alterações histológicas no encéfalo, foram leves ou mesmo inexistentes (FLORES et al., 2009). A ausência de lesões histopatológicas na maioria dos casos sugeriu que as quantidades virais não foram suficientes para induzir alterações severas, e poderiam ser uma explicação para a ausência de marcação do BoHV-5 na imuno-histoquímica feita em amostras diferentes do HI/CP do animal D4.

8. CONCLUSÕES

A resposta inflamatória induzida por vírus em coelhos experimentalmente infectados com BoHV-5, caracteriza-se pelo aumento de lesões microscópicas que estão diretamente relacionadas à ativação e replicação do vírus em neurônios e astrócitos, com intensa participação dos linfócitos na neuroinflamação.

A fase aguda da infecção com o BoHV-5 tem um padrão para o dano tecidual caracterizado por astrócitos reativos para GFAP coincidindo com a imunomarcação para o BoHV-5 e acompanhados de linfócitos CD_3 positivos.

As áreas de malacia estão caracterizadas pela presença de células gitter e coincidem com a maior quantidade detectada do BoHV-5, sendo importante elaborar novas pesquisas direcionadas a estabelecer se seus produtos provavelmente estejam envolvidos no dano tecidual característico neste tipo de lesão.

A utilização das técnicas da PCR quantitativa (qPCR) e de imuno-histoquímica em tecido fixados em formol e incluídos em parafina são alternativas importantes para a caracterização de casos de meningoencefalite por BoHV-5. Essas técnicas podem ser utilizadas em material de arquivo para a confirmação de casos de infecção por BoHV-5 ou diferenciação com outras doenças similares, o que, por sua vez, contribui para o estudo epidemiológico das encefalites virais dos bovinos.

9. REFERÊNCIAS

ABRIL, C.; ENGELS, M.; LIMAN, N.; HILBE, M.; ALBINI, S.; FRANCHINI, M.; SUTER, M.; ACKERMANN, M. Both Viral and Host Factors Contribute to Neurovirulence of Bovine Herpesviruses 1 and 5 in Interferon Receptor-Deficient Mice. **Journal of Virology**, v.78, n.7, p.3644–3653, 2004.

ALEGRE, M.; NANNI, M.; FONDEVILA, N. Development of a multiplex polimerase chain reaction for the differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5. **Journal Veterinary Medicine B**, v.48, n.8, p.613–621, 2001.

ANDRADE, G.I.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F. **Diagnóstico Sorológico de Herpesvírus bovino 1 e 5**: **Proteínas Virais, Recombinantes e Peptídeos Sintéticos em suportes sólidos comerciais e modificados por engenharia de superfície**. 2006. 134 p. Tese (Doutorado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

BADHE, P.; THORAT, J.; DIYORA, B.D.; MAMIDANNA, R.; SAYAL, P.; BADHE, S.; SHARMA, A.K. Neuroprotective effects of vitamin E in cold induced cerebral injury in guinea pigs. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.45, p.180-184, 2007.

BELTRÃO, N.F.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; SILVA, A.M.; ROEHE, P.M.; IRIGOYEN, L.F. Infecção e enfermidade neurológica pelo herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5): coelhos como modelo experimental. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v.20, n.4, p.144–150, 2000.

CAGNINI, D.Q. **Avaliação histopatológica, imunoistoquímica e detecção molecular do DNA viral no sistema nervoso central de bovinos inoculados experimentalmente com o herpesvirus bovino 5**. 2011. 107p. Dissertação

(Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, 2011.

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

CARDOSO, T.C.; FERRARI, H.F.; GARCIA, A.F.; BREGANO, L.C.; ANDRADE, A.L.; NOGUEIRA, A.H.C. Immunohistochemical approach to the pathogenesis of clinical cases of bovine herpesvirus type 5 infections. **Diagnostic Pathology**, v.5, p.1–8, 2010.

CASCIO**,** K.E.; BELKNAP, E.B.; SCHULTHEISS, P.C.; AMES, A.D.; COLLINS, J.K. Encephalitis induced by bovine herpesvirus 5 and protection by prior vaccination or infection with bovine herpesvirus 1. **Journal of Veterinary Diagnoses Investigation**, v.11, p.13 –139, 1999.

CHOWDHURY, S.I.; LEE, B.J.; MOSIER, D.; SUR, J.H.; OSORIO, F.A.; KENNEDY G; WEISS, M.L. Neuropathology of Bovine Herpesvirus type 5 (BHV-5) Meningoencephalitis in a rabbit seizure model. **Journal of Comparative Pathology**, v.117, p. 295–310, 1997.

CHOWDHURY, S.I.; LEE, B.J.; OZKUL, A.; WEISS, M.L. Bovine Herpesvírus 5 Glycoprotein E is important for Neuroinvasiveness and Neurovirulence in the Olfactory Pathway of the Rabbit. **Journal of Virology**, v.74, n.5. p.2094–2106, 2000.

CHOWDHURY, S.I.; ONDERCI, M.P.; BHATTACHARJEE, S.; AL-MUBARAK, A.; WEISS, M.L.; ZHOU, Y. Bovine Herpesvirus 5 (BHV-5) Us9 Is Essential for BHV-5 Neuropathogenesis. **Journal of Virology**, v.76, n.8. p.3839–3851, 2002.

COLODEL, E.M.; NAKAZATO, L.; WEIBLEN, R.; MELLO, R.M.; SILVA, R.R.P.; SOUZA, M.A.; OLIVEIRA FILHO, J.A.; CARON, L. Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por herpesvírus bovino no Estado de Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural Santa Maria**, v.32, n.2, p.293–298, 2002.

CONRADY C.D.; DREVETS D.A.; CARR D.J.J. Herpes simplex type 1 (HSV-1) infection of the nervous system: Is an immune response a good thing? **Journal of Neuroimmunology**, v.220, p1–9, 2010.

CONTI, C.; CIRONE, M.; SGRO, R.; ALTIERI, F.; ZOMPETTA, C.; FAGGIONI, A. Early interactions of human herpesvirus 6 with lymphoid cells: role of membrane protein components and glycosaminoglycans in virus binding. **Journal of Medical Virology**, v.62, n. 4, p.487–497, 2000.

DELHON, G.; MORAES, Z.L.; AFONSO, C.L.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; KUTISH, G.F.; ROCK, D.L. Genome of Bovine Herpesvirus 5. **Journal of Virology**, v.77, p.10339–10347, 2003.

DEL MEDICO ZAJAC, M.P.; LADELFA, M.F.; KOTSIAS F.; MUYLKENS B.; THIRY, J.; THIRY, E.; ROMERA S.A. Biology of bovine herpesvirus 5. **The Veterinary Journal**, v.184, n.2, p.138–145, 2010.

DEZENGRINI, R.; WEISS, M.; TORRES, F.D.; OLIVEIRA, M.S.; FURIAN, F.; MELLO, C.F.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Bovine herpesvirus 5 induces an overproduction of nitric oxide in the brain of rabbits that correlates with virus dissemination and precedes the development of neurological signs. **Journal of NeuroVirology**, v.15, p.153–163, 2009.

ELIAS, F.; SCHILD, A.L.; RIET-CORREA, F. Meningoencefalite e encefalomalacia por herpesvirus bovino 5: distribuição das lesões no sistema nervoso central de bovinos naturalmente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.24, p.123–131, 2004.

ESPY, M.J.; UHL, J.R.; SLOAN, L.M.; BUCKWALTER, S.P.; JONES, M.F.; VETTER, E.A.; YAO, J.D.C.; WENGENACK, N.L.; ROSENBLATT, J.E.; COCKERILL, F.R.; SMITH, T.F. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, n.1, p.165–256, 2006.

FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fundamental Virology.** Third edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1996. p.3087.

FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F.S.F.; DEZENGRINI, R.; ALMEIDA, S.R.; SPILKI, F.R.; ROEHE, P.M. Neuropatogênese experimental da infecção pelo herpesvírus bovino tipo 5 em coelhos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, p.1–16, 2009.

FREITAS, D.A.; ORTEGA, L.S.; FERNÁNDEZ, R.A.; TRINDADE, G. Characterization of field Bovine Herpesvirus samples using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). **Journal of Virological Methods,** v.140, p.200–205, 2007.

GABEV, E.; TOBLER, K.; ABRIL, C., HILBE, M; SENN, C; FRANCHINI, M; CAMPADELLI-FIUME, G; FRAEFEL, C; ACKERMANN, M. Glycoprotein D of Bovine Herpesvirus 5 (BoHV-5) confers an extended host range to BoHV-1 but does not contribute to invasion of the brain. **Journal of Virology**, v.84, p.583–5593, 2010.

GERSHWIN, L.J.; KRAKOWKA, S.; OLSEN, R.G. Immune response. In: ____. **Immunology and immunopathology of domestic animals**. 2.ed. St. Louis: Mosby, 1995. p.63-67.

GILLETTE, K.; MISRA, V.; BRATANICH, A. Sequence analysis of the alpha transinducing factor of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5). **Virus Genes**, v.24, p.149–152, 2002.

GIROLAMI, U.; FROSCH, M.P.; ANTHONY, D.C. The central nervous system. In: COTRAN, R.; KUMAR, V.; ROBINS, S.; SCHOEN, F. (Ed.). **Robin's pathologic basis of disease**. 5.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994. p.1318–1323.

GOMES, L.I.; ROCHA, M.A.; COSTA, E.A.; LOBATO, Z.I.P.; MENDES, L.C.N.; BORGES, A.S.; LEITE, R.C.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F. Detecção de herpesvirus bovino 5 (BoHV-5) em bovinos do sudeste brasileiro. **Arquivos de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, p.1–4, 2002.

GOMES, L.I.; ROCHA, M.A.; SOUZA, J.G.; COSTA, E.A.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F. Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) in bull semen: amplification and sequence analysis of the Us4 gene. **Veterinary Research Communications**, v.27, p.495–504, 2003.

GUO, M.F.; YU, J.Z.; MA, C.G. Mechanisms related to neuron injury and death in cerebral hypoxic ischemia. **Folia Neuropathologica**, v.49, n.2, p.79–87, 2011.

HALFEN, D.C.; VIDOR, T.; BRAGA, F.M.; VAN DER LAAN, C.W. Immunogenicidade do Herpesvirus bovino tipo 5 (BHV-5) em vacinas inativadas de diferentes formulações. **Ciência Rural**, v.30, n.5, p.851–856, 2000.

HÜBNER, S.O.; PESCADOR, C.; CORBELLINI, L.G.; DRIEMEIER, D.; SPILKI, F.R.; ROEHE, P.M. Otimização da imunoistoquímica para detecção de herpesvirus bovino tipo 5 (BHV-5) em tecidos do sistema nervoso central fixados com formaldeído. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, p.1–6, 2005.

JARDIM, L.S. **Quimiocinas MIP-1Alpha, MIP-1Beta e rantes na encefalite experimental induzida pelo vírus da estomatite vesicular em camundongos**. 2003. 61p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2003.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Veterinary pathology**. 6. Ed. Philadelphia: William and Wilkins, 1997. p.794–795 .

JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. 4. Ed. San Diego: Academic Press, 1993. p.267–439 .

KAHRS, R.F. Infectious bovine rhinotracheitis an infectious vulvovaginitis. In: **Viral diseases of cattle**. 2. Ed. Ames: Iowa state University, 2001. p.159–170.

KETTENMANN, H.; RANSOM, B.R. **Neuroglia**. Oxford: Oxford University Press, 1995. p.685–699.

LEE, B.J.; WEISS, M.L.; MOSIER, D.; CHOWDHURY, S.I. Spread of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in the rabbit brain after intranasal inoculation. **Journal of Neurovirology**, v.5 p.474–484, 1999.

LEMOS, R.A.A.; BARROS, N.; BRUM, K.B. **Enfermidades de interesse econômico em bovinos de corte, perguntas e respostas**. Campo Grande: Editora Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2002. p.292.

LEMOS, R.A.A. **Enfermidades do sistema nervoso de bovinos de corte das regiões centro-oeste e sudeste do Brasil**. 2005. 149p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2005.

MACHADO, G.; ALESSI, A.C. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactive astrocytes in the NCS of normal and rabies-infected adult cattle. I. Hippocampus and dentate gyrus. **Brazilian journal of Veterinary Research of Animal Science**, v.34, n.6, p.345–348, 1997.

MEYER, G.; LEMAIRE, M; LYAKU, J; PASTORET, P.P; THIRY, E. Establishment of a rabbit model for bovine herpesvírus type 5 neurological acute infection. **Veterinary Microbiology,** v.51, p.27–40, 1996.

MEYER, G.; BARE, O.; THIRY, E. Identification and characterization of bovine herpesvírus type 5 glycoprotein H gene and gene products. **Journal of General Virology**, v.80, p.2849–2859, 1999.

NAG S. KAPADIA, A.; STEWART, D.J. Review: Molecular pathogenesis of blood–brain barrier breakdown in acute brain injury. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v.37, p.3–23, 2011.

OLDONI, I.; WEIBLE, R.; INKELMANN, M.A.; FLORES, E.F. Production and characterization of monoclonal antibodies to a brazilian bovine herpesvirus type 5. **Brazilian Journal of Medial and Biological Research**, v.37, p.213–221. 2004.

OLIVEIRA FILHO, J.P.; BADIAL, P.R.; CUNHA, P.H.J.; CRUZ, T.; ARAUJO JR, J.P.; DIVERS, T.J.; WINAND, N.J.; BORGES, A.S. Cloning, sequencing and expression analysis of the equine hepcidin gene by real-time PCR. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.135, n.1, p.34–42, 2010.

PEDRAZA, F.J.; ALESSI, A.C. Encefalitis bovina por herpesvirus bovino tipo 5 (BHV-5). Una revisión. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v.17, p.148–155, 2004.

PEDRAZA, F.J., SCHILD, A.L., ALESSI, A.C. Immunohistochemical description of encephalitis in Brazilian cattle naturally infected with bovine herpes virus type 5 (BoHV-5). **Archivos de Medicina Veterinaria** v.40, p.69–75, 2008.

PEDRAZA, F.J.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F.; ALESSI, A.C. Detection of bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine brain by nested PCR in Colombian cattle. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v.23, p.292–298, 2010.

PEDRAZA, F.J.; LOPEZ, J.P.; AVILA, J.A.; ALESSI, A.C.; FLORES, E.F. Evidencia serológica de herpesvirus bovino 5 (BoHV-5) en bovinos de la región de los Llanos orientales de Colombia. **Revista Científica FCV-LUZ**, v.21, p.16–21, 2011a.

PEDRAZA, F.J.; YAMATOGUI, R.; ALESSI, A.C.; ARAUJO, J.P. Uso de PCR en tiempo real (qPCR) para detectar Herpesvirus bovino 5 (BoHV-5) en tejido nervioso conservado en bloques de parafina. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v.24, n.3, 2011b.

PEREZ, S.E.; BRETSCHNEIDER, G.; LEUNDA, M.R.; OSORIO, E.A.; FLORES, E.F. Primary infection, latency and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. **Veterinary Pathology**, v.39, n.4, p.437–444, 2002.

PETERSON, P.K.; REMINGTON, J.S. **New concepts in the immunopathogenesis of CNS infections**. Malden, Massachusetts: Blackwell Science, 2000. p.21–51.

RIET-CORREA, F.; VIDOR, T.; SCHILD, A.L.; MENDEZ, M.C. Meningoencefalite e necrose do córtex cerebral em bovinos causados por herpesvírus bovino 1. **Pesquisa Veterinária Brasileira** v.9, p.13–16, 1989.

RISSI, D.R.; OLIVEIRA, F.N.; RECH, R.R.; PIEREZAN, F.; LEMOS, R.A.A.; BARROS, C.S. Epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões encefálicas em bovinos afetados por meningoencefalite por herpesvirus bovino-5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.26, p.123–132, 2006.

ROEHE, P.M. Atualização no diagnostico e controle de infecções por Herpesvírus Bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5. (BHV-5). **Biológico**, São Paulo. v.59, n.2. p.27–32, 1997.

ROIZMAN, B.; PELLETT, P.E. The family Herpesviridae: A brief introduction. In: KNIPE, D.M. & HOWLEY, P.M. Editors. **Fields Virology**, Fourth edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p.2381-2397.

SANCHES, A.W.; LANGOHR, I.M.; STIGGER, A.L. Doenças do sistema nervoso central em bovinos no Sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.20, p.113–118, 2000.

SANT'ANA F.J.F.; BARROS C.S. Polioencephalomalacia in ruminants in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**. v.3, n.1, p.70–79, 2010.

SALVADOR, S.C. LEMOS, R.A.A.; RIET-CORREA, F.; ROEHE, P.M.; OSORIO, A.L. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5). **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v.18, n.2, p.76–83, 1998.

SILVA, M.S.; BRUM, M.C.; LORETO, E.L.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Molecular and antigenic characterization of Brazilian bovine herpesvirus type 1 isolates recovered from the brain of cattle with neurological disease. **Virus Research**, v.129, p.191–199, 2007.

SILVA, A.D.; FRANCO, A.C.; ESTEVES, P.A.; SPILKI, F.R.; ROEHE, P.M. Experimental infection of rabbits with a recombinant bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) gI, gE and Us9-negative. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, p.913–918, 2009.

SOFRONIEW, V.S. Reactive astrocytes in neural repair and protection. **The Neuroscientist**, v.11, n.5, p.400–407. 2005.

SPILKI, F.R.; FRANCO, A.C.; ESTEVES, P.A.; TEIXEIRA, M.B.; SCHAEFER, R.; SCHMIDT, E.; LEMOS, R.A.A.; ROEHE, P.M. Bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in a calf with rabies. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.23, n.1, p.1–4, 2003.

TAKIUCHI, E.; MEDICI, K.C.; ALFIERI, A.F. Bovine herpesvirus type 1 abortions detected by a semi-nested PCR in Brazilian cattle herds. **Research in Veterinary Science**, v.79 p.85–88, 2005.

TEXEIRA, M.F.; ESTEVES, P.A.; COELHO, C.S.; DA SILVA, T.C.; OLIVEIRA, L.G. Diferenças em níveis de anticorpos neutralizantes contra Herpesvirus bovinos tipo 1 (BHV-1) e tipo 5 (BHV-5). **Pesquisa Agropecuária Gaucha**, v.4, n.1, p.61–65, 1998.

VASCONCELOS, R.O.; VARASCHIN, M.S.; WOUTERS, F. Meningoencefalite bovina por herpesvirus. **Encontro Nacional de Patologia Veterinária**, Santa Maria - RS. Anais, Santa Maria. 1993.

VASCONCELOS, R.O. **Efeito da IL-4 sobre a produção de β-quimiocinas pela glia de camundongos infectados experimentalmente pelo vírus da estomatite vesicular**. 2003. 70f. Tese (Doutorado) – Faculdade de ciências agrárias e veterinárias. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Jaboticabal, 2002.

VOGEL, F.S.F.; CARON, L.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; WINKELMANN, E.R.; MAYER, S.V.; BASTOS, R.G. Distribution of Bovine Herpesvirus Type 5 DNA in the Central Nervous Systems of Latently, Experimentally Infected Calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.10, p.4512–4520, 2003

WALEV, I.; DIENES, H.P.; BOHK, J.; PODLECH, J.; FALKE, D. Correlation of virus replication, cytokine (TNF-α and IL-1) producing cells, neuronal necrosis and inflammation after intranasal infection of mice with herpes simplex virus strains of different virulence. **Archives of Virology**, v.140, n.11, p.1957–1967, 1995.

WEIBLEN, R.; BARROS, C.S.; CANABARRO, T.F. Bovine Meningoencephalitis from IBR virus. **Veterinary Record**, v.124, p.666–667, 1989.

ZAPATA, J.C.; OSSA, J.E.; ZULUAGA, F.N. Actualización de los viejos enigmas y visión de futuro de la RIB en Colombia**. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v.15, p.155–159, 2002.

ANEXO A (Teste de Fischer)

O modelo matemático usado foi:

$$\text{SS Total} = \Sigma X^2 - \frac{(\Sigma X)^2}{n}$$

$$\text{SS Tratamento} = \Sigma \left(\frac{T_c^{\,2}}{n_c} \right) - \frac{(\Sigma X)^2}{n}$$

SS Efeito = SS Total – SS Tratamento

Onde:

X = Cada dado

n = Numero de dados = 48

T_c = Media

n_c = Repetições em cada tratamento

Substituindo:

SS Total = 20541,26 – 268,602 ^{2} / 48 = 19038,22

SS Tratamento = (3,84 ^{2} /10 + ... + 3,46 ^{2} /8) – 1503 = 5541,7

SS Efeito = 19038,22 – 5541,7 = 13496

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F
Tratamentos	5541,7	5	1108,34	3,45
Erro	13496,0	42	321,33	
Total	19037,7	47		

Interpretação:

Devido a que o valor calculado (3,45) e MAIOR que o valor critico achado na tabela de F (1,99), e descartada a hipótese nula, concluindo que os valores das medias são diferentes.

ANEXO B. Teste de T Student

O modelo matemático usado foi:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{\sigma^2_1}{n_1} + \frac{\sigma^2_2}{n_2}}}$$

$$gl = \frac{\left(\frac{\sigma^2_1}{n_1} + \frac{\sigma^2_2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{\sigma^2_1}{n_1 - 1}\right)^2}{n_1} + \frac{\left(\frac{\sigma^2_2}{n_2 - 1}\right)^2}{n_2}} - 2$$

Onde:

T = t de Student.
1 = media do grupo 1.
2 = media do grupo 2.
S^2_1 = variância 1.
S^2_2 = variância 2.
n_1 = tamanho amostra 1.
n_2 = tamanho amostra 2.
gl = graus de liberdade.

S^2_1 = variância 1.
S^2_2 = variância 2.
n_1 = tamanho amostra 1.
n_2 = tamanho amostra 2.

Procedimento:

1. Determinar a media, a variância e o tamanho da amostra de cada população no estudo.
2. Aplicar a equação T.
3. Calcular os graus de liberdade (gl) de acordo com a equação dada.
4. Comparar o valor de T calculado com os valores de T na tabela.
5. Decidir se aceita ou rejeita a hipótese nula.

ANEXO C. Mensuração dos astrócitos

Tabela 4. Valores médios dos diâmetros maior e menor, assim como da área de astrócitos medidos no hipocampo dos coelhos D4 e C1.

Hipocampo infectado			**Hipocampo controle**		
Diâmetro Maior	Diâmetro Menor	Área	Diâmetro Maior	Diâmetro Menor	Área
8,6	5,6	38,3	5,0	4,6	18,2
7,3	5,1	28,9	6,3	5,1	24,8
8,6	4,2	28,2	6,3	5,6	27,5
8,3	5,4	35,0	6,2	5,4	26,2
7,1	4,6	25,4	6,3	4,2	20,8
5,8	6,1	27,4	6,6	4,4	22,7
8,4	5,1	33,7	7,2	4,3	24,5
7,2	4,8	27,1	8,0	4,4	27,7
8,7	4,1	28,2	7,7	4,8	29,2
8,3	5,8	38,0	6,0	5,9	27,6
6,8	5,1	27,2	8,0	5,1	32,3
5,9	4,9	22,8	5,9	4,5	20,7
8,3	6,0	39,2	7,3	3,5	20,3
7,2	5,8	32,8	6,9	4,4	23,6
8,5	5,0	33,0	8,4	5,4	35,4
8,1	4,0	25,5	7,3	4,1	23,8
7,2	5,8	33,1	6,4	5,2	25,8
6,0	5,1	23,9	7,7	5,6	33,9
7,7	5,9	35,7	5,9	4,1	19,3
6,5	5,0	25,8	7,4	5,1	29,8
150,5*	103,4	609,0	136,7	95,7	513,9
7,5**	5,1	30,4	6,8	4,7	25,6

* Suma

** Dado médio

ANEXO D. Padronização da qPCR

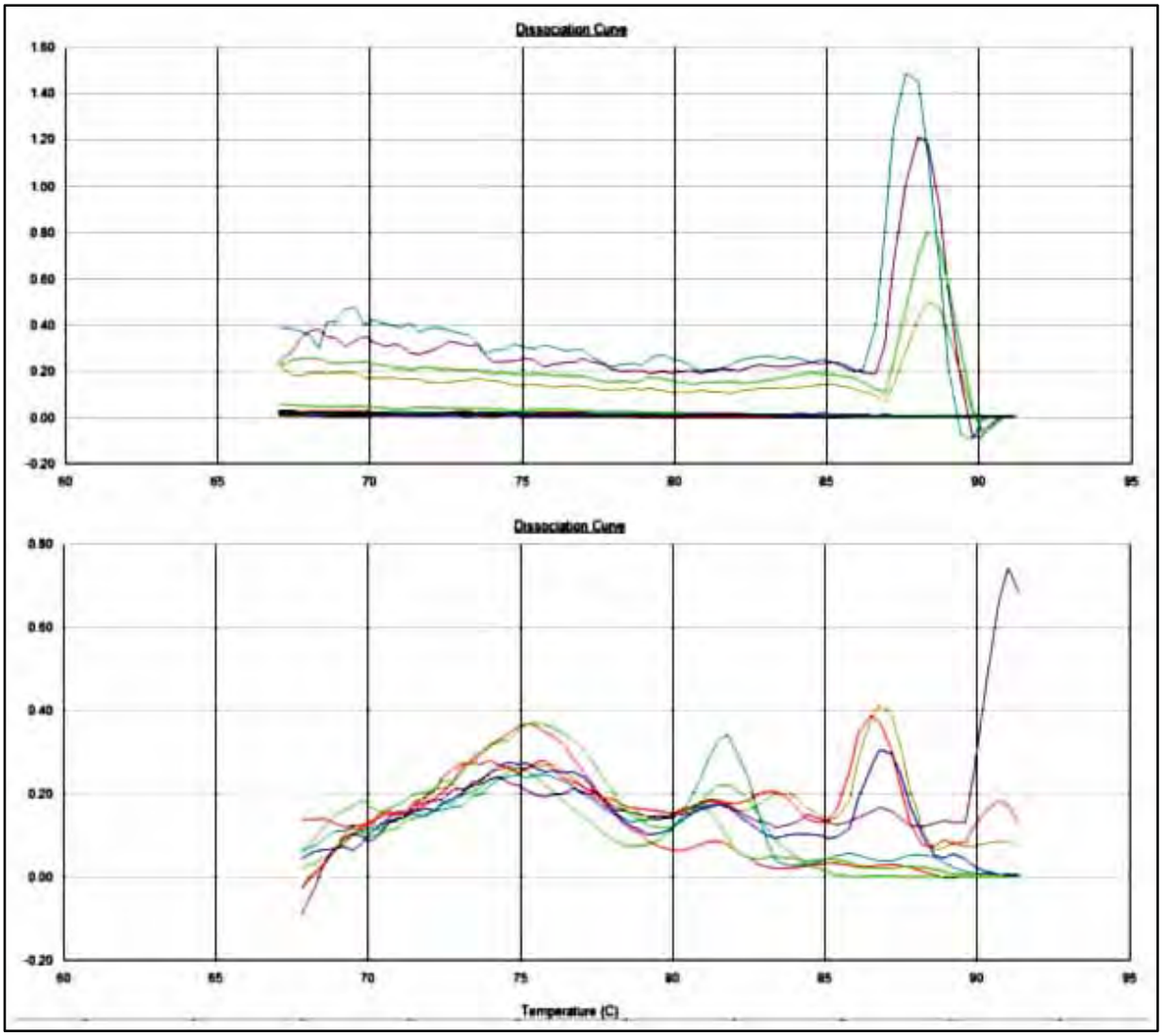


Figura 11. Na parte superior observa-se os casos positivos por qPCR com os iniciadores sugeridos por Gomes et al. (2002), inclui dois controles e dois casos das amostras. Na parte inferior observa-se a qPCR usando os iniciadores sugeridos por Campos et al. (2009), note-se a quantidade de picos inespecíficos que não permitem supor a positividade dos casos analisados.