

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA, IMUNOISTOQUÍMICA E
DETECÇÃO MOLECULAR DO DNA VIRAL NO SISTEMA
NERVOSO CENTRAL DE BOVINOS INOCULADOS
EXPERIMENTALMENTE COM O HERPESVIRUS BOVINO 5**

DIDIER QUEVEDO CAGNINI

Botucatu – SP

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA, IMUNOISTOQUÍMICA E
DETECÇÃO MOLECULAR DO DNA VIRAL NO SISTEMA
NERVOSO CENTRAL DE BOVINOS INOCULADOS
EXPERIMENTALMENTE COM O HERPESVIRUS BOVINO 5**

DIDIER QUEVEDO CAGNINI

Dissertação apresentada junto ao Programa de
Pós-graduação em Medicina Veterinária para
obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof.Dr. Alexandre Secorun Borges

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Renée Laufer Amorim

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Cagnini, Didier Quevedo.

Avaliação histopatológica, imunoistoquímica e detecção molecular do DNA viral no sistema nervoso central de bovinos inoculados experimentalmente com o herpesvirus bovino 5/ Didier Quevedo Cagnini. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Alexandre Secorun Borges

Co-orientador: Renée Laufer Amorim

Capes: 50503006

1. Bovino - Doenças. 2. Infecção – Estudos experimentais.

Palavras-chave: BoHV-5; Doenças de bovinos; Herpesvírus bovino; Meningoencefalite; Neuropatologia.

Nome do Autor: Didier Quevedo Cagnini

Título: AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA, IMUNOISTOQUÍMICA E DETECÇÃO MOLECULAR DO DNA VIRAL NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE BOVINOS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE COM O HERPESVIRUS BOVINO 5.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Secorun Borges
Presidente e Orientador
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. Dr. Julio Lopes Sequeira
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Paulo Henrique Jorge da Cunha
Membro
Departamento de Medicina Veterinária
Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia (Campus II), Goiânia - GO.

Data da Defesa: 15 de fevereiro de 2010.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Lari Luiz Cagnini** e **Heliane Quevedo Cagnini**, pelo amor incondicional, pelo incentivo, por ajudar a formar a pessoa que sou hoje.
Amo vocês.

As minhas irmãs **Lariane Quevedo Cagnini** e **Andressa Quevedo Cagnini** pelo amor e felicidade que trazem a minha vida.

A minha namorada e companheira **Ana Claudia Gorino**, por sempre estar ao meu lado com muito amor, dedicação, palavras de incentivo e carinho, me fazendo muito feliz.

Aos avós **André Nunes Quevedo**, **Cândida Magalhães Quevedo**, **Romano Cagnini**, **Angela Baldin Cagnini**, pelo amor e pelas preces que sempre me acompanharam e me protegeram.

Aos demais **familiares**, tios, tias, primos, primas que apesar da distância sempre estão na torcida por mim.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos que contribuíram de forma direta e indireta para a realização desta dissertação. Apenas o trabalho em conjunto possibilita a conclusão obras como esta. No entanto, de forma particular agradeço:

Ao **Prof. Dr. Alexandre Secorun Borges**, FMVZ/UNESP – Campus de Botucatu, pela oportunidade de trabalhar com neuropatologia, orientação, confiança, amizade e apoio durante a realização deste trabalho.

Ao **Prof^a. Dr^a. Renée Laufer Amorim**, FMVZ/UNESP – Campus de Botucatu, pela co-orientação, amizade, conselhos e os direcionamentos para a realização deste experimento.

Ao Laboratório de Virologia Animal, da Universidade Federal de Santa Maria, na figura dos professores **Rudi Weiblen** e **Eduardo Furtado Flores**, por gentilmente ter cedido a alíquota do anticorpo monoclonal 2F9 para a realização das avaliações imunoistoquímicas do presente estudo.

A minha namorada **Ana Claudia Gorino** pelo amor e carinho que compartilhamos, tornando tudo mais fácil.

Aos amigos **Prof. Dr. Paulo Henrique Jorge da Cunha**, **Msc. Peres Ramos Badial**, **Dr. José Paes de Oliveira Filho** pela amizade durante o curso de pós-graduação, pelo apoio técnico e intelectual durante a realização deste estudo e ajuda com as correções desta dissertação.

Aos amigos **M.V. Diego José Zanzarini Delfiol** e **M.V. Mariana Isa Poci Antunes** pela amizade, convivência agradável durante o curso de pós-graduação e ajuda com as correções desta dissertação.

Aos amigos de República **Luis Emiliano Cisneros Álvarez** e **Peres Ramos Badial** pela amizade, pela convivência agradável e momentos de alegria.

Às acadêmicas da graduação e bolsistas PIBIC, **Ana Claudia Gorino**, **Mariana Fontanetti Marinheiro** e **Daniilo Giorgi Abranches de Andrade** pelo auxílio e dedicação ao projeto.

Ao pós-graduando **M.V. Diego Borin Nóbrega** e **Msc. Peres Ramos Badial** pela ajuda com as análises estatísticas.

Aos Médicos Veterinários Residentes e funcionários do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ – UNESP do campus de Botucatu pela amizade e contribuição no desenvolvimento desta dissertação.

Às secretárias do Departamento de Clínica Veterinária, **Marlene Dias de Camargo** e **Izabel Cristina Castro**, pela disponibilidade e colaboração.

Aos profissionais do Curso de Pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia–Campus de Botucatu, pelo auxílio prestado durante o Curso de Mestrado.

À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu – Unesp**, pelo apoio desta instituição para o desenvolvimento desta dissertação.

À **Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP** pela bolsa de mestrado.

Lista de figuras

Figure 1. **A)** Bulbo olfatório, animal 5. Área de gliose focal. **B)** Tálamo, animal 6. Área de gliose difusa. **C)** Córtex cerebral, animal 5. Meningite mononuclear. **D)** Córtex cerebral, animal 1. Corpúsculo de inclusão basofílico intranuclear..... 47

Figure 2. **A)** Córtex cerebral, animal 2. Necrose cerebrocortical, note os neurônios vermelhos. **B)** Córtex cerebral, animal 1. Necrose cerebrocortical em estágio mais avançado. **C)** Córtex cerebral, animal 1. Lesão inicial de malacia caracterizada pela intensa vacuolização do neurópilo, com necrose e desaparecimento dos corpos neuronais e infiltração discreta de células Gitter e células inflamatórias mononucleares. **D)** Tálamo, animal 1. Área de malacia com presença de células Gitter..... 48

Figure 3. **A)** Núcleos da base, animal 3. Manguito perivascular com 4-5 camadas de células mononucleares. **B)** Núcleos da base, animal 4. Manguito perivascular com aproximadamente 10 camadas de células mononucleares. **C)** Córtex cerebral, animal 3. Vários manguitos perivasculares compostos por células mononucleares. **D)** Córtex cerebral, animal 3. Manguito perivascular com mais do que 10 camadas de células mononucleares..... 49

Figure 4. **A)** Córtex cerebral, marcação do controle negativo com o Ac L6G (Não usado no experimento). **B)** Córtex cerebral, animal 1. Marcação positiva de neurônios corticais sem a presença de marcação inespecífica. **C)** Córtex cerebral, animal 2. Marcação positiva de neurônios corticais sem a presença de marcação inespecífica. **D)** PCR, animal 1. Imagem de gel de agarose a 1,5% demonstrando o resultado da amplificação em amostras extraídas de blocos de parafina do encéfalo de bovinos para o gene que codifica a gC do BoHV-5 (159 pb)..... 57

Lista de Quadros

Quadro 1. Protocolos imunoistoquímicos para o diagnóstico da meningoencefalite pelo BoHV-5.....	33
--	----

Lista de tabelas

Tabela 1. Técnicas moleculares, oligonucleotídeos iniciadores (primers), posição dos primers, alvos, tamanho dos produtos e tecidos analisados para o diagnóstico do BoHV-5 descritos na literatura.....	34
Tabela 2. Alterações histopatológicas e os escores de intensidade de lesão nas diferentes regiões do SNC do bezerro 1, inoculado experimentalmente com BoHV-5.....	85
Tabela 3. Alterações histopatológicas e os escores de intensidade de lesão nas diferentes regiões do SNC do bezerro 2, inoculado experimentalmente com BoHV-5.....	86
Tabela 4. Alterações histopatológicas e os escores de intensidade de lesão nas diferentes regiões do SNC do bezerro 3, inoculado experimentalmente com BoHV-5.....	87
Tabela 5. Alterações histopatológicas e os escores de intensidade de lesão nas diferentes regiões do SNC do bezerro 4, inoculado experimentalmente com BoHV-5.....	88
Tabela 6. Alterações histopatológicas e os escores de intensidade de lesão nas diferentes regiões do SNC do bezerro 5, inoculado experimentalmente com BoHV-5.....	89
Tabela 7. Alterações histopatológicas e os escores de intensidade de lesão nas diferentes regiões do SNC do bezerro 6, inoculado experimentalmente com BoHV-5.....	90
Tabela 8. Somatório dos escores de lesão por região de cada animal e valor total, médias e desvios-padrão dos escores de lesão por animal.....	50

Tabela 9. Somatório dos escores de cada lesão avaliada nos animais 1, 2, 3, 4, 5 e 6, inoculados experimentalmente com o BoHV-5, e as médias e desvios-padrão das lesões.....	51
Tabela 10. Presença de necrose neuronal nas diferentes regiões do SNC de cada animal.....	52
Tabela 11. Presença de manguitos perivasculares nas diferentes regiões do SNC de cada animal.....	53
Tabela 12. Resultados do exame imunoistoquímico utilizando o anticorpo monoclonal (2F9) anti-BoHV-5, nas 18 áreas avaliadas do encéfalo de 6 bovinos infectados experimentalmente pelo BoHV-5.....	55
Tabela 13. Resultados da PCR específica para o BoHV-5, nas 18 áreas avaliadas do encéfalo de 6 bovinos infectados experimentalmente pelo BoHV-5.....	58
Tabela 14. Escore total de lesão e número total de áreas positivas na PCR e na imunoistoquímica para o BoHV-5 por região avaliada.....	59
Tabela 15. Comparação dos resultados da PCR e da IHQ com a presença ou ausência de sinais clínicos neurológicos. Teste de Fisher ($p < 0,001$).....	60

Sumário

	Página
Resumo	xiv
Abstract	xv
1. Introdução	16
2. Revisão de literatura.....	19
2.1 Histórico.....	19
2.2 Características do vírus.....	19
2.2.1 Genoma.....	20
2.2.2 Replicação.....	20
2.3. Epidemiologia.....	21
2.4 Patogenia.....	23
2.5 Diagnóstico.....	26
2.5.1 Clínico.....	26
2.5.2 Laboratorial.....	27
2.5.2.1 Sorologia.....	27
2.5.2.2 Análise do líquido cefalorraquidiano.....	27
2.5.2.3 Isolamento viral.....	27
2.5.2.4 Necropsia.....	28
2.5.2.5 Histologia.....	28
2.5.2.6 Imunoistoquímica.....	29
2.5.2.7 Molecular.....	31
2.5.2.8 Diagnóstico diferencial.....	32
3.Objetivos	37
4. Material e Métodos.....	38
4.1. Amostras utilizadas no estudo.....	38
4.2. Histopatologia.....	39

4.3. Imunoistoquímica.....	40
4.4.1 Preparação das amostras.....	40
4.4.2 Recuperação antigênica.....	40
4.4.3 Bloqueio da peroxidase endógena e de proteínas.....	41
4.4.4 Anticorpos primários.....	41
4.4.5 Anticorpo secundário.....	41
4.4.6 Sistema de detecção e revelação das reações.....	42
4.4.7 Leitura das lâminas.....	42
4.3. Extração do DNA.....	42
4.5. PCR.....	43
4.6. Análise estatística.....	44
5.Resultados.....	44
5.1 Histopatologia.....	46
5.2 Imunoistoquímica.....	54
5.3 PCR.....	56
5.4 Comparação entre IHQ e PCR.....	60
6.Discussão.....	61
7.Conclusão.....	70
8.Referências bibliográficas.....	71
Anexos.....	84

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.** Botucatu, 2011. 107p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A meningoencefalite herpética bovina é uma infecção viral do SNC causada pelo BoHV-5, um vírus DNA de fita dupla, envelopado, pertencente à família Herpesviridae, subfamília Alphaherpesvirinae. A meningoencefalite acomete principalmente animais jovens, ocorrendo principalmente em forma de surtos de casos isolados ou de surtos com morbidade baixa e letalidade é alta. A doença não possui caráter sazonal e nem predileção por raça ou sexo. Surtos de meningoencefalite por BHV-5 têm sido relatados após algumas práticas de manejo, todas associadas a situações de estresse. O diagnóstico final baseia-se nos achados clínicos, epidemiológicos, macro e microscópicos e o isolamento viral associado a técnicas como imunoperoxidase, restrição da endonuclease e PCR. Entretanto, o isolamento viral nem sempre é possível devido a distância das fazendas e ao tempo entre a morte dos animais e a coleta das amostras. Nestes casos a imunoistoquímica e a PCR são ferramentas diagnósticas úteis. Além disso, estas técnicas permitem o diagnóstico a partir de tecido fixado em formol e incluído em parafina. O objetivo deste trabalho foi descrever as alterações histopatológicas nas diferentes regiões do sistema nervoso central de bovinos infectados experimentalmente pelo BoHV-5 e relacionar a intensidade e o tipo das lesões encontradas com os resultados da PCR e da imunoistoquímica (IHQ) para detecção do BoHV-5. Para isso, blocos de parafina do sistema nervoso central de seis bovinos provenientes de animais inoculados experimentalmente pelo BoHV-5 foram avaliados microscopicamente e pelas técnicas da IHQ e da PCR. Todos os animais apresentaram alterações histopatológicas de meningoencefalite não supurativa, com intensidade variável entre as áreas e os animais, sendo que as regiões do córtex cerebral apresentaram alterações microscópicas mais acentuadas. Das 108 áreas analisadas, 32,41% e 35,19% foram positivas para a imunoistoquímica e para a PCR, respectivamente. As áreas com maiores intensidades de lesões histopatológicas, foram mais positivas na IHQ e na PCR. Estes resultados contribuem para o conhecimento da distribuição das lesões causadas pelo BoHV-5 no SNC de bovinos e demonstram que a PCR e a imunoistoquímica podem ser utilizadas no diagnóstico definitivo da meningoencefalite não-supurativa pelo BoHV-5.

Palavras-chave: doenças de bovinos, herpesvírus bovino, BoHV-5, meningoencefalite, neuropatologia.

CAGNINI, D.Q. **Histopathological evaluation, immunohistochemistry and molecular detection of viral DNA in the central nervous system of cattle experimentally infected with bovine herpesvirus 5.** Botucatu, 2011. 107p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Bovine meningoencephalitis is a viral infection caused by BHV-5, a double-stranded DNA and enveloped virus, that belongs to the Herpesviridae family, subfamily Alphaherpesvirinae. Meningoencephalitis mainly occurs in young animals, causing individual deaths or outbreaks with low morbidity and high mortality. The disease has no seasonal character or predilection for breed or gender. Outbreaks of meningoencephalitis have been reported associated with stressful factors like weaning, vaccinations, transport, changes in feeding. The final diagnosis is based on clinical, epidemiological, gross and microscopic findings and virus isolation associated with others techniques like immunoperoxidase, endonucleases restriction and PCR. Wherever, virus isolation is not always possible due the distance of farms and time from animal death to the samples collection. Immunohistochemistry and PCR are better diagnostic tools in this cases. Besides this two techniques could be used in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. The aim of this study was to describe the histological changes in the CNS of BHV-5 experimentally infected calves and associate it with the PCR and IHC results. For this purpose, formalin-fixed, paraffin-embedded CNS tissue from previously BHV-5 inoculated calves (Cunha, 2010) were microscopically evaluated and were tested by immunohistochemistry (IHC) and polymerase chain reaction (PCR). All animals presented non-suppurative meningoencephalitis that had variable distribution among the cases and among the various sections of brain regions in each case. The cerebral cortex had more accentuated lesions. From 108 evaluated areas, 32.41% and 35.19% were positives by IHC and PCR, respectively. The IHC and PCR positive areas had more accentuated microscopic lesions. These findings extend the knowledge about the BHV-5 distribution in the CNS of calves and show that IHC and PCR could be useful in the diagnosis of BHV-5 non-suppurative meningoencephalitis.

Keywords: diseases of cattle, bovine herpesvirus, BoHV-5, meningoencephalitis, neuropathology.

1. Introdução

As doenças que afetam o sistema nervoso central (SNC) dos bovinos possuem grande importância na medicina veterinária devido a fatores econômicos e de saúde pública. Estas encontram na raiva bovina a sua representante mais prevalente e de maior importância no âmbito socioeconômico. Apenas no ano de 2009, foram diagnosticados aproximadamente 800 casos de raiva bovina no Brasil (SVS, 2010). Estima-se que anualmente cerca 55.000 pessoas morrem por casos de raiva no mundo. Acrescentado a perda social, estima-se que estes casos representam uma perda de aproximadamente US\$ 583.5 milhões de dólares anuais (Knobel et al., 2005). Além da raiva, a encefalopatia espongiforme bovina (BSE) e a sua associação com a variante da doença Creutzfeldt-Jakob (vCJD) em humanos, aumentou a importância social e econômica das doenças do SNC dos bovinos, pois além de causar sérios embargos comerciais e consequentes perdas econômicas, é invariavelmente fatal.

No entanto, existem outras doenças do SNC de bovinos que causam perdas econômicas e são importantes diagnósticos diferenciais da raiva e da BSE. Dentre elas, destacam-se algumas doenças inflamatórias como: meningoencefalite causada pelo herpesvírus bovino 5 (BoHV-5); febre catarral maligna (FCM); doença de Aujeszky; listeriose; e doenças degenerativas como a polioencefalomalacia (PEM). Como diagnóstico diferencial de raiva e BSE ainda podem ser citadas a encefalopatia hepática, que apesar de não apresentar lesões inflamatórias pode ser clinicamente semelhante à raiva, e doenças causadas por protozoários, destacando-se a babesiose cerebral. Clinicamente, estas enfermidades não podem ser diferenciadas da raiva, sendo necessário o uso de exames laboratoriais antes e após a morte dos animais para determinar o agente etiológico envolvido em cada caso. Por isso, os laboratórios devem estar aptos a realizar o diagnóstico diferencial das encefalopatias que acometem os bovinos.

O BoHV-5 é um vírus DNA de fita dupla, envelopado, membro da família *Herpesviridae*, da subfamília *Alphaherpesvirinae* e do gênero *Varicellovirus* (Franco e Roehle, 2007; Del Médico Zajac et al., 2009). A doença causada pelo BoHV-5 acomete principalmente animais jovens, podendo também afetar

animais adultos, ocorrendo em forma de surtos ou de casos isolados. Geralmente apresenta morbidade baixa e letalidade alta. O aparecimento de casos de meningoencefalite herpética geralmente está associado a situações de estresse, como desmame, transporte, vacinações, castrações, troca de pastos, mudanças na alimentação ou intempéries. Acredita-se que isto diminui a imunidade dos animais e facilita a replicação viral, causando a doença.

O diagnóstico *ante-mortem* é difícil de ser estabelecido, visto que não existem sinais patognomônicos da enfermidade, a qual pode ser confundida com outras encefalopatias. No entanto, os achados clínicos e epidemiológicos, associados à análise do líquido cefalorraquidiano (LCR) podem auxiliar o diagnóstico de encefalite viral. Apesar da sensibilidade da PCR não ser alta na avaliação do LCR para BoHV-5, esta pode ser uma ferramenta útil na tentativa de realizar o diagnóstico definitivo no animal vivo.

O diagnóstico post-mortem com o auxílio de métodos laboratoriais é fundamental. À necropsia, as lesões macroscópicas podem ser discretas, como avermelhamento de leptomeninges ou mais evidentes, como malacia do córtex cerebral. Histologicamente podem ser encontrados diferentes graus de meningoencefalite não supurativa com presença de manguitos perivascularares composto por células mononucleares, infiltrados inflamatório mononuclear, necrose neuronal, edema, tumefação de células endoteliais e gliose. Em alguns casos pode haver malacia da substância cinzenta do córtex cerebral e corpúsculos de inclusão intranucleares (CI) em astrócitos e neurônios. O diagnóstico histopatológico pode ser considerado conclusivo apenas na presença dos corpúsculos de inclusão. A presença do CI é muito variável e a ausência destes não exclui o diagnóstico doença por BoHV-5. Além disto, o diagnóstico definitivo pode ser realizado pelo isolamento viral associado às técnicas de imunoperoxidase (IPX), imunofluorescência indireta (IFA) ou ao uso de enzimas de restrição para confirmar a infecção pelo BoHV-5. Contudo, muitas vezes as amostras não estão adequadas para o cultivo celular, podendo obter um resultado falso-negativo. Nestes casos, as técnicas de imunistoquímica com o uso de anticorpos monoclonais e da reação em cadeia da polimerase (PCR) apresentam-se como melhores alternativas para se obter o diagnóstico positivo para BoHV-5.

O objetivo deste trabalho é descrever e comparar a intensidades das

alterações histopatológicas nas diferentes regiões do SNC de bovinos infectados experimentalmente pelo BoHV-5, relacionando com a presença ou ausência de sinais clínicos. Além disto, relacionar a intensidade e o tipo das lesões observadas no exame histopatológico com os resultados da PCR e da imunoistoquímica para detecção do BoHV-5. Para isto, foram utilizados os blocos de parafina do sistema nervoso central de 6 bovinos que foram previamente inoculados pelo BoHV-5 por Cunha (2010).

2. Revisão de literatura

2.1 Histórico

Devido a similaridade da morfologia viral, dos efeitos citopáticos em cultura celular e das propriedades antigênicas entre o BoHV-1 e BoHV-5, este último continuou sendo considerado como a variante neuropatogênica BoHV-1 até o início da década de 1990 (Rissi et al., 2007, Delhon et al., 2003). No entanto, as diferenças moleculares e antigênicas apresentadas entre as estirpes permitiram que o BoHV-5 fosse reconhecido como um vírus distinto pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus no ano de 1992 (Roizman et al., 1992).

2.2 Características do vírus

A família *Herpesviridae* possui cerca de 200 espécies de vírus isoladas de vários animais (Franco e Roehe, 2007; Sá & Silva, 2009). A família *Herpesviridae* é composta por três subfamílias de acordo com suas características biológicas: a *Alphaherpesvirinae*, onde estão alocados os principais herpesvírus associados a doenças em bovinos, o BoHV-1, o BoHV-5, Herpesvírus bovino 2 (BoHV-2), o Herpesvírus suíno 1 (SuHV-1) (Spilki et al., 2004; Groff et al., 2005; Franco e Roehe, 2007); a *Betaherpesvirinae*, a qual abriga importantes patógenos humanos e alguns herpesvírus de primatas não-humanos e roedores; e a *Gammaherpesvirinae*, onde estão abrigados o Herpesvirus ovino 2 (OvHV-2) e o Herpesvírus alcelaphine 1 (AIHV-1) causadores da febre catarral maligna em bovinos, associada aos ovinos e aos alces, respectivamente (Rech et al., 2005). Os alfaherpesvírus apresentam um ciclo de replicação rápido e lítico tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Franco e Roehe, 2007) e podem infectar células epiteliais e algumas células do sistema nervoso (Roizman et al., 1992).

O BoHV-5 é um vírus DNA fita dupla, envelopado pertencente à família *Hesperviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e ao gênero *Varicellovirus*. Os vírions são formados pelo núcleo (ou *core*), capsídeo, tegumento, envelope e seus formatos variam entre esféricos, quando o envelope está intacto, e em formato de "ovo frito", quando o envelope está danificado. O núcleo contém o genoma viral conjugado com algumas proteínas codificadas pelo vírus (Franco

e Roehe, 2007). O capsídeo possui formato icosaédrico, com diâmetro aproximado de 100 nm, formado por 12 capsômeros pentaméricos e 150 hexaméricos, envoltos por um material amorfo denominado tegumento (Roizman et al., 1992; Franco e Roehe, 2007). O tegumento é a camada protéica que preenche o espaço entre o capsídeo e o envelope. O envelope viral possui entre 10 e 12 glicoproteínas inseridas na camada lipídica, que possuem papel fundamental nas interações entre os vírions e as células hospedeiras (Schwyzer e Ackermann, 1996).

As glicoproteínas desempenham funções importantes, incluindo a ligação a receptores celulares, fusão, penetração e transporte das partículas virais entre as células (Franco e Roehe, 2007).

2.2.1 Genoma

O BoHV-5 possui 138.390 pares de base (pb) e com 75% de conteúdo GC (Guanina e Citosina) na composição do seu material genético. O vírus possui duas sequências únicas, denominadas de região longa (UL), a qual possui 104.054 pb e região curta (US), com 9.548 pb. (Delhon et al., 2003).

2.2.2 Replicação

Os alphaherpesvírus apresentam dois ciclos replicativos: a infecção aguda (ciclo lítico) e a infecção latente. O primeiro ocorre principalmente nas células da mucosa nasal e, provavelmente, também nos neurônios. Na infecção aguda há uma grande expressão de todos os genes virais, com replicação do genoma e produção de progênie viral (Franco e Roehe, 2007). Já a infecção latente ocorre principalmente em neurônios sensoriais e autonômicos. Neste caso, após penetrar no núcleo da célula-alvo, o vírus interrompe o ciclo replicativo, podendo permanecer inativo ou eventualmente ser reativado em situações de estresse ou tratamento com corticosteróides (Claus et al., 2002). Neste momento não há expressão gênica significativa (Franco e Roehe, 2007). A ausência de replicação viral resultará na ausência de sinais clínicos, tornando difícil a caracterização clínica da infecção pelo BoHV-5 (Franco e Roehe, 2007).

O ciclo replicativo é iniciado pela interação dos vírions com os receptores da membrana plasmática das células-alvo. Nesta etapa, as

glicoproteínas B, C e D, assistidas pelo co-receptor HveA, são responsáveis pela ligação, fusão e adsorção dos vírions à membrana plasmática, permitindo a entrada desses nas células. Após esta etapa, o nucleocapsídeo é transportado até os poros nucleares onde ocorre a sua desintegração e liberação do material genético para o núcleo da célula (Franco e Roehe, 2007). No núcleo ocorrerá a replicação viral e a aquisição do nucleocapsídeo, que será produzido no citoplasma e transportado ao núcleo. A aquisição do envelope ocorrerá pela passagem através da membrana nuclear ou do complexo de Golgi (Franco e Roehe, 2007).

2.3. Epidemiologia

A meningoencefalite causada por BoHV-5 foi descrita em vários locais do mundo, como Austrália (Johnston et al., 1962), Estados Unidos da América (d'Offay et al., 1995; Ely et al., 1996), Argentina (Perez et al., 2003; Valera et al., 2000), Colômbia (Pedraza et al., 2010) e Europa (Bartha et al., 1969).

No Brasil, depois da raiva, o BoHV-5 é considerado como uma das principais causas virais de encefalopatia nos bovinos e a ocorrência da doença tem aumentado (Lisboa et al. 2009). Há relatos de casos isolados e surtos da doença nos Estados de Mato Grosso do Sul e São Paulo (Salvador et al. 1998, Gomes et al. 2002, Cunha et al. 2009, Cagnini et al., 2009), Minas Gerais (Botelho, 2000; Gomes et al. 2002, Aquino Neto et al., 2009), Rio Grande do Sul (Riet-Correa et al., 1989; Weiblen et al., 1989; Sanches et al., 2000; Elias et al., 2004; Sá e Silva et al., 2007; Rissi et al., 2006, 2008), Mato Grosso (Colodel et al., 2002; Arruda et al., 2010), Goiás (De Paula et al., 2005), Pará (Riet-Correa et al., 2006), Paraíba (Galiza et al., 2010) e Paraná (Halfen e Vidor, 2001; Claus et al., 2007; Lisboa et al., 2009; Lunardi et al., 2009).

A meningoencefalite acomete principalmente animais jovens, ocorrendo principalmente em forma de casos isolados ou de surtos com morbidade e mortalidade baixa (até 5%), e letalidade alta, variando entre 75 e 100% (Salvador et al., 1998; Rissi et al., 2006). No entanto, se forem considerados apenas os animais dos lotes onde ocorreram os casos, podem ser encontrados índices de morbidade de até 25% (Barros et al., 2006). Embora acometa principalmente animais jovens, os casos de meningoencefalite herpética também podem ocorrer em animais adultos (Salvador et al., 1998; Aquino Neto

et al., 2009; Cunha et al., 2009). Nestes casos, acredita-se que a doença possa estar relacionada à reativação do vírus (Franco e Roehe, 2007). Inúmeros casos da doença em animais de raças zebuínas foram relatados (Salvador et al., 1998; Colodel et al., 2002), onde os valores de morbidade e letalidade são semelhantes aos descritos em animais de origem européia. Isso vai de encontro com o descrito por Studdert (1989), que sugere que o maior número de casos de meningoencefalite por BoHV-5 em bovinos de raças européias estaria relacionado a uma menor adaptação dessas ao vírus. Segundo Elias et al. (2004) e Rissi et al. (2008) a doença não possui caráter sazonal e nem predileção por raça ou sexo.

A transmissão do BoHV-5 provavelmente ocorra por contato direto ou indireto entre os animais (Franco e Roehe, 2007). Por isso, a grande concentração de animais, a introdução de novos animais no rebanho e o desmame de lotes de bezerros podem favorecer a disseminação do vírus nos rebanhos (Rissi et al., 2006). Além disto, diversas situações de estresse podem acarretar na reativação do vírus e propiciar condições para sua transmissão e disseminação (Franco e Roehe, 2007). Os animais podem apresentar secreção nasal serosa e, menos frequentemente, sinais neurológicos semelhantes aos descrito nos casos de infecção primária (Caron et al. 2002, Vogel et al. 2003; Franco e Roehe, 2007).

Surtos de meningoencefalite por BoHV-5 foram associados a situações de estresse (Colodel et al. 2002; Elias et al. 2004; Rissi et al., 2007). Dentre estas, desmame, transporte, vacinações, cirurgias, trocas de pastos, mudanças na alimentação, intempéries e o tratamento com corticosteróides podem estar relacionadas à ocorrência de surtos (Claus et al., 2002; Perez et al., 2002; Barros et al., 2006; Franco e Roehe, 2007). Experimentalmente, foi demonstrado por Belknap et al. (1994) que bezerros que receberam colostro previamente à inoculação pelo BoHV-5 não apresentaram sinais clínicos, enquanto que os animais que não receberam colostro apresentaram doença neurológica. Em trabalho realizado por Rissi et al. (2006), 75% das propriedades onde ocorreram casos de meningoencefalite por BoHV-5 apresentaram associação com o desmame recente de bezerros, porém em nenhuma ocasião foram observadas falhas na transferência de imunidade passiva.

Além das situações de estresse, a meningoencefalite pelo BoHV-5 foi relacionada a casos PEM e experimentalmente é sugerido que a intoxicação por sulfato de amônia, um dos agentes etiológicos da PEM, possa participar na reativação das infecções latentes em bovinos (David et al., 2007). Além disto, Spilk et al. (2006) descreveram que a infecção acidental pelo vírus da diarreia viral bovina (BVD) pode ter exacerbado os sinais clínicos da infecção experimental por BoHV-5. Além disto, o BoHV-5 já foi isolado do encéfalo de um bovino positivo para raiva (Spilk et al., 2003). No entanto, não foi possível determinar se houve uma participação do BoHV-5 na doença do animal positivo para raiva.

Experimentalmente a infecção pelo BoHV-5 foi realizada em bovinos (Meyer et al., 2001; Perez et al., 2002; Vogel et al., 2003; Vogel et al., 2004; Cunha, 2010), coelhos (Chowdhury et al., 1997; Beltrão et al., 2000; Caron et al., 2002; Spilki et al., 2002; Diel et al., 2005; Mayer et al., 2006), ovinos (Silva et al., 1999) e caprinos (Diel et al., 2007). A infecção natural foi descrita apenas em bovinos (Rissi et al., 2006).

Devido à similaridade antigênica entre o BoHV-1 e o BoHV-5, a prevalência e a distribuição da infecção do BoHV-5 no mundo permanece desconhecida (Franco e Roehe, 2007). Para tentar mudar esta situação, pesquisas foram desenvolvidas com o objetivo de diferenciar as amostras de BoHV-5 isoladas de casos naturais de meningoencefalite (Souza et al., 2002; Kunrath et al., 2004; Oldoni et al., 2004; Hübner et al., 2005b; Sá e Silva et al., 2007a).

Alguns estudos retrospectivos de meningoencefalite utilizando a PCR foram realizados, permitindo a confirmação de novos casos da doença e, deste modo, contribuindo com o conhecimento da epidemiologia da mesma (d'Offay et al., 1995; Ferrari et al., 2007; Arruda et al., 2010; Pedraza et al., 2010).

2.4. Patogenia

O BoHV-5 tem sido isolado principalmente de casos de doença neurológica em bovinos jovens (Colodel et al., 2002), enquanto que o BoHV-1 está geralmente associado com doença respiratória, genital e reprodutiva em bovinos de várias idades (Rissi et al., 2006). Apesar disso, o BoHV-5 já foi detectado no sêmen e baço (Sá e Silva, 2009) e o BoHV-1 em animais com

doença neurológica (Furuoka et al., 1995; Ely et al., 1996; Sá e Silva, et al., 2007b, Rissi et al., 2008).

O curso da doença apresenta, em média, seis dias, porém casos com evolução mais aguda (2-3 dias) ou prolongada (15 dias) foram descritos (Barros et al., 2006).

A principal forma de transmissão do vírus é pelo contato direto entre os animais e suas secreções ou via aerossóis (Halfen e Vidor, 2001). Estes são responsáveis por carrear o vírus até a mucosa do trato respiratório anterior, onde a replicação inicial pode ocorrer por até 15 dias e cursar com sinais respiratórios como secreção nasal serosa (Franco e Roehe, 2007). Posteriormente, o vírus infecta os neurônios sensoriais da região e, através do fluxo axonal retrógrado, segue até o TG e ao bulbo olfatório (Del Médico Zajac et al., 2009). Neste ponto, o vírus pode estabelecer o estado de latência, clinicamente inaparente, ou replicar e ser transportado ao encéfalo, podendo causar sinais clínicos neurológicos (Franco e Roehe, 2007).

Em estudo realizado em coelho o vírus foi inicialmente detectado nos bulbos olfatórios às 48h pós-infecção (p.i.), seguido do córtex olfatório (48/72h) p.i. e às 72/96h p.i. nos gânglios trigêmeos (Beltrão et al., 2000), sugerindo que a entrada do vírus pela via olfatória é mais rápida do que a via gânglio do trigêmeo. No mesmo estudo Beltrão et al. (2000) os animais inoculados pela via conjuntival também desenvolveram sinais clínicos neurológicos, mas com início mais tardios e morbidade menor do que quando os animais foram inoculados pela via IN. Diel et al. (2005) e Fonseca et al. (2006) demonstraram que a via olfatória é importante, porém não a única via de entrada do vírus no SNC e que a via de inoculação apresenta relação com a via de entrada do vírus no SNC dos coelhos.

O BoHV-1 e o BoHV-5 compartilham propriedades biológicas, antigênicas e moleculares (Delhon et al., 2003). Apesar de ambos os vírus invadirem o SNC, apenas o BoHV-5 é capaz de replicar de forma significativa no SNC e produzir doença neurológica de modo efetivo (Ashbaugh et al., 1997). Diferenças detectadas em alguns genes do BoHV-1 e BoHV-5 estão associadas com a diferença na neurovirulência entre esses dois agentes (Chowdhury et al., 1997; 2000a, 2000b; 2002, Rissi, 2006).

A gC é uma glicoproteína presente no envelope viral e está envolvida na penetração dos vírions nas células (Liman et al., 2000). Em estudo realizado por Chowdhury et al. (2000a), o BoHV-5 recombinante contendo a gC do BoHV-1 replicou com menor eficiência no SNC.

Os animais inoculados com o vírus mutante sem as gl, gE e US9 não desenvolveram doença neurológica após inoculação intranasal e apresentaram excreção viral reduzida comparada ao vírus não modificado (Hubner et al., 2005a). Conhecendo as diferenças moleculares entre o gene US9 do BoHV-5 e seu homólogo no BoHV-1, Chowdhury et al. (2006), demonstraram que US9 foi importante para a neuropatogênese e para o transporte axonal retrógrado. Foi realizada a inoculação de coelhos com uma estirpe recombinante do BoHV-5, onde a US9 do BoHV-5 foi substituída pela US9 do BoHV-1, sendo que esta substituição não interferiu na capacidade do vírus em invadir o SNC e produzir lesões. Portanto, apesar de ser importante para o vírus causar infecção no SNC o produto do gene US9 não é o responsável pela diferenças entre o BoHV-1 e o BoHV-5 quanto a capacidade de causar alterações neurológicas.

Uma característica importante dos herpesvírus é a capacidade de estabelecer latência (Franco e Roehe, 2007), possibilitando que o vírus permaneça nos hospedeiros sem a multiplicação viral (Engels e Ackermann, 1996). Nos alfa herpesvírus, o DNA viral latente permanece na forma episomal no núcleo das células infectadas (Franco e Roehe, 2007). Durante a latência viral, a expressão gênica é limitada e o único transcrito viral detectado, denominado transcrito relacionado à latência (Franco e Roehe, 2007), foi relacionado com a inibição do ciclo celular, a inibição da ativação dependente do gene BICP0 das infecções produtivas e a inibição da apoptose celular em estudos *in vitro* relacionados ao BoHV-1 (Schang et al., 1996; Ciacci-Zanella, et al., 1999; Geiser et al., 2002 *apud* Delhon et al., 2003). Segundo Delhon et al. (2003) o BoHV-5 difere consideravelmente do BoHV-1 tanto na região reguladora da transcrição quanto na região codificadora relacionadas aos genes de latência. Por isso, é provável que estas diferenças possuam relevância biológica significativa para os aspectos de interação entre hospedeiro-vírus-neurônio.

A reativação da infecção latente pode ocorrer naturalmente em casos de estresse ou ser induzida pela aplicação de corticosteróides (Vogel et al., 2004;

Mayer et al., 2006). Após a reativação, o vírus volta a replicar nos gânglios sensoriais, sendo transportado via axonal anterógrada para os sítios primários de replicação, onde passa a ser excretado (Franco e Roehe, 2007), podendo ou não apresentar sinais clínicos (Rissi et al., 2006).

Dezengrini et al. (2008) ao inocularem coelhos com BoHV-5, mensuraram os níveis de produção de óxido nítrico (NO) em diferentes intervalos de tempo e constataram o aumento nos níveis de NO à medida que o vírus invadiu e replicou no SNC. Isto indica que o NO possivelmente contribui para o aparecimento das alterações neurológicas.

A base molecular para a patogênese diferencial do BoHV-1 e do BoHV-5 não está totalmente elucidada, mas provavelmente esteja relacionada a contribuições genéticas múltiplas (Delhon et al., 2003)

2.5. Diagnóstico

2.5.1 Clínico

Os sinais clínicos da meningoencefalite por BoHV-5 são semelhantes aos descritos em outras encefalopatias (Claus et al., 2002; Elias et al., 2004; Barros et al., 2006), tornando difícil o diagnóstico clínico. Inicialmente, os animais apresentam febre, depressão profunda, corrimento nasal e ocular e disfagia (Salvador et al., 1998; Colodel et al., 2002; Barros et al., 2006; Cunha, 2010). Posteriormente, verifica-se andar em círculos, amaurose, salivação excessiva, bruxismo, paralisia da língua, nistagmo, opistótono, deficiência proprioceptiva com perda de reflexos auditivos e cutâneos, convulsões, decúbito e morte (Salvador et al., 1998; Colodel et al., 2002; Barros et al., 2006; Rissi et al., 2006; Cunha, 2010).

O curso clínico varia entre 1-15 dias e a letalidade está próxima a 100% (Salvador et al., 1998). Apesar de poder causar doença em animais adultos (Salvador et al., 1998), casos de doença neurológica fatal em bezerros, associado a histórico de mudança na alimentação, introdução de novos animais, transporte, ou outras situações de estresse são sugestivas de infecção pelo BoHV-5 (Franco e Roehe, 2007). Contudo, o diagnóstico clínico-epidemiológico deve ser sempre acompanhado de confirmação da presença do vírus (Franco e Roehe, 2007). Para isto, pode ser realizado o isolamento viral e

identificação do vírus, a imunoistoquímica dos tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina, a PCR, a análise de restrição genômica e a análise de polimorfismo de DNA [RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)] (d'Offay et al., 1995; D'Arce et al., 2002; Oldoni et al., 2004; Afonso et al., 2007; Sá e Silva et al., 2007).

2.5.2 Laboratorial

2.5.2.1 Sorologia

Testes sorológicos têm valor limitado no diagnóstico, pois não diferenciam animais infectados pelo BoHV-5 dos infectados pelo BoHV-1, devido à intensa reação cruzada entre os vírus (Teixeira et al., 1998). Por isso, a sorologia pareada de animais que sobreviveram à doença neurológica pode auxiliar no diagnóstico (Franco e Roehe, 2007), mas não é capaz de definir o agente etiológico.

2.5.2.2 Análise do líquido cefalorraquidiano

A análise do líquido cefalorraquidiano (LCR) realizada no início dos sinais clínicos neurológicos pode apresentar pleocitose com predominância de células mononucleares (Lisboa et al. 2009). Segundo Cunha (2010) e D'Ângelo et al. (2009), a análise do LCR associada a detecção do DNA viral pela PCR são exames complementares úteis e rápidos para confirmação do diagnóstico etiológico dessa enfermidade no animal vivo. Apesar da sensibilidade da detecção do DNA do BoHV-5 pela PCR não ser alta, esta técnica pode ser útil para detectar a infecção natural por BoHV-5 em bovinos (Lunardi et al. 2009).

2.5.2.3 Isolamento viral

O isolamento viral em cultivo celular deve ser realizado a partir das secreções nasais e/ou de tecido encefálico (Campos et al., 2009). Para o isolamento do BoHV-5, geralmente são utilizadas as células da linhagem de rim de bovino (MDBK), onde o vírus produz efeito citopático típico (Franco e Roehe, 2007). No entanto, além do isolamento viral faz-se necessária a confirmação da presença do BoHV-5 utilizando anticorpos monoclonais ou técnicas moleculares (Del Médico Zajac et al., 2009).

2.5.2.4 Necropsia

Alterações macroscópicas podem não estar presentes nos casos de meningoencefalite por BoHV-5 (Salvador et al., 1998; Colodel et al., 2002; Rissi et al., 2006). Quando presentes, apresentam-se como avermelhamento das leptomeninges (Elias et al., 2004), ou áreas tumefeitas, de coloração amarelada ou vermelho-amarelada e consistência amolecida, características de malacia (Rissi et al., 2006). Com o tempo, estas áreas podem estar deprimidas e acinzentadas (Perez et al., 2002). Além disto, pode ser encontrada lesão residual caracterizada pela presença de áreas de cavitações devido à perda da substância cinzenta cortical (Rissi et al., 2006). As lesões macroscópicas no SNC aparentemente não têm relação com o tempo de evolução da doença (Elias et al., 2004; Rissi et al., 2006). Outras alterações macroscópicas que podem ser evidenciadas são avermelhamento da mucosa nasal, presença de secreção serosa e aumento dos linfonodos retrofaríngeos e mediastínicos (Carrillo et al., 1983 *apud* Rissi et al., 2006) e broncopneumonia (Belknap et al., 1994; Meyer et al., 2001).

2.5.2.5 Histopatologia

Os animais afetados pelo BoHV-5 apresentam meningoencefalite não-suprativa necrosante, de localização e intensidade variáveis de acordo com a seção histológica e o caso analisado, podendo apresentar áreas de malacia (Salvador et al., 1998; Colodel et al., 2002; Elias et al., 2004; Rissi et al., 2006). Alterações recentes apresentam necrose neuronal aguda, caracterizada pela presença de neurônios com núcleos picnóticos e citoplasma acidofílico e encolhido (neurônios vermelhos), edema, tumefação do endotélio vascular, infiltrado inflamatório mononuclear ou misto, nos espaços de Virchow-Robin (manguitos perivasculares), no neurópilo ou nas meninges e, em alguns casos, infiltrado de células polimorfonucleares (d'Offay et al., 1995; Salvador et al., 1998; Meyer et al., 2001; Peres et al., 2002; Elias et al., 2004; Riet-Correa et al., 2006; Barros et al., 2006; Rissi et al., 2006; Aquino Neto et al., 2009; Lunardi et al., 2009; Arruda et al., 2010). Com a evolução das lesões pode ser evidenciada a presença de malacia, caracterizada pela necrose do tecido neuroectodémico com manutenção das células do componente mesenquimal e infiltrado de macrófagos com citoplasma espumoso (células *Gitter*) ou pode ser

verificada a presença de lesão residual, onde apenas estruturas vasculares e poucas células *gitter* são encontradas na avaliação microscópica (Rissi et al., 2006). Corpúsculos de inclusão intranucleares eosinofílicos em astrócitos e neurônios podem ser encontrados em alguns animais afetados (Lemos, 2005; Barros et al., 2006), mas nem sempre estão presentes (Aquino Neto et al., 2009). Frequentemente os corpúsculos são mais numerosos em áreas de malacia (Elias et al., 2004, Rissi, 2006) ou de inflamação (Colodel et al., 2002).

Baseado nos achados clínico-epidemiológicos, de necropsia e histopatológicos pode ser realizado o diagnóstico provisório de meningoencefalite por BoHV-5 (Salvador et al., 1998; Colodel et al., 2002). Entretanto, o diagnóstico definitivo pode ser realizado na presença dos CI na histopatologia. Devido a presença de corpúsculos de inclusão ser muito variável (Rissi et al., 2007), a ausência destes, não exclui o diagnóstico de boHV-5, que deverá ser confirmado pelo isolamento viral associado à detecção por Ac monoclonais ou pela detecção do material genético do vírus pelas técnicas moleculares (Barros et al., 2006; Cunha, 2010). Além disto, o diagnóstico pode ser confirmado pela realização da imunoistoquímica e da PCR do tecido fixado em formol e incluído em parafina (Cagnini et al., 2009).

2.5.2.6 Imunoistoquímica

Os anticorpos monoclonais (AcM) específicos capazes de diferenciar o BoHV-1 e o BoHV-5 podem ser utilizados em uma variedade de técnicas imunológicas para o diagnóstico e pesquisas envolvendo os vírus (Chung et al., 1994; Chowdhury, 1995; d'Offay et al., 1995; Ely et al., 1996; Meyer et al., 1996; Roehe et al., 1997; Salvador et al., 1998; Meyer et al., 2001; D'Arce et al., 2002; Souza et al., 2002; Spilki et al., 2003; Kunrat et al., 2004; Oldoni et al., 2004; Sá e Silva et al., 2007b).

Muitas pesquisas envolvendo os herpesvírus bovino 1 e 5 foram desenvolvidas com o uso de anticorpos monoclonais. Os AcM foram utilizados na identificação dos agentes após o isolamento viral pelas técnicas de imunofluorescência indireta ou imunoperoxidase (d'Offay et al., 1995; Ely et al., 1996; Roehe et al., 1997; Salvador et al., 1998; Meyer et al., 2001; Souza et al., 2002; Kunrat et al., 2004; Oldoni et al., 2004; Sá e Silva et al., 2007b). Além disto, a imunoistoquímica com o uso de anticorpos monoclonais foi considerada

um método adequado para a identificação do agente em amostras fixadas em formol por Hübner et al. (2005b). Vários trabalhos foram bem sucedidos ao utilizarem a imunoistoquímica para realizar o diagnóstico de BoHV-5 (Chung et al., 1994; d'Offay et al., 1995; Ely et al., 1996; Meyer et al., 1996; Meyer et al., 2001; Oldoni et al., 2004; Hübner et al., 2005).

O número de testes imunoistoquímicos oferecidos pelos laboratórios de medicina veterinária para o diagnóstico de doenças infecciosas e neoplasias tem aumentado exponencialmente na última década (Ramos-Vara et al., 2008). Neste contexto, diferentes protocolos imunoistoquímicos (IHQs) e anticorpos têm sido empregados no diagnóstico da meningoencefalite pelo BoHV-5 (Chung et al., 1994; d'Offay et al., 1995; Meyer et al., 1996; Meyer et al., 2001; Oldoni et al., 2004; Hübner et al., 2005). O quadro 1 apresenta os protocolos IHQs utilizados para o diagnóstico de BoHV-5.

Nos trabalhos realizados por d'Offay et al. (1995), utilizando o anticorpo monoclonal (AcM) L6G, e Hübner et al. (2005), utilizando o AcM 2F9, os antígenos virais foram detectados no citoplasma e no núcleo de neurônios, células gliais e células mononucleares do infiltrado perivascular. Resultado semelhante foi descrito por Ely et al. (1996), que relataram marcação nuclear e citoplasmática positiva em neurônios e células mononucleares do infiltrado perivascular ao utilizarem o AcM L6G. Segundo d'Offay et al. (1995), Meyer et al. (1996) a marcação imunoistoquímica esteve mais presente no córtex telencefálico e foi maior nas áreas com lesão histopatológica mais acentuada. Meyer et al. (2001) identificaram extensas áreas de marcação citoplasmática positiva em neurônios no córtex anterior e dorso-lateral ao utilizarem o AcM 2915. Estes autores descreveram apenas 1 a 3 focos de neurônios positivos no córtex posterior e o tronco encefálico. Oldoni et al. (2004) verificaram marcação imunoistoquímica em neurônios e células da glia quando marcaram cérebros de animais com o AcM 2F9. Em suma, a marcação imunoistoquímica pode ser evidenciada no citoplasma e no núcleo de neurônios, células gliais e células mononucleares do infiltrado perivascular, especialmente no citoplasma de neurônios. As regiões mais afetadas são as regiões do córtex telencefálico frontal e parietal.

2.5.2.7 Molecular

O diagnóstico molecular tem revolucionado a prática clínica frente às doenças infecciosas. Seus efeitos são significativos nos cuidados com pacientes onde ferramentas precisas e rápidas são fundamentais para as decisões sobre o tratamento e resultados (Yang e Rothman, 2004). Diversas técnicas moleculares têm sido empregadas em pesquisas e no diagnóstico da meningoencefalite por BoHV-5, dentre elas: a PCR (Vogel et al., 2003; Costa et al., 2005; Isernhagen, 2005; Ferrari et al., 2007; Sá e Silva et al., 2007ab; Rissi et al., 2008; Cunha et al., 2009; Cagnini et al., 2009; Lisboa et al., 2009; Arruda et al., 2010; Pedraza et al., 2010); a PCR multiplex (Alegre et al., 2001; Claus et al., 2005, 2007; Lunardi et al., 2009); a PCR nested (Ashbaugh, et al., 1997; Cascio et al., 1999; Gomes et al., 2002; Mayer et al., 2006; Diel et al., 2007; Campos et al., 2009; Santos, 2010); a RAPD (Afonso et al., 2007); a análise de restrição genômica (d'Offay et al., 1993, 1995; Ros e Belak, 1999; Valera et al., 2000; Meyer et al., 2001; D'Arce et al., 2002) e a hibridização in situ (Chowdhury et al., 1997; Silva et al., 1999a; Caron et al., 2002; Perez et al., 2003).

O diagnóstico de meningoencefalite por BoHV-5 pode ser feito com base nas características clínico-epidemiológicas, nos achados de necropsia e histopatológicos (Salvador et al. 1998, Colodel et al. 2002, Elias et al. 2004, Rissi et al. 2006), associados ao isolamento do vírus em seções do encéfalo ou nas secreções nasais seguido do uso de IFA e IPX (Franco e Roehe, 2007). No entanto, para que o isolamento viral seja bem sucedido é importante que o material seja coletado e remetido congelado ou refrigerado ao laboratório (Colodel et al. 2002). Todavia, a conservação do material coletado nem sempre é realizada de maneira adequada, podendo comprometer o resultado do isolamento viral. Nestes casos, deve-se recorrer às técnicas de detecção de antígenos ou a PCR, pois as chances de se confirmar o diagnóstico são maiores (Franco e Roehe, 2007).

A PCR permite a análise de material fixado em formalina e incluído em parafina, podendo ser uma ferramenta importante para realizar o diagnóstico de casos onde não foram armazenadas amostras congeladas e auxiliar em estudos retrospectivos da doença (Ferrari et al., 2007; Arruda et al., 2010). As tabelas 1, 2 e 3 resumem os aspectos principais relacionados às publicações

utilizando a PCR, a PCR Multiplex e a PCR Nested para o diagnóstico da infecção pelo BoHV-5, respectivamente.

2.5.2.8 Diagnóstico diferencial

Devido à semelhança clínica da meningoencefalite com outras doenças do SNC de bovinos (Claus et al., 2002), doenças como a raiva, a PEM, a leucose enzoótica bovina, a meningoencefalite tromboembólica, a FCM, a doença de Aujeszky, a listeriose, a babesiose cerebral e a BSE devem ser incluídas como diagnósticos diferenciais na avaliação clínica (Claus et al., 2002). Neste contexto, torna-se fundamental associar os achados clínicos, epidemiológicos e os resultados de exames complementares para realizar o diagnóstico conclusivo de meningoencefalite por BoHV-5.

Quadro 1. Protocolos imunoistoquímicos para o diagnóstico da meningoencefalite pelo BoHV-5 descritos na literatura entre os anos de 1994 e 2005.

Referência	Recuperação Antigénica		Bloqueio de proteínas		Ac 1 ^{ário}		Ac 2 ^{ário}		Técnica IHQ		Revelação		Resultado da marcação
	Tipo	Tempo T (°C)	Tipo	Tempo T (°C)	Nome	Tempo T (°C)	Tipo	Tempo T (°C)	Tempo T (°C)	T (°C)	Tipo	T (°C)	
Chung et al., 1994	nd		Soro normal equino 10% Água oxigenada 1%	20' 30'	37°C nd	O7E L6G	A	45-60'	37°C	ABC 45-60'	DAB	20'	O7E - núcleo de neurônios L6G - núcleo/citoplasma de neurônios
d'Offay et al., 1995	Proteinase K (25µg/ml)	8'	37°C	nd	nd	nd	L6G	B	nd	nd	DAB	sf	Núcleo/citoplasma de neurônios e cél. da glia
Ely et al., 1996	Proteinase K	8'	37°C	nd	nd	nd	L6G	B	nd	nd	DAB	sf	Núcleo/citoplasma de neurônios e cél. da glia
Meyer et al., 1996	nd	nd	nd	60'	nd	nd	mc 2109	C	60'	37°C	DAB	sf	Núcleo/citoplasma de neurônios e cél. da glia
Meyer et al., 2001	Proteinase K	10'	nd	10'	nd	nd	2915	D *	20'*	35°C *	AEC	20' *	Citoplasma de neurônios
Vogel et al., 2003	Proteinase K (25µg/ml)	8'	37°C	30'	amb	amb *	2F9	G	15'*	nd *	DAB	nd	Núcleo/citoplasma de neurônios e células da glia
Oldoni et al., 2004	Proteinase K (25µg/ml)	8'	37°C	5'	nd	nd	2F9	E	nd	37°C	DAB	3'	Núcleo/citoplasma de neurônios e células da glia
Hübner et al., 2005	Protease 0,1% Protease 0,2% Proteinase K 0,025% Proteinase K 0,05%	15' 15' 15' 15'	37°C 37°C 37°C 37°C	30' 5' 60' 60'	amb amb amb amb	amb	2F9** 4E4	F	30'	nd	DAB	nd	Núcleo/citoplasma de neurônios, células da glia e infiltrado mononuclear perivascular

A) IgG de cavalo biotinilado anti-camundongo; B) IgG de cabra biotinilado anti-camundongo; C) IgG de ovino biotinilado anti-camundongo; D) Biotinilado Ig Link (IgG de cavalo anti-camundongo; IgM de cabra anti-camundongo e IgG de cabra anti-coelho; E) Anticorpo secundário anti-camundongo conjugado a peroxidase (Sigma®); F) anti-IgG de camundongo ou anti-IgG de coelho conjugado à biotina. G) IgG biotinilada anti-coelho, anti-mouse, anti-cabra (Dako® LSAB+ System-HRP). * Instruções do Kit comercial AEC (Dako Envision®); ** reação de máxima intensidade de coloração específica; nd = não descrito; sf = segundo instruções do fabricante; amb = ambiente.

Tabela 1. Técnicas moleculares, oligonucleotídeos iniciadores (primers), alvos, tamanho dos produtos e tecidos analisados para o diagnóstico do BoHV-5 descritos na literatura entre os anos de 1997 e 2011.

Referência	Técnica	Oligonucleotídeos iniciadores	Alvo	Produto	Amostra
Vogel et al., 2003 *	PCR	F 5'-GTG GTG GCC TTT GAC CGC GAC-3' R 5'-GCT CCG GCG AGT AGC TGG TGT G-3'	gB ^b	273 pb ^b	Encéfalo (TF)
Costa et al., 2005 *	PCR	F 5'-AAG TGC ACA CCG TGT TAT TTG CG-3' R 5'-TTG CAT TAC TTT TGG GGT CAA ATG TG-3'	gB ^a	352 pb ^b	Cultivo celular
Isernhagen, 2005		F 5'-CGG ACG AGA AGC CCT TGG-3'			Encéfalo (TF)/LCR
Ferrari et al., 2007					
Cunha, 2010	PCR	R 5'-AGT GCA CGT ACA GCG GCT CG-3'	gC ^b	159 pb ^b	Encéfalo (FFEP)
Cagnini, 2011					Encéfalo (FFEP)
Sá e Silva et al., 2007a		F 5'-GCG GGG GCT CGC CGA GGA-3'			Cultivo celular
Sá e Silva et al., 2007b	PCR		gC ^b	589 pb ^b	Cultivo celular
Rissi et al., 2008		R 5'-GGA GCG CAC GGT CAG GGC-3'			Cultivo celular
Alegre et al., 2001 *	PCR multiplex (BoHV-1 e 5)	F 5'-AGA CCC CAG TTG TGA TGA ATG C-3' a R 5'-ACA CGT CCA GCA CGA ACA CC-3' a F 5'-GCC CGC AGT TTC CCC TAC C-3' b R 5'-CGC ACC CGC TCT CAA TCT T-3' b	TK ^a gD ^b	183 pb ^a 564 pb ^b	Encéfalo (TF) Secreção nasal Sêmen

TF = tecido fresco; TC = tecido congelado; FFEP = Fixado em formalina e embebido em parafina; ^a = Primer BoHV-1; ^b = Primer BoHV-5; ^c = Primer consenso; ^d = Primer externo; * = desenhou o primer; LCR = líquido cefalorraquidiano; nd = não descrito.

tabela 1. continuação...

Claus et al., 2005 *	F 5'-CAA CCG AGA CGG AAA GCT CC-3' a	Encéfalo, rim, ... (TF)
Claus et al., 2007	PCR multiplex	354 pb ^a Encéfalo (TC)
Lunardi et al., 2009	(BoHV-1 e 5) F 5'-CGG ACG AGA CGC CCT TGG-3' b	gC Encéfalo (TF)/LCR
Lisboa et al., 2009		159 pb ^b Encéfalo (TF)/LCR
Arruda et al., 2010	R 5'-AGT GCA CGT ACA GCG GCT CG-3' c	Encéfalo (FFEP)
Ashbaugh, et al., 1997 *	F 5'-GCG GGG GCT CGC CGA GGA-3'	
	R 5'-GGG AGC GCA CGG TCA GGG GC-3'	589 pb ^b Encéfalo (TC e FFEP)
	F 5'-CTC GCC TCC GCC CTC CCC GTG-3' a	
	R 5'-AGG CCG CCC GCC GCT AG-3' a	gC Encéfalo (TC)
Cascio et al., 1999	F 5'-TTG CCC CCG CCT TCG CTT TCG-3' b	166 pb ^b Gânglios de Gasser (TC)
	R 5'-GCG TCC CCA AGG GCG TCT CGT C-3' b	Secreção nasal
	F 5'-GCT GTT TTG GGG CGC CCC GCG-3'	
	R 5'-GTA GGG GAA ACT GCG GGC AGA-3'	1297 pb ^d
Gomes et al., 2002 *	PCR nested	gG Encéfalo (TC e FFEP)
	F 5'-TAC GGA CTG CCG GAT TAA CA-3'	
	R 5'-GTC ACC ACT ACC ACC GCC GCC AAC AT-3'	222 pb ^b

TF = tecido fresco; TC = tecido congelado; FFEP = Fixado em formalina e embebido em parafina; ^a = Primer BoHV-1; ^b = Primer BoHV-5; ^c = Primer consenso; ^d = Primer externo; * = desenhou o primer; LCR = líquido cefalorraquidiano; nd = não descrito.

tabela 1. continuação...

Gomes et al., 2003	PCR nested	F 5'-GCT GTT TTG GGG CGC CCC GCG-3'	gG	1297 pb ^{b, d}	Sêmen
		R 5'-GTA GGG DAA ACT GCG GGC AGA-3'			
		F 5'-CCG GCG ATT ACG AGG ACG AG-3'			
		R 5'-TGC GGG CAG ACG CCG GCG CG-3'			
		F 5'-TAC GGA CTG CCG GAT TAA CA-3'			
Mayer et al., 2006		R 5'-GTC ACC ACT ACC ACC GCC AAC AT-3'		222 pb ^b	
		F 5'-CCA GTC CAG GCA ACC GTC AC-3'			
Diel et al., 2007	PCR nested	R 5'-CTC GAA AGC CGA GTA CCT GCG 3'	gB ^b	444 pb ^d	Encéfalo e GG (TF)
		F 5'-GTG GTG GCC TTT GAC CGC GAC-3'			
		R 5'-GCT CCG GCG AGT AGC TGG TGT G-3'			
Santos, 2010	PCR nested	F 5'-CGG CCA CGA CGC TGA CGA-3'	gC	572 pb b	Gânglios de Gasser (TC)
		R 5'-CGC CGC CGA GTA CTA CCC-3'			
		F 5'-GTG GAG CGC CGC TTC GC-3'			
		R 5'-TAT CGC GGA GAG CAG GCG-3'			
Pedraza et al., 2010	PCR nested	F 5'-CCG GCG ATT ACG AGG ACG AG-3'	gG	592 bp b, d	Encéfalo (FFEP)
		R 5'-TGC GGG CAG ACG CCG GCG CG-3'			
		F 5'-TAC GGA CTG CCG GAT TAA-3'			
		R 5'-GTC ACC ACT ACC ACC GCC AAC-3'			

TF = tecido fresco; TC = tecido congelado; FFEP = Fixado em formalina e embebido em parafina; ^a = Primer BoHV-1; ^b = Primer BoHV-5; ^c = Primer consenso; ^d = Primer externo; * = desenhou o primer; LCR = líquido cefalorraquidiano; nd = não descrito.

3. Objetivos

- 1) Descrever as lesões histopatológicas do sistema nervoso central de bovinos infectados experimentalmente pelo BoHV-5;
 - 2) Verificar a presença do vírus em diferentes áreas do sistema nervoso central e no gânglio de Gasser, utilizando-se a técnica de imunoistoquímica no material fixado em formol e incluído em parafina, proveniente da infecção experimental por BoHV-5;
 - 3) Detectar a presença do vírus em diferentes áreas do sistema nervoso central e no gânglio de Gasser, utilizando-se a técnica de PCR no material fixado em formol e incluído em parafina, proveniente da infecção experimental por BoHV-5;
 - 4) Utilizar as técnicas de imunoistoquímica e PCR como meios diagnósticos para meningoencefalite por BoHV-5 em material fixado em formol e incluído em parafina.
 - 5) Comparar as alterações histopatológicas com os resultados das análises imunoistoquímicas e da PCR
 - 6) Comparar as alterações histopatológicas com os aspectos clínicos da infecção experimental pelo BoHV-5.
-

4. Material e Métodos

4.1 Amostras utilizadas no estudo

Foram utilizados blocos de parafina dos encéfalos de seis bezerros mestiços de leite (enumerados de 1 a 6), com aproximadamente 10 meses de idade, inoculados com BoHV-5 pela via intranasal com instilação de 0,5 mL do inóculo em cada narina, totalizando uma dose viral de $10^{7,42}$ DICT₅₀ (dose infectante para 50% dos cultivos celulares). Os animais inoculados descritos acima fizeram parte de uma tese de doutorado realizada previamente em nosso laboratório defendido por Cunha, (2010) (Fapesp, nº 2006/05836-6). Os animais foram inoculados com a estirpe viral AA PAR (Souza et al. 2002) isolada do cérebro de um bovino apresentando sinais de encefalite cedida pelo Laboratório de Virologia Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina. Os animais utilizados no experimento apresentavam sorologia negativa para anticorpos séricos contra o herpesvírus bovino 1 e 5 detectados por vírus neutralização. Os animais foram examinados diariamente no piquete avaliando-se temperatura retal, frequência cardíaca e respiratória, motricidade ruminal, presença de secreção nasal e/ou ocular e de sinais neurológicos. As amostras de sangue para realização do hemograma, fibrinogênio e proteína plasmática foram colhidas antes da inoculação (M0) e depois com intervalos de 96 horas, totalizando sete momentos (M1, M2, M3, M4, M5, M6 e M7). As dosagens do sulfeto de hidrogênio ruminal (H₂S ou gás sulfídrico) e as aferições do pH ruminal foram realizadas semanalmente. As amostras do líquido cefalorraquidiano (LCR) dos bezerros foram colhidas nos dias 10^o, 17^o, 24^o e 30^o pós-inoculação (p.i) ou quando os mesmos apresentassem sinais neurológicos. Durante este período, o animal 1 apresentou sinais clínicos neurológicos no 12^o dia pós-infecção (p.i.) e foi sacrificado *in extremis* e o animal 2 desenvolveu quadro de morte súbita e foi encontrado morto no piquete no início da manhã do 21^o dia p.i.. Os demais animais não apresentaram sinais clínicos neurológicos e foram eutanasiados após 30 dias p.i. com cloridrato de xilazina (0,10 mg/kg por via intravenosa), tiopental sódico (8 mg/kg por via intravenosa) e por último solução hipersaturada de cloreto de potássio. Exceto o animal 2, todas as necropsias foram realizadas imediatamente após a morte dos animais e os tecidos foram

colhidos e fixados em solução de formalina tamponada a 10% pelo período de 7 dias.

4.2 Histopatologia

Para o exame histopatológico foram colhidas amostras de 18 regiões do SNC: bulbo olfatório direito (D) e esquerdo (E), córtex frontal D e E (na altura do joelho do corpo caloso), córtex parietal D e E, córtex occipital D e E, núcleos da base D e E, tálamo D e E, mesencéfalo na altura dos colículos rostrais, ponte com pedúnculos cerebelares, bulbo, cerebelo e medula cervical. Adicionalmente, foram examinados em monobloco o gânglio de Gasser (trigêmeo), a *rete mirabile* e a hipófise. Após a fixação em formalina tamponada a 10% por 7 dias as seções do SNC dos bovinos inoculados com o BoHV-5 foram incluídas em parafina e os blocos histológicos seccionados em micrótomo automático (Leica 2155) com espessuras de cinco μm , dispostos em lâminas histopatológicas, sendo posteriormente coradas pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE).

Na análise histopatológica, os seguintes aspectos foram avaliados para a obtenção da intensidade das lesões: hemorragia, congestão, edema, meningite, gliose focal, gliose difusa, necrose neuronal, neuronofagia, presença de manguitos perivasculares (MPV), quantidade de células *Gitter*, malacia e a presença infiltrado inflamatório a despeito da meningite e dos MPV. Cada aspecto avaliado foi relacionado à seção anatômica examinada, com o objetivo de determinar a localização das lesões produzidas pela doença no SNC, de modo semelhante ao realizado por Rissi et al. (2006) e Sant'Ana et al. (2009). Adicionalmente, a intensidade das lesões foi estabelecida avaliando o percentual de tecido acometido pelas alterações histopatológicas descritas acima, com descrito por Perez et al. (2002). Para isso, considerou-se como lesão discreta (1), quando menos de 25% do tecido estava afetado; moderada (2), para alterações de 25 a 50%; e acentuadas (3), indicando comprometimento acima de 50% do tecido avaliado. De modo resumido, ao final da avaliação, cada região (total de 18/animal) teve 12 aspectos avaliados, recebendo uma nota (0 a 3) para cada aspecto. Para avaliar a intensidade das lesões em cada região fez-se a média dos aspectos por região.

Além disto, foram avaliados qualitativamente o tipo de infiltrado inflamatório e a presença de CI característicos de herpesvírus de acordo com Rissi et al. (2006) e Sant'Ana et al. (2009).

4.3 Imunoistoquímica

As diferentes porções coletadas do SNC dos animais foram submetidas ao exame imunoistoquímico para a realização do diagnóstico de infecção pelo BoHV-5 utilizando-se 2 anticorpos monoclonais (AcM). Inicialmente, o AcM comercial da VRMD, L6G anti-IgG da glicoproteína G foi utilizado segundo descrito por Chung et al. (1994), d'Offay et al. (1995) e Ely et al. (1996). Na segunda etapa, utilizou-se o AcM 2F9 anti-BoHV-5, de acordo com Hübner et al. (2005). Este último foi produzido e cedido pelo Laboratório de Virologia Animal da Universidade Federal de Santa Maria.

4.3.1 Preparação das amostras

Os blocos de parafina foram seccionados em micrótomo automático (Leica 2155) com espessuras de cinco µm e distendidos em lâminas de vidro aderentes com carga positiva (Amitel Com. de Vidros para Laboratório Ltda). As lâminas foram mantidas em estufa com temperatura a 56 °C por 24 horas e transferidas para cubas de vidro vertical a fim de realizar-se a técnica de imunoistoquímica. A remoção da parafina foi realizada mediante imersão em xilol (dois banhos, 30 e 20 minutos), seguida de reidratação dos cortes com graduações descendentes de álcool (álcool absoluto 1, 2 e 3, álcool 95 e 85 – 3 minutos cada). Na sequência, as lâminas foram lavadas 10 vezes em água destilada. Todas as lavagens realizadas entre as etapas foram realizadas com solução de TRIS (pH 7,4).

4.3.2 Recuperação antigênica

A recuperação antigênica foi realizada com proteinase K (25µg/mL diluída em solução de TRIS/EDTA, pH 8,0) por 8 min, para o AcM L6G e por 15 min à 37°C para o AcM 2F9, de acordo com d'Offay et al. (1995) e Hübner et al. (2005), respectivamente.

4.3.3 Bloqueio da peroxidase endógena e de proteínas

Realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3%, por 20 min, para o AcM L6G e a 8% por 30 minutos para o AcM 2F9 de acordo com d'Offay et al. (1995) e Hübner et al. (2005), respectivamente. Além do bloqueio com soro normal de cabra (Dako®) a 2,5% por 40 min (d'Offay et al., 1995), foram realizados mais dois bloqueios de proteínas. As lâminas foram incubadas por 10 minutos com solução de avidina (Dako®), lavadas e reincubadas com solução de biotina (Dako®) por mais 10 minutos, para o bloqueio de biotina endógena. Posteriormente, fez-se o bloqueio de proteínas inespecíficas com leite em pó desnatado a 3% por 60 min.

4.3.4 Anticorpos primários

Para a padronização o AcM L6G foi utilizado nas diluições de 1:50, 1:100, 1:200, 1:500, por 1 hora à 37 °C, 2 horas à 37 °C e *overnight* à 4 °C. Já o AcM 2F9 foi testado nas diluições de 1:100 e 1:200 por 1 hora à 37 °C. Ambos os anticorpos foram diluídos com o diluidor de anticorpos com propriedades redutoras de fundo (Dako® – S3022). Como controle positivo foram utilizadas lâminas histopatológicas do córtex cerebral de um bovino com diagnóstico morfológico de meningoencefalite não-supurativa, realizado no Laboratório de Patologia Veterinária, FMVZ-Unesp, Campus de Botucatu e com isolamento viral e diagnóstico molecular por PCR de BoHV-5 realizados na Laboratório de Virologia Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina. Como controle negativo foram usadas lâminas do encéfalo de um bovino coletado em frigorífico, o qual não apresentou alterações histopatológicas e foi negativo na PCR.

4.3.5 Anticorpo secundário

Foi realizada a incubação com o Ac secundário biotinilado anti-IgG de camundongo, produzido em cabra (Dako®) por 30 min à 27 °C, diluído conforme recomendações do fabricante.

4.3.6 Sistema de detecção e revelação das reações

Foi utilizado um sistema de detecção indireto. Para isso, as lâminas foram incubadas com o complexo peroxidase-estreptavidina-biotina por 30 min. A reação foi revelada com 3',3 –diaminobenzidina (Dako®) por 3 min.

Para finalizar, fez-se a contra-coloração com Hematoxilina de Meyer e, em seguida, as lâminas foram submetidas a bateria de desidratação e montagem com resina (Fisher Scientific Permount Mounting Medium).

4.3.7 Leitura das lâminas

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico considerando-se a área com marcação positiva quando havia marcação citoplasmática bem definida do corpo neuronal, de células da glia ou de células inflamatórias ao redor dos vasos sanguíneos. Alguns neurônios podem apresentar marcação citoplasmática e neuronal. As lâminas tiveram todos os campos avaliados em diferentes aumentos e foram classificadas quanto à quantidade de células marcadas segundo Meyer et al. (2001), do seguinte modo: – (ausência de células marcadas); ± (1 a 5 células marcadas); + (1 a 3 focos de células marcadas na lâmina); ++ (4 a 10 focos de células marcadas na lâmina) e +++ (mais do que 10 focos de células marcadas na lâmina).

4.4 Extração do DNA

As extrações de DNA das amostras de encéfalo foram realizadas utilizando o kit QIAamp® DNA FFPE Tissue (QIAGEN®) para a purificação do DNA genômico de tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina (FFEP). A extração foi realizada segundo protocolo do fabricante como o descrito a seguir.

O excesso de parafina foi retirado utilizando um bisturi, seis cortes de 5 a 10 µm foram adicionados a 1 mL de xilol em um tubo do tipo eppendorf para remover a parafina. Para realizar o corte de cada região limpou-se o micrótomo, um novo par de luvas descartáveis e uma nova navalha histológica foram utilizados com o objetivo de evitar a contaminação entre as amostras. Em seguida, o tubo com o material foi centrifugado a 18.000 G por 2 min e 30 s a 22°C. Um “pellet” foi formado e após a remoção completa do sobrenadante foi adicionado 1 mL de etanol (100%) para remover resíduos de xilol. O

material foi centrifugado a 18.000 G por 2 min e 30 s a 22°C, e novamente o sobrenadante foi dispensado. Os tubos foram abertos e incubados a temperatura ambiente por 10 min. O “pellet” formado foi suspenso em 180 µL de tampão ATL (tampão de lise), seguido da adição de 20 µL de proteinase K. Após misturar o conteúdo no vórtex (Bio Vórtex V1 - Biosan®), o material foi incubado em termobloco (Accu Block™ - Labnet, Inc.) por uma hora a 56°C e, em seguida, por uma hora a 90°C. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de tampão AL, 200 µL de etanol (100%), misturando o conteúdo no vórtex e transferindo-o para a coluna. A coluna foi centrifugada a 16900 G por 1 min e 30s, sendo então transferida para um novo tubo receptor de 2 mL, descartando-se o tubo anterior. Após adicionar 500 µL de tampão AW1 (tampão de lavagem) à coluna, esta foi centrifugada a 6.000 G por 1 min e 30s. Novamente transferiu-se a coluna para um novo tubo de 2 mL, sendo o anterior descartado. Na sequência, foram adicionados 500 µL de tampão AW2 (tampão de lavagem) à coluna, sendo realizada centrifugação a 6.000 G por 1 min e 30s. Em seguida, a coluna foi transferida para outro tubo de 2 mL, descartando-se o tubo anterior, sendo realizada centrifugação a 19.400 G por 3 min e 30 s. Transferiu-se a coluna para um novo tubo de 1,5 mL, onde foram aplicados 80 µL de tampão ATE (tampão de eluição). A coluna foi incubada em temperatura ambiente por 5 min. e centrifugada a 19400 G por 75 s. Em seguida, descartou-se a coluna e o DNA foi congelado a -20 °C.

4.5 PCR

As amostras extraídas foram submetidas à técnica da PCR de modo semelhante ao descrito por Claus et al. (2005), empregando-se oligonucleotídeos iniciadores desenhados com base na sequência do gene que codifica a glicoproteína C. O primer senso B5, específico para o BoHV-5 (5'CGC ACG AGA AGC CCT TGG 3'-nt 322-339) e o primer consenso Bcon [5' AGT GCA CGT ACA GCG GCT CG 3'-nt 461-480 (BoHV-5)] amplificaram fragmento com 159 pares de base (pb) (Claus et al., 2005).

Como controle positivo da PCR utilizou-se a amostra AA PAR, isolada do cérebro de um bovino apresentando sinais de encefalite cedida pelo Laboratório de Virologia Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina (Cunha et al., 2009). A preparação da

reação de PCR foi realizada em fluxo laminar (TROX[®] Technik) com o seguinte protocolo: os 25 µL da reação foram divididos em dois tubos denominados DNA mix e PCR mix. O DNA mix foi composto por 1 µL de cada primer senso e antisenso e 3 µL de água “nuclease free” para cada amostra, totalizando 5 µL que foram dispostos em tubos de 200 µL. O tubo com o PCR mix continha 12,5 µL de enzima GoTaq[®] Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), 0,5 µL de água “nuclease free” e 2 µL de DMSO (Sigma[®]) adicionado após o ciclo de desnaturação inicial. Posteriormente, o mix de DNA e de PCR foram transferidos para outro fluxo laminar (PCR T2 - Pachane[®]). As amostras foram adicionadas aos seus respectivos tubos contendo o DNA mix misturando-as ao DNA mix no vórtex. Em seguida fez-se uma centrifugação breve (*shortspin*) e levou-se os tubos ao termociclador (Mastercycler[®] ep Eppendorf) para o ciclo de desnaturação inicial de 7 minutos a 95°C. Após este ciclo, as amostras foram resfriadas em “cooler” por 2 min e 30 s. Neste momento, acrescentou-se 2µL de DMSO (Sigma) ao PCR mix e 15 µL desta solução aos tubos de PCR. Após misturar o conteúdo no vórtex e centrifugar brevemente, as amostras foram levadas novamente ao termociclador passando por 40 ciclos de 40 segundos a 94°C (desnaturação), 1 minuto a 57,8 °C (anelamento), 1 minuto a 72°C (extensão) e um ciclo de extensão final de 5 minutos a 72°C.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com GelRedTM (Biotium, Halward, CA, USA) e visualizado sob luz ultra-violeta. Os géis foram fotodocumentados no ImageQuant[®] (GE Healthcare).

O produto de PCR do BoHV-5 proveniente dos animais inoculados experimentalmente foi submetido para seqüenciamento (ABI 3500 Sequence Detection System - Applied Biosystems). Para isto, foi realizada a limpeza do produto da PCR positiva de um dos animais usando o kit Invisorb Fragment CleanUp (Invitek[®]). As seqüências obtidas pelo sequenciamento foram comparadas, pelo Blast, com seqüências da glicoproteína C do BoHV-5 depositadas no GenBank (U35883.1).

4.6 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise descritiva, constituída pelo cálculo das médias aritméticas e dos desvios-padrão. Para comparar todos os

resultados da PCR e da IHQ (positivo/negativo) das 108 regiões analisadas com a média dos escores destas áreas usou-se o teste U de Mann-Whitney, no programa SigmaStat 3.5 (Jandel Scientific, San Rafael, CA, EUA). Este mesmo teste foi utilizado para comparar as médias dos escores de lesão do animal 1 (com sinais neurológicos) com os demais animais (sem sinais neurológicos). Para comparar as médias de escores entre os animais, utilizou-se o teste t de Student ou teste U de Mann-Whitney, para as amostras que não passaram no teste de normalidade. Para realizar as análises estatísticas acima foi utilizado o programa SigmaStat 3.5 (Jandel Scientific, San Rafael, CA, EUA). Foi calculado o coeficiente de concordância Kappa do resultado da PCR e da IHQ utilizando o programa SAS (SAS/STAT® Software, 2008). Para realizar a comparação dos resultados da PCR (positivo/negativo) e da IHQ (positivo/negativo) com a presença ou ausência de sinais neurológicos foi utilizado o teste exato de Fisher no programa GraphPad InStat 3 (CA, EUA).

5. Resultados

5.1 Histopatologia

Todos os encéfalos avaliados histologicamente apresentaram alterações inflamatórias com variações de intensidade e localização. As tabelas 2, 3, 4, 5, 6 e 7 (em anexo) apresentam as alterações histopatológicas e a intensidade das lesões encontradas dos animais 1, 2, 3, 4, 5 e 6, respectivamente. A tabela 8 descreve o escore total de lesão por região do encéfalo de cada animal, com as médias e desvios-padrão.

As regiões que apresentaram, em média, maiores escores de lesão foram, em ordem decrescente, o córtex frontal, tálamo, córtex parietal, córtex occipital, bulbo olfatório e núcleos da base (tabela 10). O mesencéfalo, a ponte e o bulbo apresentaram alterações histopatológicas, porém, mais discretas. Não foram verificadas lesões na medula cervical, cerebelo e nos GG.

De maneira geral, as alterações histopatológicas mais frequentes foram, em ordem decrescente, manguitos perivasculares compostos por células mononucleares, edema, gliose difusa (figura 1A), congestão, gliose focal (figura 1B), necrose neuronal, caracterizada pela presença de neurônios com núcleos picnóticos e citoplasma acidofílico e encolhidos (neurônios vermelhos), neuronofagia e infiltrado inflamatório mononuclear (tabela 9). A soma de todas as lesões nas seções do lado direito foi maior do que no lado esquerdo, 356 e 309 (tabela 10), apresentando diferença estatisticamente significativa ($p=0,029$).

A necrose neuronal (figura 2A, B) foi mais intensa, em ordem decrescente, no córtex frontal, parietal, occipital e tálamo (tabela 10). Os animais 1 e 2 apresentaram os maiores escores de necrose neuronal.

Os MPV eram compostos por células mononucleares (figuras 3A, B, C, D). A média dos escores para a presença de manguitos mononucleares demonstrou que as regiões do córtex frontal, tálamo e núcleos basais apresentaram maiores intensidades de lesão para este parâmetro (tabela 11). Verificou-se ainda que os animais 1 e 3 possuíam os maiores escores para a presença de manguitos perivasculares.

Dos seis animais avaliados, quatro apresentaram malacia (figuras 2C, D), distribuídas nas regiões do córtex frontal (2/6 animais), córtex parietal (2/6

animais) e tálamo (4/6 animais). O animal 1 apresentou cinco regiões com malacia moderada, enquanto que no animal 2 apenas uma região de malacia foi evidenciada (moderada no tálamo D). Malacia discreta foi verificada no córtex frontal direito, parietal esquerdo, no tálamo direito do animal 3 e no tálamo esquerdo do animal 4. Não foi encontrada malacia nos animais 5 e 6.

Foram encontrados CI em neurônios e astrócitos (figura 1D) no córtex frontal direito e esquerdo e, no córtex parietal direito do animal 1 (tabela 2). Além disto, o córtex frontal direito e tálamo direito do animal 3 (tabela 4) e córtex frontal direito e tálamo esquerdo do animal 4 apresentaram corpúsculos inclusão (tabela 5). Não foi encontrada associação entre escore de lesão e a presença de CI. Porém, 7 áreas que apresentaram corpúsculos de inclusão, 6 também apresentaram malacia. Meningite mononuclear (figura 1C) foi poucas vezes evidenciada (19/108 seções), sendo classificada como discreta na maior parte das seções analisadas.

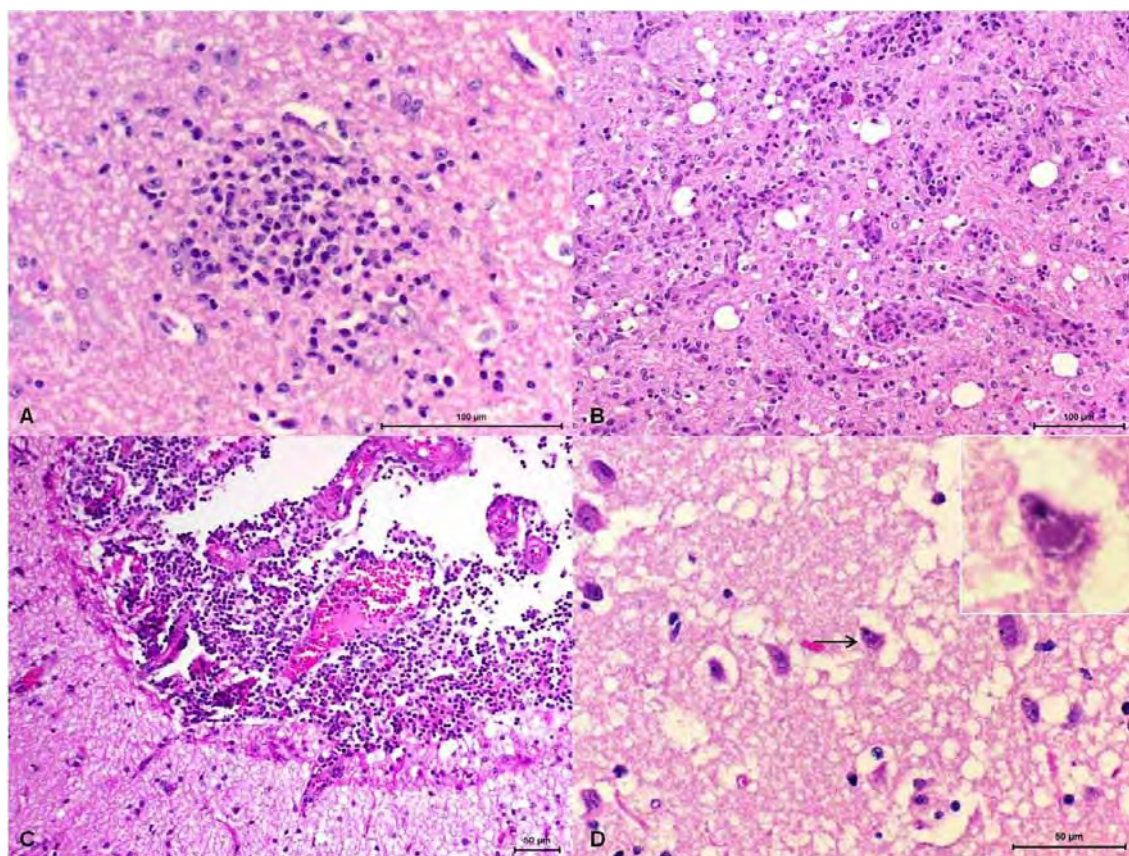


Figura 1. Bovino. Meningoencefalite experimental por BoHV-5. A) Bulbo olfatório, animal 5. Área de gliose focal. HE, obj. 40x; B) Tálamo, animal 6. Área de gliose difusa. HE, obj. 20x; C) Córtex cerebral, animal 5. Meningite mononuclear. HE, obj. 10x. D) Córtex cerebral, animal 1. Corpúsculo de inclusão basofílico intranuclear em astrócito (seta e detalhe). HE, obj. 40x e 1,25x.

A presença de alterações histopatológicas foi maior no animal com sinais neurológicos (animal 1), com a média dos escores de lesão igual a 11,17 (tabela 8), enquanto os animais 2 a 6 (sem alterações neurológicas) apresentaram médias iguais a 7,22, 7,44, 4,94, 4,83 e 5,44. No entanto, diferença estatística significativa foi encontrada apenas entre o animal 1 e os animais 4, 5, 6 (0,05). A soma das alterações microscópicas no bulbo olfatório e no córtex telencefálico foi significativamente maior ($p < 0,001$) comparada a soma das alterações microscópicas nas demais regiões (diencefalo, tronco encefálico, cerebelo e medula cervical) (tabela 8).

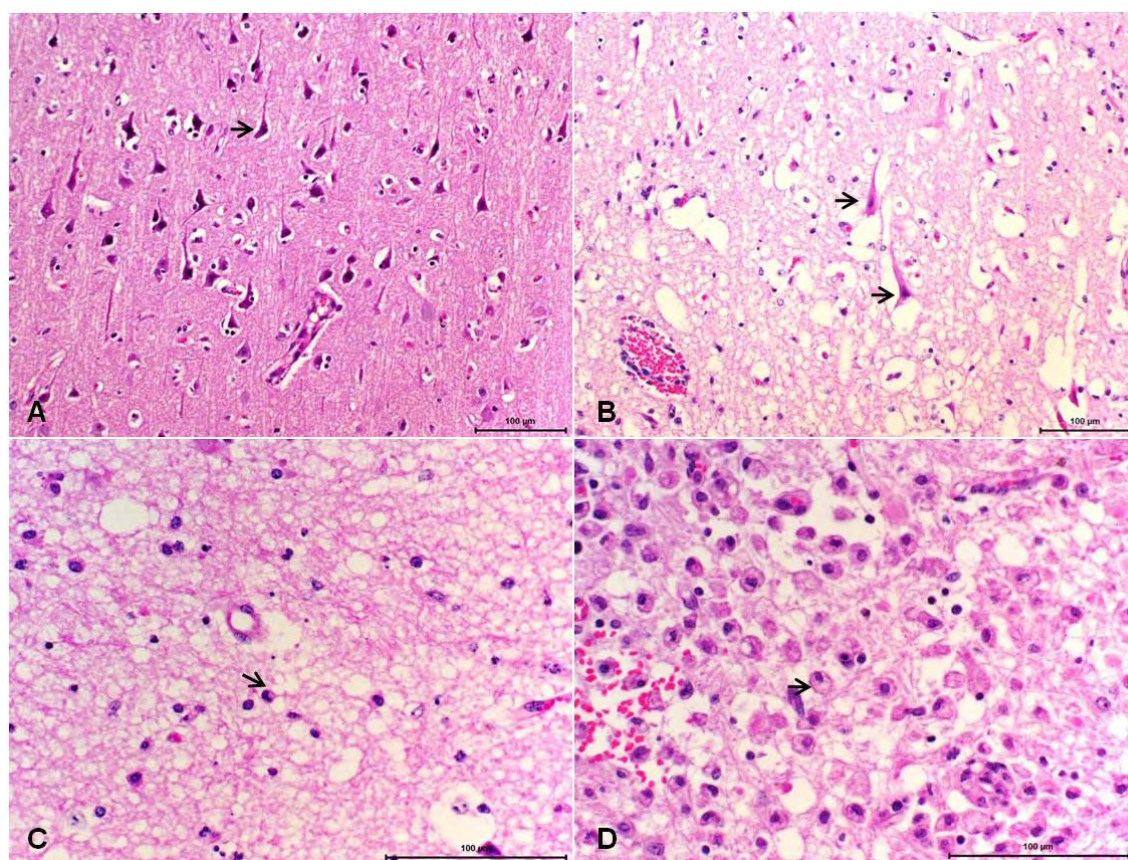


Figura 2. Bovino. Meningoencefalite experimental por BoHV-5. A) Córtex cerebral, animal 2. Necrose cerebrocortical, note os neurônios vermelhos (seta). HE, obj. 20x; B) Córtex cerebral, animal 1. Necrose cerebrocortical em estágio mais avançado. Note a intensa vacuolização do neurópilo e a presença de neurônios vermelhos (seta). HE, obj. 20x; C) Córtex cerebral, animal 1. Lesão inicial de malacia caracterizada pela intensa vacuolização do neurópilo, com necrose e desaparecimento dos corpos neuronais e infiltração discreta de células Gitter (seta) e células inflamatórias mononucleares. HE, obj. 40x. D) Tálamo, animal 1. Área de malacia com presença de células Gitter (seta). HE, obj. 40x.

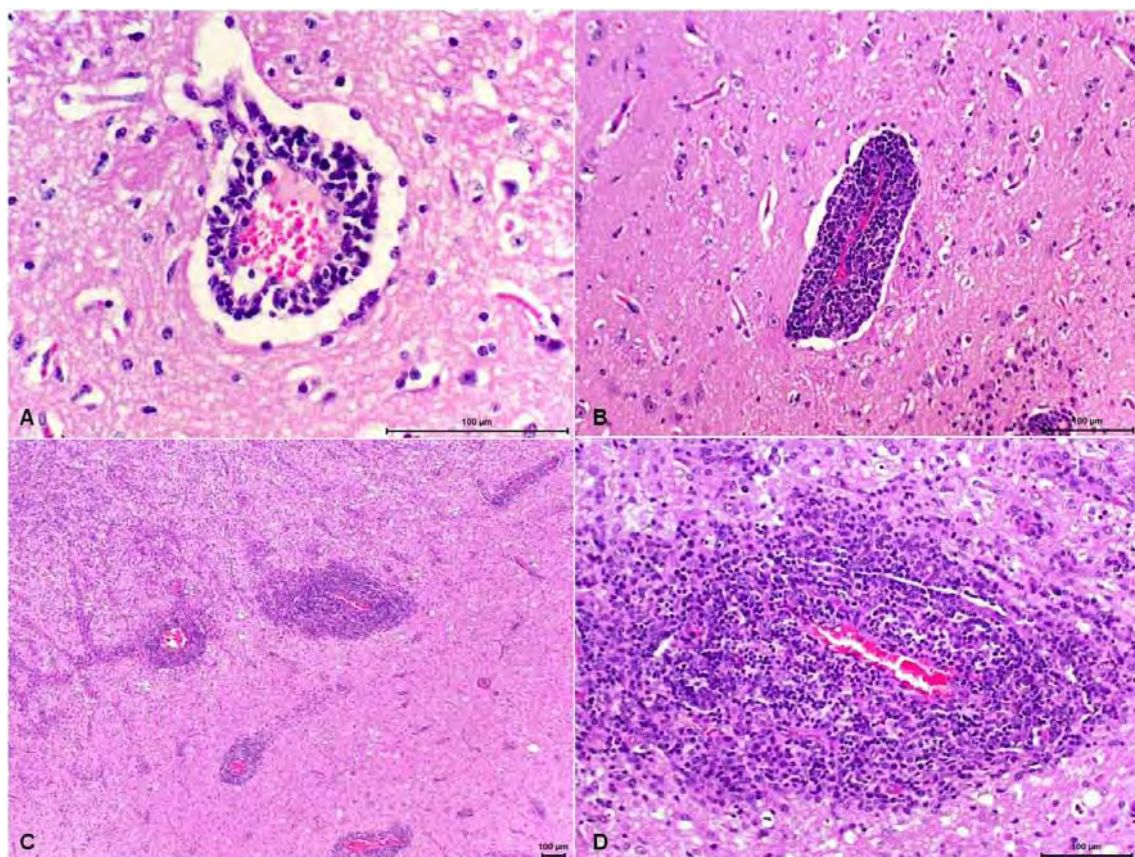


Figura 3. Bovino. Meningoencefalite experimental por BoHV-5. A) Núcleos da base, animal 3. Manguito perivascular com 4-5 camadas de células mononucleares. HE, obj. 40x; B) Núcleos da base, animal 4. Manguito perivascular com aproximadamente 10 camadas de células mononucleares. HE, obj. 20x; C) Córtex cerebral, animal 3. Vários manguitos perivasculares compostos por células mononucleares. HE, obj. 5x. D) Córtex cerebral, animal 3. Manguito perivascular com mais do que 10 camadas de células mononucleares. HE, obj. 40x.

Tabela 8. Somatório dos escores de lesão por região de cada animal e valor total, médias e desvios-padrão dos escores de lesão por animal.

Áreas**																					
Animal	BO		CF		CP		CO		NB		TÁLAMO		M	P	B	GG	C	MC	Total	Média	s
	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D									
1	10	10	25	25	6	23	6	14	11	12	20	22	7	8	2	0	0	0	201	11,17 ^a	8,64
2	8	9	11	11	9	12	13	15	5	5	5	18	3	3	3	0	0	0	130	7,22 ^{ab}	5,39
3	3	5	12	19	16	9	8	8	3	4	11	16	6	6	6	0	0	0	132	7,33 ^{ab}	5,67
4	4	6	9	9	3	5	4	3	8	4	12	6	4	5	5	0	0	0	87	4,83 ^b	3,24
5	6	6	8	10	9	7	3	4	3	6	7	7	3	5	3	0	0	0	87	4,83 ^b	3,03
6	7	6	9	13	6	9	7	6	6	5	7	7	4	3	3	0	0	0	98	5,44 ^b	3,40
Soma	38	42	74	89	49	65	41	50	36	36	63	77	27	30	22	0	0	0			
Média ***	40		82		57		46		36		70		27	30	22	0	0	0			

** BO. Bulbo olfatório; CF. Córtex frontal; CP. Córtex parietal; CO. Córtex occipital; NB. Núcleos da base; M. Mesencéfalo; P. Ponte; B. Bulbo; GG. Gânglio de Gasser; C. Cerebelo; MC. Medula cervical. *** - média independente do lado. (0) ausência de lesão; (1) lesão discreta, quando menos de 25% do tecido estava afetado; (2) moderada, para alterações de 25 a 50%; (3) acentuadas, indicando comprometimento acima de 50% do tecido avaliado. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa (p < 0.05).

Tabela 9. Somatório dos escores de cada lesão avaliada nos animais 1, 2, 3, 4, 5 e 6, inoculados experimentalmente com o BoHV-5, e as médias e desvios-padrão das lesões.

Lesão*	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6	Média*	dp
Gliose focal	14	9	18	14	12	15	13,7	3,0
Gliose difusa	28	22	12	8	9	11	15,0	8,1
Edema	33	20	16	9	13	14	17,5	8,4
Necrose neuronal	27	20	7	6	13	7	13,3	8,5
Congestão	16	11	14	15	14	15	14,2	1,7
Hemorragia	6	7	5	0	1	3	3,7	2,8
Céls. Gitter	8	2	3	1	0	1	2,5	2,9
Neuronofagia	16	10	12	8	3	9	9,7	4,3
MPV	26	15	27	18	16	16	19,7	5,4
Meningite	2	4	5	5	4	4	4,0	1,1
Malacia	10	2	3	1	0	0	2,7	3,8
Inf. Inflamatório	15	8	10	2	2	3	6,7	5,3

* média dos valores dos 6 animais; ** média dos escores de lesão por animal; MPV - manguito perivascular; dp - desvio-padrão. (0) ausência de lesão; (1) lesão discreta, quando menos de 25% do tecido estava afetado; (2) moderada, para alterações de 25 a 50%; (3) acentuadas, indicando comprometimento acima de 50% do tecido avaliado.

Tabela 10. Presença de necrose neuronal nas diferentes regiões de cada animal.

Áreas	Necrose neuronal						Média*	dp
	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6		
Bulbo Olfatório Esquerdo	2	1	0	0	1	1	0,8	0,8
Bulbo Olfatório Direito	2	1	0	0	1	0	0,7	0,8
Cortex Frontal Esquerdo	3	2	1	1	2	0	1,5	1,0
Cortex Frontal Direito	3	2	1	1	1	2	1,7	0,8
Cortex Parietal Esquerdo	2	2	1	0	2	1	1,3	0,8
Cortex Parietal Direito	3	3	1	0	1	1	1,5	1,2
Cortex Occipital Esquerdo	1	3	0	0	1	0	0,8	1,2
Cortex Occipital Direito	2	3	1	1	1	2	1,7	0,8
Núcleo Basal Esquerdo	1	1	0	0	0	0	0,3	0,5
Núcleo Basal Direito	1	0	0	0	0	0	0,2	0,4
Tálamo Esquerdo	2	0	1	1	1	0	0,8	0,8
Tálamo Direito	2	2	1	0	1	0	1,0	0,9
Mesencéfalo	1	0	0	0	0	0	0,2	0,4
Ponte	2	0	0	1	1	0	0,7	0,8
Bulbo	0	0	0	1	0	0	0,2	0,4
Gânglios de Gasser	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
Cerebelo	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
Medula Cervical	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
Média**	1,5 ^a	1,1 ^a	0,39 ^b	0,33 ^b	0,72 ^b	0,39 ^b		
dp	1,0	1,2	0,5	0,5	0,7	0,7		

* média da alteração por região; ** média da alteração por animal; dp = desvio-padrão; (0) ausência de lesão; (1) lesão discreta, quando menos de 25% do tecido estava afetado; (2) moderada, para alterações de 25 a 50%; (3) acentuadas, indicando comprometimento acima de 50% do tecido avaliado. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$).

Tabela 11. Presença de manguitos perivasculares nas diferentes regiões de cada animal.

Áreas	Manguitos perivasculares						Média*	dp
	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6		
Bulbo Olfatório Esquerdo	1	1	0	1	1	1	0,8	0,4
Bulbo Olfatório Direito	1	1	1	1	1	1	1,0	0,0
Cortex Frontal Esquerdo	2	1	2	2	1	2	1,7	0,5
Cortex Frontal Direito	2	1	3	2	2	2	2,0	0,6
Cortex Parietal Esquerdo	0	0	3	1	1	1	1,0	1,1
Cortex Parietal Direito	3	1	1	1	1	1	1,3	0,8
Cortex Occipital Esquerdo	0	1	2	1	0	1	0,8	0,8
Cortex Occipital Direito	2	1	1	0	0	0	0,7	0,8
Núcleo Basal Esquerdo	3	1	1	2	1	1	1,5	0,8
Núcleo Basal Direito	3	1	1	1	2	1	1,5	0,8
Tálamo Esquerdo	2	1	3	2	2	1	1,8	0,8
Tálamo Direito	3	2	3	1	1	1	1,8	1,0
Mesencéfalo	2	1	2	1	1	1	1,3	0,5
Ponte	1	1	2	1	1	1	1,2	0,4
Bulbo	1	1	2	1	1	1	1,2	0,4
Gânglios de Gasser	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
Cerebelo	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
Medula Cervical	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
Média**	1,4	0,8	1,5	1,0	0,9	0,9		
dp	1,1	0,5	1,1	0,7	0,7	0,6		

* média da alteração por região; ** média da alteração por animal. dp = desvio-padrão; (0) ausência de lesão; (1) lesão discreta, quando menos de 25% do tecido estava afetado; (2) moderada, para alterações de 25 a 50%; (3) acentuadas, indicando comprometimento acima de 50% do tecido avaliado.

5.2 Imunoistoquímica

A técnica de IHQ para o BoHV-5 teve sua eficiência máxima com relação à intensidade e especificidade de coloração e ausência de marcação de fundo incubando-se as lâminas com o Ac primário 2F9 por 1h a 37 °C, na diluição de 1:200 (figura 4B, C). Os testes realizados com o Ac comercial L6G (VRMD) apresentaram marcação neuronal tanto nos controles positivos como nos controles negativos e marcação de fundo em todas as condições testadas (figura 4A). Com isto, optou-se pela utilização do Ac primário 2F9 para avaliar os animais deste estudo.

Todos os animais apresentaram pelo menos duas áreas positivas para a IHQ da gC do BoHV-5. Além disto, a marcação IHQ para o BoHV-5 foi positiva em 35 áreas, do total de 108 áreas analisadas, resultando num percentual de 32,41% de áreas positivas. Destas, 40% foram evidenciadas no animal 1, o qual teve 77,78% (14/18) de áreas positivas para a marcação com o anticorpo 2F9. Os demais animais (2 a 6) apresentaram 33,33% (6/18), 27,78% (5/18), 22,22% (4/18), 22,22% (4/18) e 11,11% (2/18) de positividade para a imunoistoquímica com o Ac 2F9 (Tabela 11). Ao somar os percentuais dos animais 1 e 2 verifica-se que estes representam 57,14% (20/35) das áreas positivas para IHQ para o BoHV-5.

Ao comparar as áreas positivas e negativas na IHQ com relação às médias dos escores de lesão verificou-se que as áreas positivas apresentaram escore médio de lesão (9,0) significativamente maior ($p < 0,001$) do que as áreas negativas (5,0). A média dos escores de lesão das áreas positivas na IHQ que receberam de uma a três cruzes (+, ++, +++) apresentaram diferença significativa ($p=0,002$) quando comparadas as médias das áreas com 1-5 células positivas por lâmina (+/-). Ao comparar o número de áreas positivas do animal 1 com os demais animais, por indivíduo, verificou-se a presença de diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o animal 1 e os demais animais. Ao comparar a distribuição das áreas positivas e negativas das regiões do bulbo olfatório e do córtex telencefálico (regiões dorsal e cranial do encéfalo) com as demais regiões (diencéfalo, tronco encefálico, cerebelo e medula cervical) verificou-se que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as regiões.

Tabela 12. Resultados do exame imunoistoquímico utilizando o anticorpo monoclonal (2F9) anti-BoHV-5, nas 18 áreas avaliadas do encéfalo de 6 bovinos infectados experimentalmente pelo BoHV-5.

Bovino	Áreas																		Total		%
	BOE	BOD	CFE	CFD	CPE	CPD	COE	COD	NBE	NBD	TE	TD	M	P	B	GG	C	MC	positivos	áreas	
1	+-	+	+++	+++	-	++	+++	+	+	+-	+++	++	+-	+-	+-	-	-	-	14	18	77,78 ^a
2	+-	+-	-	+-	+-	-	-	+-	-	-	+-	-	-	-	-	-	-	-	6	18	33,33 ^b
3	-	-	-	-	+-	-	-	-	-	+-	+-	+-	+-	-	-	-	-	-	5	18	27,78 ^b
4	+-	-	+-	-	-	-	-	-	-	-	+-	+-	-	-	-	-	-	-	4	18	22,22 ^b
5	-	-	-	-	+-	-	-	-	-	+-	+-	+-	-	-	-	-	-	-	4	18	22,22 ^b
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+-	+-	-	-	-	-	-	-	2	18	11,11 ^b
Total	3	2	2	2	3	1	1	1	2	3	6	5	2	1	1	0	0	0	35	108	32,41

- = negativo; ± = 1/5 células/seção; + = 1/3 focos/seção; ++ = 4/10 focos/seção; +++ = >10 focos/seção. ** BO. Bulbo olfatório; CF. Córtex frontal; CP. Córtex parietal; CO. Córtex occipital; NB. Núcleos da base; M. Mesencéfalo; P. Ponte; B. Bulbo; GG. Gânglio de Gasser; C. Cerebelo; MC. Medula cervical. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa (p < 0.05).

5.3 PCR

O resultado da PCR das diferentes regiões do SNC dos seis animais inoculados experimentalmente com BoHV-5 estão dispostos na tabela 12. Todos os animais apresentaram pelo menos 3 áreas positivas na PCR para a região parcial do gene que codifica a gC no BoHV-5. Além disto, das 108 áreas avaliadas, 35,19% (38/108) foram positiva para a PCR do BoHV-5. Destas, 36,84% (14/38) estavam relacionadas a áreas do animal 1 e 28,94% (11/38) ao animal 2. Juntos estes animais representaram 65,78% das áreas positivas na PCR. Os animais 3, 4, 5 e 6 foram positivos para a PCR em 16,67% (3/38), 16,67% (3/38), 16,67% (3/38) e 22,22% (4/18) das áreas avaliadas (Tabela 12). A figura 4D apresenta a imagem do gel mostrando o resultado da PCR do bulbo olfatório direito e esquerdo, do córtex frontal esquerdo do animal 1.

A média dos escores de lesão das áreas positivas na PCR (9,5) foi significativamente maior ($p < 0,0001$) do que a das áreas negativas (5,0). O número de áreas positivas na PCR encontrados no animal 1 apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,001$) quando comparados aos animais 3, 4, 5, e 6. Ao comparar a distribuição das áreas positivas e negativas das regiões do bulbo olfatório e do córtex telencefálico (regiões dorsal e cranial do encéfalo) com as demais regiões (diencéfalo, tronco encefálico, cerebelo e medula cervical) verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) devido ao maior número de áreas positivas estas situado nas regiões dorsal e cranial do encéfalo.

O sequenciamento do produto da PCR do córtex frontal direito animal 1, infectado experimentalmente pelo BoHV-5, apresentou identidade de 98% com a sequência da glicoproteína C do BoHV-5 (U35883.1) em análise realizada no Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

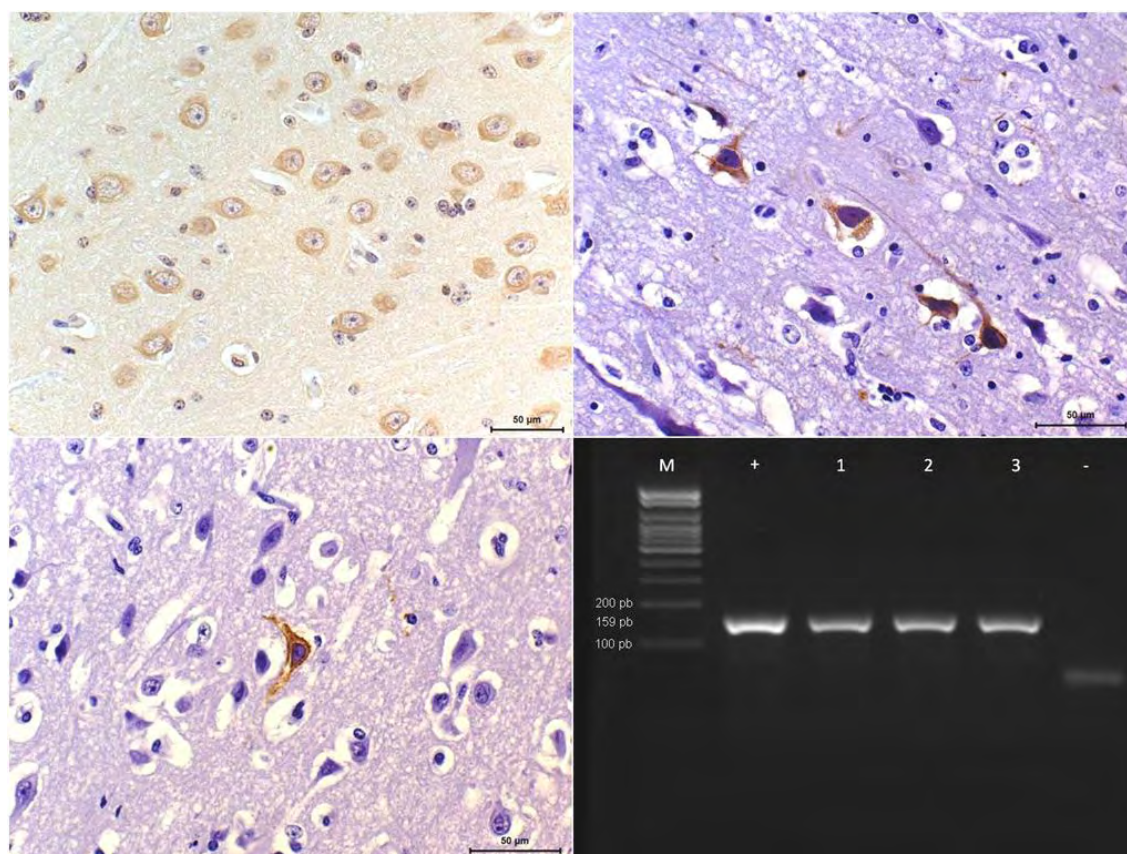


Figura 4. Bovino. Meningoencefalite experimental por BoHV-5. A) Córtex cerebral, marcação do controle negativo com o Ac L6G (Não usado no experimento). Nota-se a marcação do citoplasma dos neurônios (seta) e a presença de marcação de fundo (asterisco). IHQ, ABC, AcM L6G (VRMD[®]), obj. 20x; B) Córtex cerebral, animal 1. Marcação positiva (seta) de neurônios corticais sem a presença de marcação inespecífica. IHQ, ABC, AcM 2F9, obj. 20x; C) Córtex cerebral, animal 2. Marcação positiva (seta) de neurônios corticais sem a presença de marcação inespecífica. IHQ, ABC, AcM 2F9, obj. 20x; D) PCR, animal 1. Imagem de gel de agarose a 1,5% demonstrando o resultado da amplificação em amostras extraídas de blocos de parafina do encéfalo de bovinos para o gene que codifica a gC do BoHV-5 (159 pb). M = marcador de 100 pb (Low Ranger DNA Ladder - Norgen Biotek Corporation); + = controle positivo; 1 = Bulbo olfatório E; 2 = Bulbo olfatório D; 3 = Córtex frontal E; – = controle negativo.

Tabela 13. Resultados da PCR específica para o BoHV-5, nas 18 áreas avaliadas do encéfalo de 6 bovinos infectados experimentalmente pelo BoHV-5.

Bovino	Áreas																		Total positivos	Total áreas	%
	B.O.E	B.O.D	C.F.E	C.F.D	C.P.E	C.P.D	C.O.E	C.O.D	NBE	NBD	TE	TD	M	P	B	GG	C	MC			
1	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	14	18	77,78 ^a
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	11	18	61,11 ^{ab}
3	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	18	16,67 ^b
4	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	18	16,67 ^b
5	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	3	18	16,67 ^b
6	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	4	18	22,22 ^b
Total	2	2	5	4	2	2	2	4	3	2	1	2	0	3	1	1	1	1	38	108	35,19

** BO. Bulbo olfatório; CF. Córtex frontal; CP. Córtex parietal; CO. Córtex occipital; NB. Núcleos da base; M. Mesencéfalo; P. Ponte; B. Bulbo; GG. Gânglio de Gasser; C. Cerebelo; MC. Medula cervical.

Tabela 14. Somatório, média e desvio-padrão dos escores de lesão e o número total de áreas positivas na PCR e na imunoistoquímica para o BoHV-5 por região avaliada.

Áreas	Total áreas	Escore de lesão			PCR		%		IHQ		%
		Total	Média	dp	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo	
Bulbo Olfatório Esquerdo	6	38	6,3	2,74	2	4	33,3	3	3	50,0	
Bulbo Olfatório Direito	6	42	7,0	2,23	2	4	33,3	2	4	33,3	
Cortex Frontal Esquerdo	6	74	12,3	7,54	5	1	83,3	2	4	33,3	
Cortex Frontal Direito	6	89	14,8	7,15	4	2	66,7	2	4	33,3	
Cortex Parietal Esquerdo	6	49	8,2	5,02	2	4	33,3	3	3	50,0	
Cortex Parietal Direito	6	65	10,8	7,76	2	4	33,3	1	5	16,7	
Cortex Occipital Esquerdo	6	41	6,8	4,63	2	4	33,3	1	5	16,7	
Cortex Occipital Direito	6	50	8,3	6,15	4	2	66,7	1	5	16,7	
Núcleo Basal Esquerdo	6	36	6,0	3,10	3	3	50,0	2	4	33,3	
Núcleo Basal Direito	6	36	6,0	3,03	2	2	33,3	3	3	50,0	
Tálamo Esquerdo	6	63	10,5	5,50	2	2	33,3	6	0	100,0	
Tálamo Direito	6	77	12,8	7,34	1	5	16,7	5	1	83,3	
Mesencéfalo	6	27	4,5	1,64	0	6	0,0	2	4	33,3	
Ponte	6	30	5,0	1,90	3	3	50,0	0	6	0,0	
Bulbo	6	22	3,7	1,51	1	5	16,7	1	5	16,7	
Gânglios de Gasser	6	0	0,0	0,00	1	5	16,7	1	5	16,7	
Cerebelo	6	0	0,0	0,00	1	5	16,7	0	6	0,0	
Medula Cervical	6	0	0,0	0,00	1	5	16,7	0	6	0,0	
Total	108				38	66	35,2	35	73	32,4	

dp = desvio padrão; PCR = reação da cadeia da polimerase; IHQ = imunoistoquímica; (0) ausência de lesão; (1) lesão discreta, quando menos de 25% do tecido estava afetado; (2) moderada, para alterações de 25 a 50%; (3) acentuadas, indicando comprometimento acima de 50% do tecido avaliado.

5.4 Comparação entre IHQ e PCR

Foi realizada a comparação dos resultados da PCR (positivo/negativo) e da IHQ (positivo/negativo) com a presença ou ausência de sinais neurológicos. O animal com sinais neurológicos tem mais chances de apresentar PCR e IHQ positivas ($p < 0,05$). Ao calcular o coeficiente de concordância Kappa dos resultados da IHQ, observou-se o valor de Kappa igual a 0,12 quando comparado aos resultados da PCR, demonstrando que as áreas positivas na IHQ não foram, na sua maioria, as mesmas áreas positivas da PCR.

Tabela 15. Comparação dos resultados da PCR e da IHQ com a presença ou ausência de sinais clínicos neurológicos. Teste de Fisher ($p < 0,001$).

		Sinais neurológicos		p	LI (95%)	OR	LS (95%)
		Sim	Não				
PCR	Positiva	14	24	<0,0001	2,88	9,65	32,14
	Negativa	4	66				
IHQ	Positiva	14	21	<0,0001	3,42	11,5	38,72
	Negativa	4	69				

p = grau de significância; OR = odds ratio; LI e LS = intervalo de confiança inferior e superior.

6. Discussão

De acordo com os resultados da avaliação histopatológica encontrados neste experimento às áreas mais adequadas para o diagnóstico microscópico foram o córtex frontal, tálamo, córtex parietal, córtex occipital, bulbo olfatório e os núcleos da base. Estas regiões também apresentaram alterações inflamatórias e/ou degenerativas evidentes em diferentes estudos (Salvador et al., 1998; Meyer et al., 2001; Rissi et al., 2006)

As alterações microscópicas encontradas nos seis animais infectados experimentalmente com o BoHV-5 foram caracterizadas por meningoencefalite não-suprativa, concordando com as descrições na literatura (Bagust et al., 1972; Belknap et al., 1994; Ely et al., 1996; Cascio et al., 1999; Salvador et al., 1998; Rissi et al., 2006, 2008; Arruda et al., 2010).

Estudos prévios observaram a distribuição das alterações histopatológicas associadas à infecção natural (Belknap et al., 1994; Salvador et al., 1998; Perez et al., 2003; Elias et al., 2004; Rissi et al., 2006, 2008) e experimental pelo BoHV-5 em bovinos (Perez et al., 2002; Isernhagen, 2005). No entanto, existem diferenças na idade dos animais, ou na estirpe viral utilizada, na concentração de vírus inoculada, período de avaliação clínica dos animais e alguns trabalhos utilizam dexametasona para baixar a imunidade dos animais, diferente do presente estudo. Além disso as áreas avaliadas na histopatologia nem sempre foram as mesmas, tornando difícil a comparação precisa entre os estudos. Contudo, existem algumas informações passíveis de comparação, as quais serão discutidas nos parágrafos seguintes.

As alterações histopatológicas mais evidentes, em ordem decrescente, foram manguitos perivasculares mononucleares, edema, gliose difusa, congestão, gliose focal, necrose neuronal, neuronofagia e infiltrado inflamatório mononuclear, semelhante aos achados de outros estudos (Ely et al., 1996; Perez et al., 2003; Elias et al., 2004; Salvador et al., 1998; Isernhagen, (2005); Rissi et al., 2006, 2008). Assim como o descrito por Cascio et al. (1999), David et al. (2007) e Rissi et al. (2006, 2008) não foram verificadas lesões na medula cervical, cerebelo e nos gânglios de Gasser. A ganglioneurite dos gânglios de Gasser pode estar ausente (Johnston et al., 1962; Salvador et al., 1998; Cascio et al., 1999, Colodel et al., 2002; Rissi et al., 2006, 2009) ou presente (Ely et

al., 1996; Meyer et al., 2001; Perez et al., 2002; Elias et al., 2004; Spilki et al., 2006) nos casos de meningoencefalite pelo BoHV-5. Lesões na medula cervical foram descritas por Belknap et al. (1994), Elias et al. (2004) e David et al. (2007). Lesões no cerebelo foram relatadas por Belknap et al. (1994), Perez et al. (2002), Elias et al. (2004) Rissi et al. (2006) e Lunardi et al. (2009). No entanto, em alguns casos de doença neurológica fatal causada pelo BoHV-5 podem ser observadas poucas alterações inflamatórias ou até mesmo a ausência destas (Rissi et al., 2008; Flores et al., 2009). Colodel et al. (2002) descreveram um caso de doença neurológica morfológicamente compatível com polioencefalomalacia, devido a presença de necrose cerebrocortical e a ausência de alterações inflamatórias, onde o vírus isolado apresentou efeito citopático em células de cultivo celular e doença neurológica em coelhos experimentalmente infectados. Possivelmente muitas diferenças na apresentação das lesões histopatológicas possam estar relacionadas à neuroinvasividade e neurovirulência de cada estirpe viral.

Os manguitos perivasculares foram compostos por células mononucleares e mais acentuados nas regiões do córtex frontal, tálamo e núcleos basais. Perez et al. (2002) não encontraram diferenças na distribuição dos MPV nas regiões analisadas. A presença de MPV é um achado constantemente descrito nos casos de meningoencefalite pelo BoHV-5 (Belknap et al., 1994; Summers, 1995; Ely et al., 1996; Salvador et al., 1998; Perez et al., 2003; Ferrari et al., 2007; Rissi et al., 2006, Pedraza et al., 2010).

O edema foi uma das alterações mais prevalentes neste estudo, sendo também descrita como um achado importante por Rissi et al. (2006, 2008), os quais acreditam que esta alteração possa contribuir para o aparecimento de malacia devido a alterações isquêmicas.

A necrose neuronal foi mais intensa, em ordem decrescente, no córtex frontal, parietal, occipital e tálamo. Resultados semelhantes foram previamente descritos por Rissi et al. (2008), onde a necrose neuronal foi mais acentuada no córtex telencefálico e tálamo. A necrose neuronal foi relatada em casos naturais e experimentais de infecção pelo BoHV-5 (Ely et al., 1996; Perez et al., 2003; Meyer et al., 2001; Elias et al., 2004; Ferrari et al., 2007; Rissi et al., 2006, 2008). Perez et al. (2002) relataram necrose neuronal em apenas quatro

animais de um total de 23, inoculados experimentalmente pelo BoHV-5. A necrose neuronal foi significativamente mais acentuada nos animais 1 e 2, comparados quando comparados individualmente com os demais animais ($p < 0.05$). Talvez a necrose neuronal mais intensa nestes animais possa ter influenciado no aparecimento de sinais clínicos neurológicos (animal 1) e na morte súbita (animal 2).

Em quatro animais foi verificada a presença de malacia, em diferentes graus de comprometimento, desde necrose discreta a moderada do neurópilo com a infiltração de poucas células *Gitter*, até necrose acentuada do tecido neuroectodérmico e perda total da arquitetura tecidual com presença acentuada de células *Gitter*. Embora malacia seja um termo originalmente utilizado para denominar a alteração macroscópica caracterizada pelo amolecimento de áreas do tecido nervoso, suas características macro e microscópicas foram associadas a casos de doença fatal causada pelo BoHV-5 (Colodel et al., 2002; Barros et al., 2006; Rissi et al., 2006; Spilk et al., 2006). Entretanto, esta alteração não está presente em todos os casos de morte causadas pelo BoHV-5 (Jonston et al., 1962; D'Offay et al., 1993; Perez et al., 2002; Salvador et al., 1998; Rissi et al., 2006, 2008; Aquino Neto et al., 2009). No presente estudo observou-se malacia no córtex frontal, córtex parietal e tálamo, corroborando com a descrição de Rissi et al. (2008). Riet-Correa et al. (2006) relataram malacia no tálamo e núcleos da base. Segundo Elias et al. (2004) a presença de malacia foi mais acentuada no córtex telencefálico, núcleos da base e tálamo do que no tronco encefálico, cerebelo e medula cervical. Embora estes pesquisadores tenham descrito a presença de malacia no cerebelo e medula cervical, esta não é um achado comum. David et al. (2007) acreditam que a malacia no tronco encefálico possa estar associada aos casos de reativação do vírus em animais previamente acometidos pela PEM. No entanto, no presente estudo esta possibilidade não se aplica, pois foi realizado a análise bromatológica e mineral da dieta fornecida aos animais certificando que os níveis de enxofre estavam dentro dos parâmetro dos normalidades e o diagnóstico diferencial de PEM por Cunha (2010) ao realizar .

Em três animais foram encontrados CI basofílicos intranucleares em astrócitos e neurônios. Em trabalhos de infecção experimental realizados em

bovinos, Spilk et al. (2006) evidenciaram a presença de CI, enquanto que Perez et al. (2002) e Isernhagen (2005) não verificaram CI. Em casos naturais, vários autores relataram a presença de CI (Summers et al., 1995, Salvador et al., 1998; Colodel et al., 2002; Rissi et al., 2006; Spilk et al., 2006; Ferrari et al., 2007; Pedraza et al., 2010), no entanto, estes nem sempre estão presentes (Aquino Neto et al., 2009).

Colodel et al. (2002) associaram o número de CI à presença de inflamação, sendo que quanto mais acentuado o processo inflamatório, maior seria a quantidade de CI observados. No entanto, Elis et al. (2004) associaram a presença de CI a áreas de processo inflamatório e malacia discretas a moderadas. No presente estudo não foi encontrada relação entre escore de lesão e a presença de CI. Porém, das 7 áreas que apresentaram corpúsculos de inclusão, 6 também apresentaram malacia, semelhante ao descrito por Elias et al. (2004). Elias et al. (2004) e Barros et al. (2006) relataram que a presença dos CI pode ser utilizada na confirmação do diagnóstico de meningoencefalite pelo BoHV-5. No entanto, a presença dos CI é muito variável e a ausência destes não exclui o diagnóstico de meningoencefalite pelo BoHV-5 (Rissi et al. 2006).

Em nosso trabalho a meningite mononuclear foi pouco evidenciada, sendo classificada como discreta na maior parte das seções analisadas. A meningite mononuclear foi descrita em muitos casos de meningoencefalite pelo BoHV-5 (Belknap et al., 1994; Salvador et al., 1998; Perez et al. 2002; Elias et al., 2004; Riet-Correa et al., 2006; Rissi et al., 2006, 2008; David et al., 2007; Rissi et al., 2008, Lunardi et al., 2009; Arruda et al., 2010; Pedraza et al., 2010). No entanto, esta alteração pode estar ausente (Cascio et al., 1999; Colodel et al., 2002), ser discreta ou moderada (Lunardi et al., 2009) em alguns casos de doença neurológica causada pelo BoHV-5. Perez et al. (2002) observaram a presença de meningite apenas no córtex anterior e posterior.

A congestão foi um achado histopatológico constante em todos os casos descritos por Elias et al. (2004), concordando com os achados deste estudo. Gliose focal e difusa foram achados descritos em casos de meningoencefalite por vários estudos (Elias et al., 2004, Riet-Correa et al., 2006; Rissi et al., 2006; David et al., 2007). Diferente dos achados de Elias et al. (2004), Rissi et al.

(2006) e Cunha et al. (2009), o infiltrado inflamatório de células polimorfonucleares não foi evidenciado neste estudo.

As médias dos escores das lesões histopatológicas observadas nas porções dorsal e cranial do encéfalo (bulbo olfatório e córtex telencefálico) foram significativamente maiores ($p < 0,001$) quando comparadas com as demais regiões (diencéfalo, tronco encefálico, cerebelo e medula cervical), o que vai ao encontro dos achados observados por Silva et al. (1999a), Meyer et al. (2001) e Perez et al. (2002).

Todos os animais apresentaram alterações compatíveis com meningoencefalite causada pelo BoHV-5. O escore de lesão histopatológica foi maior no animal 1 (sinais neurológicos), todavia, não houve diferença estatisticamente significativa com as alterações evidenciadas nos animais 2 (encontrado morto 21 p.i.) e 3 (sem sinais neurológicos).

Os demais animais, 4 a 6, apresentaram escores de lesão significativamente menores do que o animais 1. O fato de estes animais terem apresentado lesões inflamatórias, mas não apresentarem sinais clínicos discorda de Perez et al. (2002), os quais acreditam que é improvável que animais com encefalite permaneçam clinicamente saudáveis. Alterações histopatológicas moderadas em animais assintomáticos foram descritas por Isernhagen (2005). Também foram descritos casos de coelhos inoculados com o BoHV-5 que permaneceram assintomáticos, mas apresentaram alterações microscópicas características da doença (Chowdhury et al., 1997). No presente estudo, possivelmente o BoHV-5 tenha causado infecção, distribuindo-se pelo encéfalo e provocado processo inflamatório menos grave e não progressivo, resultando na ausência de sinais neurológicos nos animais 3, 4, 5 e 6.

Apesar de o gânglio de Gasser ser considerado uma importante via de infecção do SNC pelo BoHV-5 (Beltrão et al., 2000; Perez et al., 2002; Diel et al., 2005) nem sempre são evidenciadas alterações histopatológicas nesta região (Rissi et al., 2008). Nenhum dos animais do presente estudo apresentou alterações microscópicas nessa região, embora tenha sido encontrado DNA do BoHV-5 no GG do animal 1. Em contrapartida, as alterações no Bulbo olfatório foram presentes em seis (100%) animais e a presença do DNA viral foi encontrada em 2 (33,3%) animais. Isto pode indicar que a via olfatória foi mais

importante do que a via gânglio de Gasser para entrada e disseminação do vírus nos animais deste estudo, corroborando com os achados de Beltrão et al. (2000), Diel et al. (2005) e Fonseca et al. (2006) em coelhos.

A IHQ para o BoHV-5 teve sua eficiência máxima com relação à intensidade e especificidade de coloração e ausência de marcação de fundo incubando-se as lâminas com o Ac primário 2F9 por 1h a 37 °C, na diluição de 1:200. Marcações imunoistoquímicas bem sucedidas utilizando este anticorpo foram descritas por Vogel et al. (2003), Oldoni et al. (2004) e Hübner et al. (2005). Apesar de Chung et al. (1994), d'Offay et al. (1995) e Ely et al. (1996) terem utilizado o Ac comercial L6G (VRMD), o mesmo não demonstrou ser útil nas condições testadas devido à marcação neuronal tanto dos controles positivos como dos controles negativos e a marcação de fundo. Em nosso estudo foi utilizado como controle negativo o encéfalo de um bovino coletado em frigorífico, sendo que o mesmo não apresentou alterações histopatológicas nas 18 seções avaliadas e foi negativo na PCR para a gC do BoHV-5. Chung et al. (1994) não descreveram o uso de controle de negativo. d'Offay et al. (1995) substituíram o Ac primário por fluído ascítico não-específico de camundongo e apenas Ely et al. (1996) realizaram o controle negativo das reações com cérebro de um bovino saudável. Após os trabalhos descritos por estes autores não foram encontrados na literatura pesquisada novos estudos utilizando o AcM L6G.

Apesar do animal 1 ter apresentado a maior média entre os escores de lesão, este parâmetro não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os animais 1, 2 e 3. Por outro lado, foi verificada diferença estatisticamente significativa entre o número de áreas positivas na IHQ do animal 1, com sinais neurológicos, em relação aos demais animais. Deste modo, pode ser sugerido que maior positividade na IHQ possa estar ligada a presença de maior escore de lesão do animal 1. No entanto, Meyer et al. (2001) observaram que apenas cinco de sete animais com sinais neurológicos e lesões histopatológicas semelhantes foram positivos na IHQ para o BoHV-5.

No presente estudo, 32,41% das áreas foram positivas na IHQ para o BoHV-5. No experimento realizado por Meyer et al. (2001) 54,1% das áreas analisadas foram positivas para BoHV-5. No entanto, ao menos quatro

diferenças importantes podem ser evidenciadas entre os estudos. Primeiramente, em nosso experimento apenas um animal apresentou evolução clínica semelhante aos animais positivos como foi descrito por Meyer et al. (2001), sendo que dentre os demais, um foi encontrado morto aos 21 dias p.i. e quatro não apresentaram sinais neurológicos e foram eutanasiados aos 30 dias p.i. Em segundo lugar, os anticorpos monoclonais utilizados nos experimentos foram diferentes. Além disto, a estirpe viral utilizada na presente pesquisa e a idade dos animais inoculados (Cunha, 2010) diferiram da estirpe viral e idade dos animais utilizados por Meyer et al. (2001).

A distribuição dos resultados positivos e negativos para IHQ não apresentou diferença estatisticamente significativa entre o córtex cerebral e o bulbo olfatório quando comparados às demais regiões, corroborando com os resultados de Meyer et al. (2001). No entanto, áreas positivas na IHQ para o BoHV-5 apresentaram, em média, escores de lesão significativamente mais elevados do que as áreas negativas. Não foi encontrado na literatura nenhum trabalho correlacionando o escore de lesão de áreas positivas e negativas na IHQ para o BoHV-5. Contudo, os resultados de Meyer et al. (1996) sugerem que possa haver uma associação entre a gravidade de lesão e o resultado de IHQ para BoHV-5. Meyer et al. (1996) descreveram alterações histopatológicas mais acentuadas e maior número de células positivas na IHQ no córtex cerebral de coelhos inoculados experimentalmente com BoHV-5, concordando com Belknap et al. (1994), o quais descreveram que áreas com lesão histopatológica mais acentuada provavelmente apresentam maiores chances de serem positivas na IHQ.

Vogel et al. (2003) realizaram estudo de distribuição e latência do DNA do BoHV-5 no SNC de bovinos infectados experimentalmente usando a PCR. No entanto, o uso do AcM 2F9 serviu apenas para confirmar se houve a expressão de genes da gC durante a infecção latente.

No presente estudo, 100% dos animais e 35,19% das áreas foram positivas para a PCR, sendo amplificado fragmento de 159 pb do gene que codifica a gC do BoHV-5. Outros estudos realizados em tecido nervoso central fixado em formalina e incluídos em parafina encontraram percentuais de positividade de 21,8% (Ely et al., 1996), 75% (Ferrari et al., 2007) e 32,89%

(Arruda et al., 2010) usando a PCR ou a PCR multiplex e 66,6% (Gomes et al., 2002) e 33,3% (Pedraza et al., 2010) usando a PCR nested. No entanto, estes resultados não incluem o número de áreas analisadas, apenas se o animal foi positivo ou negativo para a PCR. Cunha (2010) realizou a extração do tecido encéfalo congelado e a PCR de 6 regiões do SNC dos animais usados no presente trabalho (bulbo olfatório, córtex frontal, córtex occipital, núcleos da base, tálamo e o gânglio do trigêmeo), gerando o total de 36 áreas analisadas. Cunha (2010) observou que 66,67% (24/36) das áreas foram positivas para PCR do BoHV-5. Em nosso estudo, verificamos que estas mesmas áreas apresentaram 52,78% (19/36) de positividade. Algumas regiões positivas na PCR realizada por Cunha (2010) foram negativas na PCR realizada a partir do tecido FFEP, também acontecendo o inverso. Utilizando as mesmas condições do presente estudo Claus et al. (2005), Isenhagen (2005) encontraram 100% de animais positivos na PCR para o BoHV-5, corroborando com nossos resultados.

Outros trabalhos realizaram o estudo de distribuição do DNA do BoHV-5 no SNC de bovinos. Meyer et al. (2001) utilizaram o protocolo da PCR descrito por Ros e Belak (1999), o qual amplifica regiões do DNA conservadas entre o BoHV-1, BoHV-5 e o herpesvírus cervídeo tipo 1. Estas regiões foram posteriormente clivadas por enzimas de restrição, permitindo, deste modo, o diagnóstico da infecção pelo BoHV-5. Meyer et al. (2001) inocularam oito animais com a estirpe N569 do BoHV-5. Destes, sete animais foram sacrificados *in extremis* entre o 9^o e 22^o dias p.i. e um dos animais permaneceu assintomático até o 105^o dia p.i, sendo então sacrificado. Cinco regiões do SNC de apenas 3 animais foram examinadas para a presença de DNA do BoHV-5, apresentando 100% de áreas positivas. Vogel et al. (2003), detectaram o DNA viral em várias porções do SNC de 9 bezerros inoculados experimentalmente com BoHV-5. No total, 108 áreas do SNC foram analisadas para a PCR do gene que codifica a gG do BoHV-5, apresentando 68 áreas positivas (62,96%). Nenhum padrão de distribuição do DNA viral foi evidenciado, corroborando com os achados de Isenhagen (2005) e Claus et al. (2007). Isto vai de encontro ao resultado encontrado na presente pesquisa, as

áreas positivas para a PCR estavam mais presentes nas regiões do bulbo olfatório e do córtex telencefálico.

Na literatura pesquisada nenhum trabalho foi encontrado comparando a intensidade de lesão das áreas positivas e negativas para a PCR do BoHV-5, visto que em nosso estudo a média dos escores de lesão nas áreas positivas foi significativamente maior do que nas áreas negativas.

O animal com sinais neurológicos apresentou mais chances de ser positivo na PCR e IHQ ($p < 0,05$) para o BoHV-5. Este resultado concorda com os resultados de Isenhagen (2005), onde os animais sintomáticos tiveram 34/40 (85%) áreas positivas para a PCR do BoHV-5, enquanto os animais assintomáticos apresentaram apenas 13/30 (43%) das áreas positivas, havendo correlação estatística significativa entre a presença de sinais clínicos e o maior número de áreas positivas na PCR ($p < 0,0001$) pelo teste exato de Fisher.

Em nosso estudo as áreas positivas na IHQ não foram, na sua maioria, as mesmas áreas positivas da PCR. Não foram encontrados estudos na literatura pesquisada que realizaram esta comparação.

Em suma, a utilização das técnicas da PCR e de imunoistoquímica 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 o que, por sua vez, contribui para o estudo epidemiológico da doença.

7. Conclusões

- 1) As alterações microscópicas mais acentuadas foram manguitos perivasculares compostos por células mononucleares, edema, gliose difusa, congestão, gliose focal e necrose cerebrocortical, portanto deve-se dar ênfase a estas anormalidades na avaliação histológica de casos clínicos suspeitos de BoHV-5;
- 2) O bezerro que apresentou sinais clínicos neurológicos teve lesões microscópicas mais acentuadas que os demais animais e maior número de áreas positivas na IHQ e na PCR;
- 3) As áreas com maior intensidade de lesões foram córtex frontal, tálamo, córtex parietal, córtex occipital, bulbo olfatório e os núcleos da base e, portanto, as mais adequadas para o diagnóstico microscópico;
- 4) A necrose cerebrocortical significativamente mais acentuada nos bezerros 1 e 2 com relação aos demais bezerros (assintomáticos) pode ter relação com o aparecimento de sinais neurológicos e com a morte súbita do primeiros.
- 5) A imunoistoquímica com o AcM 2F9 realizada em amostras do sistema nervoso central de bovinos fixadas em formalina e incluídas em parafina foi eficiente no diagnóstico da infecção pelo BoHV-5 nas condições avaliadas neste estudo;
- 6) A PCR para a gC do BoHV-5 realizada em amostras do sistema nervoso central de bovinos fixadas em formalina e incluídas em parafina foi eficiente no diagnóstico da infecção pelo BoHV-5 nas condições avaliadas neste estudo;

8. Referências bibliográficas

ALEGRE, M.; NANNI, M.; FONDEVILA, N. Development of a multiplex polymerase chain reaction for the differentiation of bovine herpesvirus-1 and 5. *J. Vet. Med.*, v.48, p.613-621. 2001.

ARRUDA, L.P.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; LEMOS, R.A.A.; NOGUEIRA, A.P.A.; CRUZ, R.A.S.; PESCADOR, C.A.; COLODEL, E.M. Detecção molecular de herpesvírus bovino 1 e 5 em amostras de encéfalo conservadas em formol e emblocadas em parafina provenientes de bovinos com doença neurológica. *Pesq. Vet. Bras.*, v.30, n.8, p.646-650, 2010.

AQUINO NETO, H.M.; CARVALHO, A.U.; FACURY FILHO, E.J.; FERREIRA, P.M.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F.; LOBATO, Z.I.P.; ALVARENGA, M.R.; SERRANO, A.L.; MARTINS, R.A.; AFONSO, D.A.F. Meningoencefalite por Herpesvirus Bovino 5 em Minas Gerais: relato de caso clínico. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, n.1, p.1-5, 2009.

ASHBAUGH, S.E.; THOMPSON, K.E.; BELKNAP, E.B.; SCHULTHEISS, P.C.; CHOWDHURY, S. & COLLINS, J.K. Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. *J. Vet. Diag. Invest.*, v.9, p.387-394, 1997.

BAGUST T.J. Comparision of the biological, biophysical and antigenic properties of four strains of infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. *J. Comp. Path.*, v.82, p.365-374, 1972.

BARROS, C.S.L.; DRIEMEIER, D.; DUTRA, I.S. & LEMOS, R.A.A. Doenças do Sistema Nervoso de Bovinos no Brasil. Agnes, São Paulo, p.166-171, 2006, .

BARTHA, A.; HAIDU, G.; ALDASSY, P.; PACZOLAY, G. Occurrence of encephalomyelitis caused by infectious bovine rhinotracheitis virus in calves in Hungary. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.*, v.19, p.145–151, 1969.

BELKNAP, E.B.; COLLINS, J.K.; AYERS, V.K.; SCHULTHEISS, P.C. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 1.3. *Vet. Pathol.*, v.31, p.358–365, 1994.

BELTRÃO, N.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; SILVA, A.M.; ROEHE, P.M. & IRIGOYEN, L.F. Infecção e enfermidade neurológica por Herpesvirus

bovino 5 (BHV-5): coelhos como modelo experimental. *Pesq. Vet. Bras.*, v.20, p.144-150, 2000.

BOTELHO, R.G.A. Desenvolvimento de testes de PCR para BoHV-5 e sua aplicação no diagnóstico de casos clínicos. Dissertação (Mestrado), 2000, 45f. - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

CAGNINI, D. Q., CUNHA, P. H. J., BADIAL, P. R., OLIVEIRA FILHO, J. P., AMORIM, R. L., BORGES, A. S. Meningoencefalite por herpes vírus bovino tipo-5: achados histopatológicos e diagnóstico pela reação em cadeia da polimerase. In: *XIV Encontro Nacional de Patologia Veterinária – ENAPAVE*, Águas de Lindóia, 2009.

CAMPOS, F.S.; FRANCO, A.C.; HÜBNER, 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. *Vet. Microbiol.*, v.139, p. 67–73, 2009.

CARON L., FLORES E.F., WEIBLEN R., SCHERER C.F., IRIGOYEN L.F., ROEHE P.M., ODEON A. & SUR J.H. Latent infection by bovine herpesvirus type-5 in experimentally infected rabbits: virus reactivation, shedding and recrudescence of neurological disease. *Vet. Microbiol.*, v.84, p.285-295, 2002.

CARRILLO, B.J.; POSPISCHIL, A; DAHME, E. Pathology of a bovine necrotizing encephalitis in Argentina. *Zbl Vet. Med. B.*, v.30, p.161-168, 1983. In: RISSI, D.R; RECH, R.R.; FLORES, E.F.; KOMMERS, G.D. & BARROS, C.S.L. Meningoencefalite por meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. *Pesq. Vet. Bras.*, v.27, p.251-26, 2007.

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. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.11, p.134-139, 1999.

CHOWDHURY, S.I. Molecular basis of antigenic variation between the glycoproteins C of respiratory bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurovirulent BHV-5. *Virology*. v. 213, p. 558–568. 1995.

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) meningo-encephalitis in a rabbit seizure model. *J. Comp. Pathol.*, v.117, p.295–310, 1997.

CHOWDHURY, S.I.; LEE, B.J.; OZKUL; A.; WEISS, M.L. Bovine herpesvirus 5 glycoprotein E is important for neuroinvasiveness and neurovirulence in the olfactory pathway of the rabbit. *J. Virol.*, v.74, p.2094–2106, 2000a.

CHOWDHURY, S.I.; LEE, B.J.; ONDERCI, M.; WEISS, M.L.; MOSIER, D. Neurovirulence of glycoprotein C (gC)-deleted bovine herpesvirus type-5 (BHV-5) and BHV-5 expressing BHV-1 gC in a rabbit seizure model. *J. Neurovirol.*, v.6, p.284–295, 2000b.

CHOWDHURY, S.I.; ONDERCI, M.; BHATTACHARJEE, P.S.; AL-MUBARAK, A.; WEISS, M. L.; ZHOU, Y. Bovine herpesvirus 5 (BHV-5) Us9 is essential for BHV-5 neuropathogenesis. *J. Virol.*, v.76, p.3839–3851, 2002.

CHOWDHURY, S.I.; MAHMOOD, S.; SIMON, J.; AL-MUBARAK, A.; ZHOU, Y. The Us9 gene encoded by bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) effectively complements a Us9-null bovine herpesvirus 5 (BHV-5) for anterograde transport, neurovirulence and neuroinvasiveness in a rabbit model. *J. Virol.*, v.80, p.4396-4405, 2006.

CHUNG, CS; PEARSON, LD; AYERS, VK; COLLINS, JK. Monoclonal antibodies that distinguish between encephalitogenic bovine herpesvirus (BHV-1.3) and respiratory bovine herpesvirus (BHV-1.1). *Clin Diagn Lab Immunol.*, v.1, p.83-88, 1994.

CIACCI-ZANELLA, J.; STONE, M.; HENDERSON, G.; JONES, C. The latencyrelated gene of bovine herpesvirus 1 inhibits programmed cell death. *J. Virol.*, v.73, p.9734–9740, 1999. In: DELHON G.; MORAES M.P.; LU, Z.; AFONSO C.L.; FLORES E.F.; WEIBLEN R.; KUTISH G.F.; ROCK D.L. Genome of bovine herpesvirus 5. *J. Virol.*, v.77, v.10339-10347, 2003.

CLAUS, M.P.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Herpesvírus Bovino tipo 5 e Meningoencefalite herpética bovina. *Semina.*, v.23, n.1, p.31-141, 2002.

CLAUS, M.P.; ALFIERI, A.F.; FOLGUERAS-FLATSCHART, A.V.; WOSIACKI, S.R.; MEDICI, K.C. & ALFIERI, A.A. Rapid detection and

differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR. *J. Virol. Meth.*, v.128, p.183-188, 2005.

CLAUS, M.P.; ALFIERI, A.F.; MÉDICI, K.C.; LUNARDI, M. & ALFIERI, A.A. Bovine herpesvirus 5 detection by virus isolation in cell culture and Multiplex-PCR in central nervous system from cattle with neurological disease in Brazilian herds. *Braz. J. Microbiol.*, v.38, p.485-490, 2007.

COLODEL, E.M.; NAKAZATO, L.; WEIBLEN, R.; MELLO, R.M.; SILVA, R.R.P.; SOUZA, M.A.; FILHO, J.A.O. & CARON, L. Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por herpesvírus bovino no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Ciênc. Rural*, v. 32, p.293-298, 2002.

COSTA, E.A.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F.; LEITE, R.C.; OLIVEIRA, G.D.R.; ROCHA, M.A. Utilização de parte da região codificadora da glicoproteína b na diferenciação do herpesvírus bovino 1.1, herpesvírus bovino 1.2 e herpesvírus bovino 5. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, n.2, p.143-149, 2005.

CUNHA P.H.J., DELFIOL D.J.Z., CAGNINI Q.D., BADIAL P.R., OLIVEIRA FILHO J.P., OLIVO G., AMORIM R.M. & BORGES A.S. Identificação molecular do herpesvirus bovino tipo 5 em um bovino confinado associado com diagnóstico diferencial laboratorial de outras causas de polioencefalomalacia. In: Anais do 8º Congresso Brasileiro de Buiatria. Belo Horizonte, BH. *Ciênc. Anim. Bras.* (Supl. 1), p.93-98, 2009.

CUNHA, P.H.J. Polioencefalomalacia experimentalmente induzida pela ingestão de dieta com alto teor de enxofre ou pelo herpesvírus bovino 5 em bovinos. Botucatu: Unesp, 2010. Tese (Doutorado) – Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

D'ANGELO, A.; MINISCALCO, B.; BELLINO, C.; BORMIDA, S.; BORRELLI, A.; MAURELLA, C.; RIONDATO, F.; BIOLATTI, C. & CAGNASSO, A. Analysis of cerebrospinal fluid from 20 calves after storage for 24 hours. *Vet. Rec.*, v.18, n.164, p.491- 493, 2009.

D'ARCE, R.C.F.; ALMEIDA, R.S.; SILVA, T.C.; FRANCO, A.C.; SPILKI, F.; ROEHE, P.M.; ARNS, C.W. Restriction endonuclease and monoclonal

antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. *Vet Microbiol*, v.88, p.315–324, 2002.

De PAULA, R.R.; SOUZA, M.A.; COLODEL E.M.; HÜBNER S.O.; BRUM K.B.; JORGE K.B.C.; DAMASCENO A.D. Meningomieloencefalite causada pelo BHV-5 em bovino no Estado de Goiás. In: XII ENAPAVE, 2005, Belo Horizonte. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* Belo Horizonte, MG: FEP MVZ Editora, v.57, p.2, 2005.

DAVID, N.; HÜBNER, S.O.; RIET-CORREA, F.; HALFEN, D.; LEMOS, R.A. Reactivation of latent bovine herpesvirus type 5 in cattle with polioencephalomalacia induced by ammonium sulphate. *Pesq. Vet. Bras.*, v.27, n.10, p.435-441, 2007.

DEL MÉDICO ZAJAC, M.P.; LADELFA, M.F.; KOTSIAS, F.; MUYLKENS, B.; THIRY, J.; THIRY, E. & ROMERA, S.A. Biology of bovine herpesvirus 5. *Vet. J.*, v.184, p.138-145, 2009.

DELHON G.; MORAES M.P.; LU, Z.; AFONSO C.L.; FLORES E.F.; WEIBLEN R.; KUTISH G.F.; ROCK D.L. Genome of bovine herpesvirus 5. *J. Virol.*, v.77, v.10339-10347, 2003.

DEZENGRINI, R.; WEISS, M.; TORRES, F.D.; OLIVEIRA, M.S.; FURIAN, A.F.; MELLO, C.F.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Bovine herpesvirus 5 induces an overproduction of nitric oxide in the brain of rabbits which correlates with virus dissemination and precedes the development of neurological signs. *J. Neurovirol.*, v.15, n.2, p.153-163, 2009.

DIEL D.G., FONSECA E.T., SOUZA S.F., MAZZANTI A., BAUERMANN F., WEIBLEN R. & FLORES E.F. O herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) pode utilizar as rotas olfatória ou trigeminal para invadir o sistema nervoso central de coelhos, dependendo da via de inoculação. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 25, p. 164-170. 2005.

DIEL D.G., ALMEIDA S.R., BRUM M.C.S., DEZENGRINI R., WEIBLEN R. & FLORES E.F. Acute and latent infection by bovine herpesvirus type 5 in experimentally infected goats. *Veterinary Microbiology*. v. 121 p. 257–267. 2007.

D'OFFAY, J.M.; ELY, R.W.; BALDWIN, C.A.; WHITENACK, D.L.; STAIR, E.L.; COLLINS, J.K. Diagnosis of encephalitic bovine herpesvirus type 5 (BHV-

5) infection in cattle: virus isolation and immunohistochemical detection of antigen in formalin-fixed bovine brain tissues. *J. Vet. Diag. Invest.*, v.7, p.247-251, 1995.

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

ELY, R.W.; D'OFFAY, J.M.; RUEFER, A.H.; CASH, C.Y. Bovine herpesviral encephalitis: a retrospective study on archived formalin-fixed, paraffin-embedded brain tissue. *J Vet Diagn Invest.*, v.8, p.487-492, 1996.

ENGELHARDT, T. & KEIL, G.M. Identification and characterization of the bovine herpesvirus 5 US4 gene and gene products. *Virology*, v.225, p.126–135. 1996.

ENGELS, M. & ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Vet. Microbiol.*, v.53, p.3-15, 1996.

FERREIRA, M.C.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F. & ALFIERI, A.A. Desenvolvimento e avaliação de um ensaio imunoenzimático para o diagnóstico sorológico da infecção pelo herpesvirus bovino. *Semina*, v.26, p.363-372, 2005.

FERRARI, H.F.; LUVIZOTTO, M.R.C.; RAHAL, P.; CARDOSO T.C. Detection of bovine *Herpesvirus* type 5 in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine brain by PCR: a useful adjunct to conventional tissue-based diagnostic test of bovine encephalitis. *Journal of Virological Methods.*, v.146, p.335–340, 2007.

FONSECA, E.T.; DIEL, D.G.; SOUZA, S.F.; MAZZANTI, A.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Ablação cirúrgica dos bulbos olfatórios em coelhos: modelo para estudos de patogenia de infecções por vírus neurotrópicos. *Ciênc. Rural*, v.36, n.2, p.544-549, 2006.

FRANCO, A.C. & ROEHE, P.M. Cap. Herpesviridade In: FLORES, E.F. *Virologia Veterinária*. Santa Maria: Ed da UFSM, 2007. cap. 17. 888p.

FURUOKA, H.; IZUMIDA, N.; HORIUCHI, M.; OSAME, S. Bovine herpesvirus meningoencephalitis association with infectious bovine rhinotracheitis (IBR) vaccine. *Acta Neuropathol.*, v.90, p.565-571, 1995.

GEISER, V.; INMAN, M.; ZHANG, Y.; JONES, C. The latency-related gene of bovine herpesvirus-1 can inhibit the ability of bICP0 to activate productive infection. *J. Gen. Virol.*, v.83, p.2965–2971, 2002. In: DELHON G.; MORAES M.P.; LU, Z.; AFONSO C.L.; FLORES E.F.; WEIBLEN R.; KUTISH G.F.; ROCK D.L. Genome of bovine herpesvirus 5. *J. Virol.*, v.77, v.10339-10347, 2003.

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 herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) em bovinos do sudeste brasileiro. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.54, p.217-220, 2002.

HALFEN, D.C. & VIDOR, T. Infecções por herpesvírus bovino-1 e herpesvírus bovino-5 In: Riet-Correa F., Schild A.L., Méndez M.C. & Lemos R.A.A. (Eds). Doenças de Ruminantes e Equinos. Vol.1. São Paulo: Varela, Cap. 2, 2001. 426 p.

HÜBNER, S.O.; OLIVEIRA, A.P.; FRANCO, A.C.; ESTEVES, P.A.; SILVA, A.D.; SPILKI, F.R.; RIJSEWIJK, F.A.M. & ROEHE, P.M. Experimental infection of calves with a gI, gE, US9 negative bovine herpesvirus type 5. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v.28, p.187-196, 2005a.

HÜBNER, S.O.; PESCADOR, C.; CORBELLINI, L.G.; DRIEMEIER, D.; SPILKI, F.R.; ROEHE, P.M. Otimização da imunoistoquímica para detecção de herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5) em tecidos do sistema nervoso central fixados com formaldeído. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, p.1-6, 2005b.

ISERNHAGEN A.J. Meningoencefalite herpética em bezerros: evolução clínica e diagnóstico. Dissertação (Mestrado) 2005, 79f. - Ciência Animal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

JOHNSTON, L.A.Y.; SIMMONS, G.C. & MCGAVIN, M.D. Viral meningoencephalitis in calves. *Aust. Vet. J.*, v.38, p.207-215, 1962.

KNOBEL, D.L.; CLEAVELAND, S.; COLEMAN, P.G.; FÈVRE, E.M.; MELTZER, M.I.; MIRANDA, M.E.G.; SHAW, A.; ZINSSTAG, J.; MESLIN,

François-Xavier. Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. *Bulletin of the World Health Organization*. v.85, n.3, p.360-370, 2005.

KUNRATH, C.F.; VOGEL, F.S.F.; OLDONI, I.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; DEZENGRINI, R.; TORRES, F.D.; PAN, K.A. Soroneutralização e imunofluorescência utilizando anticorpos monoclonais no diagnóstico rápido de infecções pelo herpesvírus bovino tipos 1 e 5 (BHV-1 e BHV-5). *Ciênc. rural.*, v.34, n.6, p.1877-1883, 2004.

LEMOS, R.A.A. Enfermidades do sistema nervoso de bovinos de corte das regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil. Tese (Doutorado), 2005, 150f. - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

LISBÔA, J.A.N.; ISERNHAGEN, A.J.; BORGES, A.S.; AMORIM, R.M.; BALARIN, M.R.S.; LUNARDI, M. & ALFIERI, A.A. Hematological and Cerebrospinal Fluid Changes in Cattle Naturally and Experimentally Infected with the Bovine Herpesvirus 5. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v.52, p.69-76, 2009.

LIMAN, A.; ENGELS, M.; MEYER, G.; ACKERMANN, M. Glycoprotein C of bovine herpesvirus 5 (BHV-5) confers a distinct heparin-binding phenotype to BHV-1. *Arch Virol.*, v.145, p.2047-2059, 2000.

LINDNER, A.; AMBROSIUS, H.; LIEBERMANN, H. Comparative studies on detection of BHV-5 antibodies in sheep with ELISA, serum neutralization, cell assay and immunofluorescence assay. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, v.100, p.440-442, 1993.

LUNARDI, M.; CLAUS, M.P.; LISBOA, J.A.N.; AMUDE, A.M.; HEADLEY, S.A.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Neurological and epidemiological aspects of a BoHV-5 meningoencephalitis outbreak. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v.52, p.77-85, 2009.

MAYER, S.V.; QUADROS, V.L.; VOGEL, F.S.F.; WINKELMANN, E.R.; ARENHART, S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Dexamethasone-induced reactivation of bovine herpesvirus type 5 latent infection in experimentally infected rabbits results in a broader distribution of latent viral DNA in the brain. *Braz J Med Biol Res.*, v.39, n.3, p.335-343, 2006.

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

MEYER, G.; LEMAIRE, M.; ROS, C.; BELAK, K.; GABRIEL, A.; CASSART, D.; COIGNOUL, F.; BELAK, S. & THIRY, E. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. *Arch. Virol.*, v.146, p.633-652, 2001.

NAKAMICHI, K., D. KUROKI, Y. MATSUMOTO, AND H. OTSUKA. Bovine herpesvirus 1 glycoprotein G is required for prevention of apoptosis and efficient viral growth in rabbit kidney cells. *Virology* 279:488–498. 2001.

NAKAMICHI, K., Y. MATSUMOTO, AND H. OTSUKA. Bovine herpesvirus 1 glycoprotein G is necessary to maintain cell-to-cell junctional adherence among infected cells. *Virology* 294:22–30. 2002.

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

PEDRAZA, F.J.; ALESSI, A.C.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F. Detecção de herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) em cérebro incluído em parafina e fixado em formalina, pela PCR, em bovinos colombianos. *Rev Colomb Cienc Pecu.*, v.23, n.3, 2010.

PEREZ, S.E.; BRETSCHNEIDER, G.; LEUNDA, M.R.; OSORIO, E.A.; FLORES, E.F. & ODEON, A.C. Primary infection, latency, and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in bovine nervous system. *Vet. Path.*, v.39, p.437-444, 2002.

PEREZ, S.E.; VAGNOZZI, A.; SUR, J.H.; ODRIÓZOLA, E.; CAMPERO, C.M.; ODEON, A.C. Retrospective analysis of cases with a diagnosis of cerebrocortical necrosis and its relation with type 5 bovine herpesvírus. *Revta Arg. Microbiol.*, v.35, p.69-73, 2003.

RAMOS-VARA, J.A.; KIUPEL, M.; BASZLER, T.; BLIVEN, L.; BRODERSEN, B.; CHELACK, B.; CZUB, S.; DEL PIERO, F.; DIAL, S.; EHRHART, E.J.; GRAHAM, T.; MANNING, L.; PAULSEN, D.; VALLI, V.E.; WEST, K. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *J Vet Diagn Invest.*, v.20, p.393–413, 2008.

RECH, R.R.; SCHILD, A.L.; DRIEMEIER, D.; GARMATZ, S.L.; OLIVEIRA, F.N.; RIET-CORREA, F.; BARROS, C.S.L. Febre catarral maligna

em bovinos no Rio Grande do Sul: epidemiologia, sinais clínicos e patologia. *Pesq. Vet. Bras.* v.25, n.2, p.97-105, 2005.

REED, R.H.; MUENCH, H. A single method of estimating fifty percent end points. *American Journal Hygiene.*, v.27, p.493-497, 1938. In: ISERNHAGEN A.J. Meningoencefalite herpética em bezerros: evolução clínica e diagnóstico. Dissertação (Mestrado) 2005, 79f. - Ciência Animal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

RIET-CORREA, F.; VIDOR, T.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C. Meningoencefalite e necrose do córtex cerebral em bovinos por herpesvírus bovino-1. *Pesq. Vet. Bras.*, v.9, p.13-16, 1989.

RIET-CORREA, G.; DUARTE, M.D.; BARBOSA, J.D.; OLIVEIRA, C.M.C.; CERQUEIRA, V.D.; BRITO, M.F. & RIET-CORREA, F. Meningoencefalite e polioencefalomalacia causada por Herpesvírus Bovino-5 no Estado do Pará. *Pesq. Vet. Bras.*, v.26, p.44-46, 2006.

RISSI, D.R.; OLIVEIRA, F.N.; RECH, R.R.; PIEREZAN, F.; LEMOS, R.A.A. & BARROS, C.S.L. Epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões encefálicas em bovinos afetados por meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. *Pesq. Vet. Bras.*, v.26, n.1, p. 123-132, 2006.

RISSI, D.R.; RECH, R.R.; FLORES, E.F.; KOMMERS, G.D.; BARROS, C.S.L. Meningoencefalite por meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. *Pesq. Vet. Bras.*, v.27, p.251-26, 2007.

RISSI, D.R.; PIEREZAN, F.; SILVA, M.S.; FLORES, E.F. & BARROS, C.S.L. Neurological disease in cattle in southern Brazil associated with Bovine herpesvirus infection. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.20, n.3, p.346-349, 2008.

ROEHE P.M.; SILVA T.C.; NARDI N.B.; OLIVEIRA L.G.; ROSA J.C.A. Diferenciação entre o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e o herpesvírus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesq. Vet. Bras.*, v.17, p.41-44, 1997.

ROS, C.; BELAK, S. Studies of Genetic Relationships between Bovine, Caprine, Cervine, and Rangiferine Alphaherpesviruses and Improved Molecular Methods for Virus Detection and Identification. *J. clin. microbiol.*, v.37, p.1247–1253, 1999.

ROIZMAN B., DESROSIERS R.C., FLECKENSTEIN B., LOPEZ C., MINSON A.C. & STUDDERT M.J. The family herpesviridae: an update. *Arch. Virol.*, v.123, p.425-449, 1992.

SÁ E SILVA, M.; BRUM, M.C.S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987-2006). *Pesq. Vet. Bras.*, v.27, n.10, p.403-408, 2007a

SÁ e SILVA, M.; BRUM, M.C.S.; LORETO, E.L.S.; 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 Res.*, v.129, p.191–199, 2007b.

SÁ E SILVA. *Identificação molecular de herpesvírus Bovino tipos 1 e 5*. 2009. 60f. Tese (doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

SALVADOR, S.W.C.; LEMOS, R.A.A.; RIET-CORREA, F.; ROEHE, P.M.; OSÓRIO, A.L.A.R. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. *Pesq. Vet. Bras.*, v.18, p.76-83, 1998.

SANCHES A.W.D., LANGOHR I.M., STIGGER A.L. & BARROS C.S.L. Doenças do sistema nervoso central em bovinos no Sul do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.*, v.20, p.113-118, 2000.

SANT'ANA, F.J.F.; RISSI, D.R.; LUCENA, R.B.; LEMOS, R.A.A.; NOGUEIRA, A.P.A.; BARROS, C.S.L. Polioencefalomalacia em bovinos: epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões no encéfalo. *Pesq Vet. Bras.*, v.297, n.7, p.487-497, 2009.

SANTOS, Infecção experimental de bezerros com recombinantes do herpesvírus bovino tipo 5 com deleções nos genes da glicoproteína e, timidina quinase e ambos. 2010. 35f. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria

SCHANG, L.M.; HOSSAIN, A.; JONES, C. The latency-related gene of bovine herpesvirus 1 encodes a product which inhibits cell cycle progression. *J. Virol.*, v.70, p.3807–3814, 1996. In: DELHON G.; MORAES M.P.; LU, Z.;

AFONSO C.L.; FLORES E.F.; WEIBLEN R.; KUTISH G.F.; ROCK D.L. Genome of bovine herpesvirus 5. *J. Virol.*, v.77, p.10339-10347, 2003.

SCHWYZER, M.; ACKERMANN, M. Molecular virology of ruminant herpesviruses. *Veterinary Microbiology*, v.53, n.1-2, p.17-29, 1996.

SILVA, A.M.; WEIBLEN, R.; IRIGOYEN, L.F.; ROEHE, P.M.; SUR, H.J.; OSÓRIO, F.A.; FLORES, E.F. Experimental infection of sheep with bovine herpesvirus typ-5: acute and latent infection. *Vet. Microbiol.*, v.66, p.89-99, 1999.

SOUZA V.F., MELO S.V., ESTEVES P.A., SCHMIDT C.S., GONÇALVES D.A., SCHAEFER R., SILVA T.C., ALMEIDA R.S., VICENTINI F., FRANCO A.C., OLIVEIRA E.A., SPILKI F.R., WEIBLEN R., FLORES E.F., LEMOS R.A., ALFIERI A.A., PITUCO E.M.; ROEHE P.M. Caracterização de herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesq. Vet. Bras.*, v.22, p.13-18, 2002.

SPILKI F.R.; ESTEVES P.A.; FRANCO A.C.; LIMA M.; HOLZ C.L.; BATISTA H.B.C.R.; DRIEMEIER D.; FLORES E.F.; WEIBLEN R.; ROEHE P.M. Neurovirulência e neuroinvasividade de herpesvírus bovinos tipos 1 e 5 em coelhos. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 22, p. 58-63. 2002.

SPILKI F.R., ESTEVES P.A., LIMA M.; FRANCO A.C.; CHIMINAZZO, C.; FLORES E.F.; WEIBLEN R.; DRIEMEIER D.; ROEHE P.M. Comparative pathogenicity of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) subtypes 1 (BHV-1.1) and 2a (BHV-1.2a). *Pesq. Vet. Bras.*, v.24, n.1, p.43-49, 2004.

SPILKI, F.R.; SILVA, T.C.; ESTEVES, P.A.; TEIXEIRA, M.B.; BATISTA, H.B.C.R.; CHIMINAZZO, C.; DRIEMEIER, D.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. Co-infections with bovine herpesvirus type 5 and bovine viral diarrhoea virus. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.5, p.699-707, 2006.

STUDDERT M.J. Bovine encephalitis herpesvirus. *Vet. Rec.*, v.125, p.584, 1989.

SUMMERS, B.A.; CUMMINGS, J. & DE LAHUNTA, A. Veterinary Neuropathology. Mosby, St. Louis. 527p, 1995.

SVS Secretária de Vigilância da Saúde. 2010. Retirado da internet em 17/01/2011 do site: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/prog_vig_raiva_dados_ate_out_2010.pdf

TEIXEIRA, M.B., ESTEVES, P.A, COELHO, C.S.S., et al. Diferenças em níveis de anticorpos neutralizantes contra herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5). *Pesq Agrop Gaúcha*, v.4, n.1, p.61-65, 1998.

VALERA, A.R; COSTA, E.F.; TRAVERIA, G.; ALVARADO PINEDO, M.F.; CHIALVA, M.; GALOSI, C.M. Brote de meningoencefalitis por herpesvirus bovino (BHV-5): en la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Med Vet.*, v.17, n.4, p.84-87, 2000.

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 system of latently, experimentally infected calves. *J. Clin. Microbiol.*, v. 41, p.4512-4520, 2003.

VOGEL, F.S.F.; LIMA M., FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; WINKELMANN, E.R.; MAYER S.V., MAZZUTTI, K.C. & ARENHART, S. Replicação e excreção viral durante a infecção aguda e após a reativação da latência induzida por dexametasona em bezerros inoculados com os herpesvírus bovinos tipo 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5). *Ciência Rural*, v.34, p.1619-1621, 2004.

YANG, S. & ROTHMAN, R.E. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect Dis.*, v.4, p.337–48, 2004.

WEIBLEN, R.; BARROS, C.S.L.; CANABARRO, T.F.; FLORES, E.F. Bovine meningoencephalitis from IBR virus. *Vet. Rec.*, v.124, p.666-667, 1989.

ANEXO 1

Tabelas

Normas da revista

Tabela 2. Alterações histopatológicas e os escores de intensidade de lesão nas diferentes regiões do SNC do bezerro 1, inoculado experimentalmente com BoHV-5.

Lesão*	Áreas**																		
	BO		CF		CP		CO		NB		TÁLAMO		M	P	B	GG	C	MC	Total
	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D							
Gliose focal	0	0	3	3	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	14
Gliose difusa	1	1	3	3	1	3	1	2	2	2	3	3	2	1	0	0	0	0	28
Edema	3	3	3	3	1	3	2	3	2	2	3	3	1	1	0	0	0	0	33
Necrose neuronal	2	2	3	3	2	3	1	2	1	1	2	2	1	2	0	0	0	0	27
Congestão	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	16
Hemorragia	0	0	1	1	0	2	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	6
Céls. Gitter	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	2	3	0	0	0	0	0	0	8
Neuronofagia	1	1	2	2	1	2	1	1	0	1	2	2	0	0	0	0	0	0	16
MPV	1	1	2	2	0	3	0	2	3	3	2	3	2	1	1	0	0	0	26
Meningite	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Malacia	0	0	2	2	0	2	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	10
Inf. Inflamatório	1	1	2	2	0	2	0	1	1	1	2	2	0	0	0	0	0	0	15
Total	10	10	25	25	6	23	6	14	11	12	20	22	7	8	2	0	0	0	201

* MPV. Manguitos perivasculares; Inf. Inflamatório. Infiltrado Inflamatório. ** BO. Bulbo olfatório; CF. Córtex frontal; CP. Córtex parietal; CO. Córtex occipital; NB. Núcleos da base; M. Mesencéfalo; P. Ponte; B. Bulbo; GG. Gânglio de Gasser; C. Cerebelo; MC. Medula cervical. (0) ausência de lesão; (1) lesão discreta - menos de 25% do tecido estava afetado; (2) moderada - 25 a 50% do tecido estava afetado; (3) acentuadas - comprometimento acima de 50% do tecido avaliado.

Tabela 3. Alterações histopatológicas e os escores de intensidade de lesão nas diferentes regiões do SNC do bezerro 2, inoculado experimentalmente com BoHV-5.

Lesão*	Áreas**																	
	BO			CF			CP			CO			NB			TÁLAMO		
	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D
Gliose focal	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Gliose difusa	1	1	2	2	2	2	2	2	2	3	1	1	1	1	1	2	0	1
Edema	1	1	2	2	2	2	2	2	2	3	3	1	1	1	0	2	0	0
Necrose neuronal	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3	3	1	0	0	0	2	0	0
Congestão	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0
Hemorragia	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0
Céls. Gitter	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
Neuronofagia	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	2	0	0	0
MPV	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1
Meningite	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Malácia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
Inf. Inflamatório	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0
Total	8	9	11	11	11	12	12	13	13	15	5	5	5	5	18	3	3	3
Total	8	9	11	11	11	12	12	13	13	15	5	5	5	5	18	3	3	3

* MPV. Manguitos perivascularres; Inf. Inflamatório. Infiltrado Inflamatório. ** BO. Bulbo olfatório; CF. Córtex frontal; CP. Córtex parietal; CO. Córtex occipital; NB. Núcleos da base; M. Mesencéfalo; P. Ponte; B. Bulbo; GG. Gânglio de Gasser; C. Cerebelo; MC. Medula cervical. (0) ausência de lesão; (1) lesão discreta - menos de 25% do tecido estava afetado; (2) moderada - 25 a 50% do tecido estava afetado; (3) acentuadas - comprometimento acima de 50% do tecido avaliado.

Tabela 4. Alterações histopatológicas e os escores de intensidade de lesão nas diferentes regiões do SNC do bezerro 3, inoculado experimentalmente com BoHV-5.

Lesão*	Áreas**																			
	BO		CF		CP		CO		NB		TÁLAMO		M	P	B	GG	C	MC	Total	
	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D								
Gliose focal	0	1	1	2	2	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	0	0	0	18	
Gliose difusa	0	0	1	2	1	1	0	1	0	0	1	2	1	1	1	0	0	0	12	
Edema	1	1	2	2	2	2	1	1	0	0	1	2	1	0	0	0	0	0	16	
Necrose neuronal	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	7	
Congestão	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	14	
Hemorragia	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	
Céls. Gitter	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	3	
Neuronofagia	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	2	0	1	1	0	0	0	12	
MPV	0	1	2	3	3	1	2	1	1	1	3	3	2	2	2	0	0	0	27	
Meningite	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	
Malacia	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	3	
Inf. Inflamatório	0	0	1	3	2	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	10	
Total	3	5	12	19	16	9	8	8	3	4	11	16	6	6	6	0	0	0	132	

* MPV. Manguitos perivascularares; Inf. Inflamatório. Infiltrado Inflamatório. ** BO. Bulbo olfatório; CF. Córtex frontal; CP. Córtex parietal; CO. Córtex occipital; NB. Núcleos da base; M. Mesencéfalo; P. Ponte; B. Bulbo; GG. Gânglio de Gasser; C. Cerebelo; MC. Medula cervical. (0) ausência de lesão; (1) lesão discreta - menos de 25% do tecido estava afetado; (2) moderada - 25 a 50% do tecido estava afetado; (3) acentuadas - comprometimento acima de 50% do tecido avaliado.

Tabela 5. Alterações histopatológicas e os escores de intensidade de lesão nas diferentes regiões do SNC do bezerro 4, inoculado experimentalmente com BoHV-5.

Lesão*	Áreas**																		
	BO		CF		CP		CO		NB		TÁLAMO		M	P	B	GG	C	MC	Total
	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D							
Gliose focal	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	2	1	1	1	1	0	0	0	14
Gliose difusa	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	8
Edema	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	9
Necrose neuronal	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	6
Congestão	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	15
Hemorragia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Céls. Gitter	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Neuronofagia	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	8
MPV	1	1	2	2	1	1	1	0	2	1	2	1	1	1	1	0	0	0	18
Meningite	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
Malacia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Inf. Inflamatório	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	2
Total	4	6	9	9	3	5	4	3	8	4	12	6	4	5	5	0	0	0	87

* MPV. Manguitos perivascularres; Inf. Inflamatório. Infiltrado Inflamatório. ** BO. Bulbo olfatório; CF. Córtex frontal; CP. Córtex parietal; CO. Córtex occipital; NB. Núcleos da base; M. Mesencéfalo; P. Ponte; B. Bulbo; GG. Gânglio de Gasser; C. Cerebelo; MC. Medula cervical. (0) ausência de lesão; (1) lesão discreta - menos de 25% do tecido estava afetado; (2) moderada - 25 a 50% do tecido estava afetado; (3) acentuadas - comprometimento acima de 50% do tecido avaliado.

Tabela 6. Alterações histopatológicas e os escores de intensidade de lesão nas diferentes regiões do SNC do bezerro 5, inoculado experimentalmente com BoHV-5.

Lesão*	Áreas**																	
	BO		CF		CP		CO		NB		TÁLAMO		M	P	B	GG	C	MC
	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D						
Gliose focal	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
Gliose difusa	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0
Edema	1	1	2	2	2	2	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Necrose neuronal	1	1	2	1	2	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
Congestão	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
Hemorragia	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Céls. Gitter	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Neuronofagia	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
MPV	1	1	1	2	1	1	0	0	1	2	2	1	1	1	1	0	0	0
Meningite	0	0	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Malacia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Inf. Inflamatório	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
Total	6	6	8	10	9	7	3	4	3	6	7	7	3	5	3	0	0	87

* MPV. Manguitos perivascularares; Inf. Inflamatório. Infiltrado Inflamatório. ** BO. Bulbo olfatório; CF. Córtex frontal; CP. Córtex parietal; CO. Córtex occipital; NB. Núcleos da base; M. Mesencéfalo; P. Ponte; B. Bulbo; GG. Gânglio de Gasser; C. Cerebelo; MC. Medula cervical. (0) ausência de lesão; (1) lesão discreta - menos de 25% do tecido estava afetado; (2) moderada - 25 a 50% do tecido estava afetado; (3) acentuadas - comprometimento acima de 50% do tecido avaliado.

Tabela 7. Alterações histopatológicas e os escores de intensidade de lesão nas diferentes regiões do SNC do bezerro 6, inoculado experimentalmente com BoHV-5.

Lesão*	Áreas**																		
	BO		CF			CP			CO			NB			TÁLAMO			M	P
	E	D	E	D	E	E	D	E	E	D	E	E	D	E	E	D	E		
Gliose focal	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Gliose difusa	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	2	0	0	0	0
Edema	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
Necrose neuronal	1	0	0	2	1	1	1	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Congestão	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Hemorragia	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Céls. Gitter	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Neuronofagia	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
MPV	1	1	2	2	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Meningite	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Malacia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Inf. Inflamatório	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Total	7	6	9	13	6	9	9	6	7	6	6	5	5	7	7	4	3	3	98

* MPV. Manguitos perivascularres; Inf. Inflamatório. Infiltrado Inflamatório. ** BO. Bulbo olfatório; CF. CórTEX frontal; CP. CórTEX parietal; CO. CórTEX occipital; NB. Núcleos da base; M. Mesencéfalo; P. Ponte; B. Bulbo; GG. Gânglio de Gasser; C. Cerebelo; MC. Medula cervical. (0) ausência de lesão; (1) lesão discreta - menos de 25% do tecido estava afetado; (2) moderada - 25 a 50% do tecido estava afetado; (3) acentuadas - comprometimento acima de 50% do tecido avaliado.

INSTRUÇÕES PARA AUTORES – PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@terra.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word. Havendo necessidade (por causa de figuras “pesadas”), podem ser enviados em CD pelo correio, com uma via impressa, ao Dr. Jürgen Döbereiner, Revista PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, Caixa Postal 74.591, Seropédica, RJ 23890-000.

Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.

Apesar de não serem aceitas comunicações (*Short communications*) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia somente os da área de Animais Selvagens serão recebidos para submissão.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias.

Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (*peer review*).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (*page charge*)

no valor de R\$ 120,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), **Agradecimentos e REFERÊNCIAS:**

a) o **Título** do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores

de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) **Autor(es)** deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o **ABSTRACT** deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de “INDEX TERMS” ou “TERMOS DE INDEXAÇÃO”, respectivamente;

d) o **RESUMO** deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões.

Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

-
- f) em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;
- g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;
- h) na **DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;
- i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;
- j) **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;
- k) a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences), o “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

- a) os trabalhos devem ser submetidos **segundo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob “Instruções aos Autores” (www.pvb.com.br)**. A digitalização deve ser na fonte **Helvética, corpo 11, entrelinha simples**; a **página** deve ser **no formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive
-

gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta “Inserir” do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada.

Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails de outros autores;

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. **Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”;** **a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez.** A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano;** a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das **REFERÊNCIAS** deverá ser apresentada **isenta do uso de caixa alta**, com os nomes científicos em itálico (grifo), **e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista**, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) **originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica**. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor.

Nesse **caso**, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra “pé”. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas , com independência do texto) e **serão apresentadas no final do trabalho**.

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e **colocados no final do texto**. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. **Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, começando, se possível, com “a” em cada Quadro**; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

Polioencefalomalacia experimental em bovinos induzida por toxicose por enxofre¹

Paulo H.J. Cunha^{2*}, Peres R. Badial³, Didier Q. Cagnini³, José P. Oliveira-Filho³, Livia F. Moares³, Regina K. Takahira³, Renée L. Amorim³ e Alexandre S. Borges³

ABSTRACT.- Cunha P.H.J., Badial P.R., Cagnini D.Q., Oliveira Filho J.P., Moraes L.F., Takahira R.K., Amorim R.L. & Borges A.S. 2011. [Experimental polioencephalomalacia in cattle induced by sulfur toxicosis.] Polioencefalomalacia experimental em bovinos induzida por toxicose por enxofre. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 31(1):41-52. Departamento de Medicina Veterinária, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Rua 13 no.278, Apto 400, Plaza Residencial Sol de La Plaza, Setor Oeste, Goiânia, GO 74120-060, Brazil. E-mail: phcunhavet@yahoo.com.br

The aims of this study were to evaluate the clinical signs, the ruminal hydrogen sulfide concentration and the histological lesions induced by sulfur toxicosis in cattle. Ten crossbred calves were fed an experimental diet, four without sodium sulfate (G1) and six with (G2). The calves were submitted to clinical (rectal temperature, cardiac and respiratory rate and ruminal motricity) and laboratorial (hemogram, fibrinogen, total plasma protein, ruminal fluid pH, ruminal hydrogen sulfide concentration, cerebrospinal fluid and histopathological) evaluations. Rectal temperature, cardiac rate, hemogram, fibrinogen, total plasma protein, ruminal fluid pH and cerebrospinal fluid values were within normal reference ranges in animals from both groups. Ruminal hypomotricity and increased respiratory rate and ruminal hydrogen sulfide concentration occurred in G2 animals. One out of six calves in G2 developed neurological signs and lesions of PEM. Two calves of each Group were euthanized. Microscopic lesions of PEM were observed in G2 animals. Histologically there were cortical neuronal necrosis and hemorrhagic lesions in basal nuclei, thalamus, midbrain, pons and medulla oblongata. The experimental model consisting of a diet with high carbohydrate and low in long fiber content with high sulfur concentrations (0.52%) resulted in clinical and histological abnormalities and high ruminal hydrogen sulfide concentration consistent with sulfur toxicosis in cattle.

INDEX-TERMS: Cerebrocortical necrosis, sulfur, cattle, experimental model, ruminal hydrogen sulfide.

RESUMO.- O presente trabalho teve como objetivos avaliar os sinais clínicos, as concentrações do sulfeto de hidrogênio ruminal e as alterações anatomopatológicas associadas à intoxicação experimental por enxofre em bovinos. Foram utilizados dez bezerros mestiços leiteiros, sen-

do que quatro bovinos ingeriram ração sem sulfato de sódio (G1) e seis consumiram ração com sulfato de sódio (G2). Exames clínicos (temperatura retal, frequência cardíaca e respiratória e motricidade ruminal) e laboratoriais (hemograma, fibrinogênio, proteína plasmática, pH do fluido ruminal, concentração do sulfeto de hidrogênio ruminal, líquido cerebrospinal e histopatológico) foram realizados. A temperatura retal, frequência cardíaca, hemograma, fibrinogênio, proteína plasmática, pH do fluido ruminal e os valores do líquido cerebrospinal estavam dentro dos valores de referência para a espécie. Taquipnéia, hipomotricidade ruminal e elevados valores de sulfeto de hidrogênio ruminal foram observados nos bezerros do grupo G2. Um bezerro do grupo G2 apresentou sinais neurológicos e lesões histopatológicas de PEM. Dois animais de cada grupo foram eutanasiados. Lesões microscópicas foram ob-

¹ Recebido em 9 de março de 2010.

Aceito para publicação em 6 de setembro de 2010.

Parte da tese de Doutorado do primeiro autor. Financiada integralmente pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2006/05836-6).

² Depto Medicina Veterinária, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás (UFG). Endereço particular: Rua 13 no.278, Apto 400, Plaza Residencial Sol de La Plaza, Setor Oeste, Goiânia, GO 74120060, Brasil. *Autor para correspondência: phcunhavet@yahoo.com.br

³ Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de Botucatu, Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-000, Brasil.

servadas nos bezerros do G2. Histologicamente as alterações observadas foram necrose neuronal cortical e lesões hemorrágicas nos núcleos basais, tálamo, mesencéfalo, ponte e bulbo. O protocolo experimental constituído por uma dieta rica em carboidrato de alta fermentação, baixa quantidade de fibra efetiva e altos níveis de enxofre (0,52%) ocasionou alterações clínicas e histológicas e elevadas concentrações de sulfeto de hidrogênio ruminal compatíveis com quadro de intoxicação por enxofre.

TERMOS-INDEXAÇÃO: Necrose cerebrocortical, enxofre, bovinos, modelo experimental, sulfeto de hidrogênio ruminal.

INTRODUÇÃO

Polioencefalomalacia (PEM) é uma doença cerebrocortical degenerativa dos ruminantes sendo o termo utilizado para indicar necrose laminar do córtex cerebral possuindo vários fatores associados a sua ocorrência (Gould 1998, Gould 2000, Cebra & Cebra 2004, Burgess 2008, Sant'Ana et al. 2009a,b).

Na literatura internacional uma das principais causas de PEM relatada tem sido a intoxicação por enxofre (Raisbeck 1982, Gunert et al. 1987, Gooneratne et al. 1989, Sager et al. 1990, Gould et al. 1991, Hamlen et al. 1993, Jeffrey et al. 1994, McAllister et al. 1997, Loneragan et al. 1998, Gould 1998, Gould 2000, Niles et al. 2000, Loneragan et al. 2001, Niles et al. 2002, Haydock 2003, Loneragan et al. 2005, Kul et al. 2006, Dewhurst et al. 2007, McKenzie et al. 2009). Outras etiologias descritas foram deficiência da tiamina (Jensen et al. 1956, Edwin & Jackman 1973), intoxicação por cloreto de sódio associada à privação de água (Trueman & Clague 1978, Osweiler et al. 1995), intoxicação por chumbo (Christian & Tryphonas 1971), ingestão de melaço (Mella et al. 1976) ou de plantas ricas em tiaminases (Pritchard & Eggleston 1978) e infecção por herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) (Perez et al. 2003, Rissi et al. 2008).

No Brasil, existem relatos de surtos de PEM em bovinos ocasionados por intoxicação por cloreto de sódio associada à privação de água (Lemos et al. 1997, Nakazato et al. 2000), intoxicação por chumbo (Lemos et al. 2004, Traverso et al. 2004), forma aguda da intoxicação por *Phalaris* spp. (Souza & Irigoven 1999) e infecção pelo BoHV-5 (Salvador et al. 1998, Sanches et al. 2000, Claus et al. 2002, Colodel et al. 2002, Elias et al. 2004, Riet-Correa et al. 2006, Barros et al. 2006, Mendes et al. 2007, Rissi et al. 2006, 2007, 2008, Lunardi et al. 2009). O diagnóstico de PEM no Brasil já foi anteriormente sugerido ou associado a distúrbio no metabolismo da tiamina (Santos et al. 1983, Gonçalves et al. 2001, Mendes et al. 2007), intoxicação por enxofre (Traverso et al. 2001, Lima et al. 2005) e alterações bruscas na dieta (Moro et al. 1994). Estes diagnósticos foram estabelecidos correlacionando dados epidemiológicos, sinais neurológicos, achados histopatológicos e/ou resposta favorável à terapia com tiamina, sendo que as etiologias não foram confirmadas laboratorialmente.

A necessidade da melhor compreensão da etiopatogenia da PEM no Brasil tem estimulado o estabelecimento de modelos experimentais em ruminantes. Em um estudo

experimental foi demonstrado que bovinos que tinham sido inoculados anteriormente com BoHV-5 desenvolviam meningoencefalite após a indução de PEM mediante a administração de amprólio ou sulfato de sódio (David et al. 2007). Cunha et al. (2008) induziram PEM em dois bovinos Nelore fornecendo diariamente por via nasoesofágica enxofre a 1% da matéria seca e Sant'Ana et al. (2009c) intoxicaram cinco ovinos administrando amprólio por via oral em doses diárias de 500 e 1.000 mg/kg de peso do animal.

Os objetivos desse trabalho foram de avaliar os sinais clínicos, as concentrações do sulfeto de hidrogênio ruminal e as alterações anatomopatológicas associadas à intoxicação experimental por enxofre em bezerros.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 10 bezerros mestiços leiteiros, machos, com oito meses de idade, pesando entre 100-120 kg, mantidos durante todo o período experimental em baias individuais. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos, sendo que quatro bovinos receberam ração sem adição de sulfato de sódio (G1) e seis animais receberam a ração acrescida de sulfato de sódio (G2). O grupo G1 foi constituído pelos Bovinos 3, 5, 10 e 11, e o grupo G2 pelos Bezerros 1, 4, 6, 7, 8 e 9. Na ração do grupo G2 foi adicionado diariamente como fonte de enxofre, o sulfato de sódio, totalizando um consumo de 0,52% de enxofre na matéria seca.

O protocolo de intoxicação foi adaptado de Sager et al. (1990) com algumas modificações. O período experimental foi dividido em três fases. A fase 1 constituiu a adaptação dos bovinos com suplementação exclusiva de feno por um período de 14 dias, enquanto a fase 2 compreendeu um período de sete dias de transição do feno para ração, retirando-se 1/2 kg do feno/dia/bezerro e adicionando-se 1/2 kg da ração/dia/bezerro. Na última fase (fase 3), os animais receberam exclusivamente ração durante 14 dias. A ingestão do feno coast-cross (*Cynodon dactylon*) e o consumo da ração foram de 2,5% do peso animal.

A ração fornecida era constituída por casca de aveia (30%), farelo de soja (18,5%), amido (17%), dextrose (17%), óleo de milho (4%), uréia (3%), bicarbonato de sódio (2%), fosfato de cálcio (2,5%), sulfato de sódio (0,8%), cloreto de potássio (0,5%), óxido de magnésio (0,2%) e água (4,5%). Ainda foram incorporados na ração 2.000 UI/kg vitamina A, 100 UI/kg vitamina D, 20 UI/kg vitamina E, 80 mg/kg ferro, 40 mg/kg manganês, 20 mg/kg zinco, 1 mg/kg cobalto, 1 mg/kg iodo e 4 mg/kg cobre.

As análises bromatológicas do feno de Coast-cross (*Cynodon dactylon*) (95,33% matéria seca; 10,28% proteína bruta; 6,35% extrato etéreo; 4,54% minerais; 33,98% fibra bruta; 44,85% extrato não nitrogenado; 63,5% nutrientes digestíveis totais; 76,89% fibra detergente neutra; 40,7% fibra detergente ácida) e da ração (90,45% matéria seca; 21,19% proteína bruta; 4,31% extrato etéreo; 10,7% minerais; 3,92% fibra bruta; 59,88% extrato não nitrogenado; 87,27% nutrientes digestíveis totais; 29,34% fibra detergente neutra; 13,25% fibra detergente ácida) foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (FMVZ/Unesp-Botucatu).

As análises de elementos minerais do feno de Coast-cross (*Cynodon dactylon*) (14g/kg de nitrogênio, 1,1g/kg de fósforo,

15g/kg de potássio, 2g/kg cálcio, 1,0g/kg de magnésio, 3,5g/kg de enxofre, 14mg/kg de boro, 9mg/kg de cobre, 190mg/kg de ferro, 156mg/kg de manganês e 16mg/kg de zinco) e da ração (3,32g/kg de nitrogênio, 5g/kg de fósforo, 6,5g/kg de cálcio, 2,2g/kg de magnésio, 940mg/kg de enxofre, 227,5mg/kg de ferro, 80mg/kg de manganês, 0,80mg/kg de selênio, 20mg/kg de cobre, 77,5mg/kg de zinco, 5,5g/kg de sódio, 35mg/kg de boro e 2,5mg/kg de molibdênio) foram realizadas, respectivamente, nos Laboratórios de Nutrição Mineral de Plantas do Departamento de Recursos Naturais e Ciência do Solo da Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP/Botucatu e no Instituto Campineiro de Análise de Solo e Adubo Ltda. A dosagem de enxofre da água (11mg/L) do poço semi-artesiano foi conduzida no Laboratório de Fertilizantes e Corretivos da Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP/Botucatu.

Os animais foram colocados em tronco de contenção para a realização do exame físico. Em seguida, foram obtidas amostras de sangue para a realização de hemograma e avaliação do fibrinogênio e proteína plasmáticas, de gás ruminal para determinar as concentrações do sulfeto de hidrogênio ruminal (H_2S ou gás sulfídrico) e o fluido ruminal para aferir o pH ruminal. Os animais foram monitorados diariamente para detecção de sinais clínicos encefálicos. O exame físico, as dosagens de gás sulfídrico ruminal e as colheitas das amostras de sangue e líquido ruminal foram realizadas com intervalos de sete ou 14 dias (Quadro 1) para evitar estresse de manejo e interferência no consumo da ração. No final da fase 3 foram colhidas amostras do líquido cefalorraquidiano (LCR) dos Bovinos 4, 6, 7, 8 e 9 (G2).

As amostras de sangue total foram colhidas, por venopunção da jugular, em tubos contendo anticoagulante (EDTA) e submetidas à contagem de células em câmara hematómetriza de Neubauer, à determinação do volume globular pelo método do microhematócrito e à dosagem de hemoglobina pelo método da cianometahemoglobina, calculando-se posteriormente os índices hematimétricos (volume globular médio e concentração de hemoglobina globular média). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em 100 células em esfregaços sanguíneos corados pelo panótico rápido⁴. Para a mensuração do fibrinogênio utilizou-se a técnica de precipitação no tubo de microhematócrito a 56°C e a proteína foi determinada diretamente pela refratometria (Coles 1984).

A técnica da dosagem de sulfeto de hidrogênio ruminal utilizada foi adaptada de Gould et al. (1997) com as modificações descritas a seguir. Inicialmente foi realizada a tricotomia da fossa paralombar esquerda e anti-sepsia com iodopovidona (PVPI), sendo que a punção ruminal foi realizada no ponto médio da porção mais dorsal da fossa paralombar esquerda utilizando-se a agulha do cateter intravenoso 14G sem a cânula externa de teflon. Em seguida, foi encaixado ao conector da

Quadro 1. Momentos em que foram realizados os exames físicos, as colheitas de amostras de sangue total e de fluido ruminal e as dosagens de sulfeto de hidrogênio ruminal (H_2S) dos bovinos do grupo que ingeriu ração sem sulfato de sódio (G1) e com sulfato de sódio (G2) nas três fases do protocolo de indução experimental de polioencefalomalacia

Fases	Exame físico (dia)	Sangue (dia)	H_2S ruminal (dia)	Fluido ruminal (dia)
1	1°, 7° e 14°	1° e 14°	1°, 7° e 14°	1°, 7° e 14°
2	7°	7°	7°	7°
3	7° e 14°	14°	3°, 7°, 10° e 14°	7° e 14°

agulha um equipo de infusão intravenosa com 15 cm de comprimento, cortando e desprezando-se a extremidade com o gotejador. A ponta cortada do equipo adaptado foi acoplada a um tubo colorimétrico de dosagem de gás sulfídrico, que já estava previamente inserido na bomba manual de vácuo⁵. As mensurações foram realizadas de acordo com o manual do fabricante da bomba de vácuo, utilizando tubos colorimétricos para valores entre 25 e 1.000 ppm⁶ ou 1.000 a 40.000 ppm⁷ de sulfeto de hidrogênio. Nos momentos em que não ocorreu mudança na coloração do tubo, repetiu-se a dosagem e não se detectando alteração foi estabelecido que o valor aferido estivesse abaixo do limite inferior de detecção do tubo (<25ppm de H_2S ruminal).

As amostras do conteúdo ruminal foram obtidas por meio de uma bomba de sucção a vácuo, acoplada a um recipiente de vidro e a uma sonda oroesofágica tipo Schambye e Sorensen (Dirksen et al. 1993). Para a avaliação do pH ruminal⁸ os primeiros 200mL foram desprezados para evitar contaminação com a saliva, sendo colhidos aproximadamente 100mL de cada animal.

As coletas de LCR foram realizadas segundo protocolo proposto por Mayhew (1989). Após sedação com 0,20 mg/kg/IV de cloridrato de xilazina⁹, tricotomia e anti-sepsia com PVPI, a punção foi realizada na cisterna atlanto-occipital com agulha spinal¹⁰.

As amostras de LCR foram coletadas em três tubos estéreis sem EDTA. Para análise do LCR foi utilizada uma fração da amostra do terceiro tubo. O número de leucócitos e hemácias por microlitro do LCR foi mensurado com o uso da câmara de Fuchs-Rosenthal. A contagem diferencial de leucócitos foi feita em lâminas preparadas por citocentrifugação¹¹ e coradas pelo panótico rápido. As proteínas¹² e a glicose¹³ foram dosadas com kits comerciais, empregando o método colorimétrico, cujas leituras das reações foram feitas em espectrofotômetro¹⁴.

⁴ Instant Prov, Newprov Produtos para Laboratório, Av. Primeiro de Maio 590, Pinhais, PR.

⁵ Bomba modelo AP-20S, Sensidyne®, Sensidyne Industrial Health and Safety Instrumentation, Clearwater, Florida, USA. Representante no Brasil: Almont do Brasil, Rua Horácio de Castilho 284, Vila Maria Alta, São Paulo, SP.

⁶ Tubos colorimétricos modelo 120 SF, Sensidyne®, Sensidyne Industrial Health & Safety Instrumentation, Clearwater, Florida, USA. Representante no Brasil: Almont do Brasil, Rua Horácio de Castilho 284, Vila Maria Alta, São Paulo, SP.

⁷ Tubos colorimétricos modelo 120 SH, Sensidyne®, Sensidyne Industrial Health & Safety Instrumentation, Clearwater, Florida, USA. Representante no Brasil: Almont do Brasil, Rua Horácio de Castilho 284, Vila Maria Alta, São Paulo, SP.

⁸ Phtek®, modelo pH100, Tecnoglobo equipamentos para laboratório, Rua Holanda 1166, Bairro Boa Vista, Curitiba, PR.

⁹ Vibaxil 2%, Virbac Saúde Animal, Av. Engenheiro Eusébio Stevaux 1368, Jurubatuba, SP.

¹⁰ BD Spinal 20G x 31/2", Becton Dickison Ind. Cirúrgicas Ltda, Av. Pres. Juscelino Kubitschek 273, Juiz de Fora, MG.

¹¹ Citocentrífuga Citológica Microprocessada modelo 200D, Cientec Equipamentos para Laboratórios, Rua Buenos Aires 717, Parque Água Branca, Piracicaba, SP.

¹² Sensiprot, Labtest Diagnóstica, Av. Paulo Ferreira da Costa 600, Lagoa Santa, MG.

¹³ Glicose, Labtest Diagnóstica, Av. Paulo Ferreira da Costa 600, Lagoa Santa, MG.

¹⁴ Espectrofotômetro Digital B 44242, Micronal, Rua João Rodrigues Machado 25, Brooklin, São Paulo, SP.

O bovino que morreu naturalmente (Bezerro 1) e os animais submetidos à eutanásia (Bezerros 4, 5, 7 e 10) foram necropsiados. A eutanásia foi realizada utilizando cloridrato de xilazina (0,10mg/kg/IV), tiopental sódico (8mg/kg/IV) e por último cloreto de potássio.

Amostras de tecido hepático e renal do Animal 10 do grupo G1 e dos Bovinos 1, 4 e 7 do grupo G2 foram coletadas para dosagem de chumbo por espectrofotometria por absorção atômica no Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX) do Instituto de Biociências da Unesp-Botucatu.

Uma porção do córtex frontal do Bezerro 1 foi colhida para realizar a técnica da PCR para diagnóstico diferencial do herpesvírus bovino 5. O processo de extração de DNA foi realizado a partir de 20 mg da amostra de encéfalo utilizando kit de extração¹⁵. A técnica da PCR foi realizada segundo Claus et al. (2005) com algumas modificações. Os "primers" utilizados foram B5 (senso) específico para BoHV-5 (5'- CGG ACG AGA CGC CCT TGG-3' NT 322-339) e primer anti-senso denominado Bcon (5'-AGT GCA CGT ACA GCG GCT CG-3' NT 519-538), que amplificaram fragmento com 159 pb do gene da glicoproteína C do BoHV-5. Como controle positivo utilizou-se amostra AA PAR do BoHV-5, isolada do cérebro de um bovino apresentando sinais de encefalite cedida pelo Laboratório de Virologia Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina. Realizou-se a PCR com a enzima GoTaq® Green Master Mix¹⁶. A reação foi padronizada para um volume final de 50µl e possuía 0,4µM de cada oligonucleotídeo iniciador (senso e anti-senso), 5µl de DNA, 25µl GoTaq® Green Master Mix, 8% DMSO¹⁷ e água "nuclease-free" q.s.p. O processo de amplificação foi realizado em termociclador¹⁸ de acordo com as seguintes condições de tempo e temperatura: 1 ciclo de 2 min. a 95°C seguido por 40 ciclos de 40 segundos a 94°C (denaturação), 1 min. com temperatura de hibridização de 57,8°C, 1 min. a 72°C (extensão) e um ciclo de extensão final de 5 min. a 72°C. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com GelRed™¹⁹ e visualizado sob luz ultra-violeta. Os géis foram documentados no ImageQuant®²⁰.

Os fragmentos encefálicos (porção occipital do telencéfalo, tálamo, vermix do cerebelo e a porção final do tronco encefálico do Bezerro 1) foram congelados e encaminhados para exame de imunofluorescência direta para diagnóstico diferencial de raiva no Departamento de Higiene e Saúde Pública da FMVZ/Unesp-Botucatu.

O exame macroscópico sob aplicação da luz ultra-violeta no comprimento de 365nm (lâmpada de Wood) foi realizado na porção do córtex frontal dos Bezerros 1, 4 e 7 do grupo G2, de acordo com Edwin & Jackman (1981).

Para o exame histopatológico foram colhidas as seguintes porções do sistema nervoso central (SNC): bulbo olfatório, córtex frontal (anterior) na altura do joelho do corpo caloso, córtex occipital (posterior), córtex parietal (dorso-lateral), núcleos basais, tálamo, mesencéfalo na altura dos colículos rostrais, ponte com pedúnculos cerebelares, bulbo na altura do óbex e cerebelo. Adicionalmente foram examinados em monobloco o gânglio de Gasser (trigêmeo), *rete mirabile* e hipófise (GRH). As amostras foram fixadas em formol tamponado a 10% para a realização do exame histopatológico.

Na análise histopatológica, a intensidade das lesões foi estabelecida considerando lesão discreta (1) quando menos de 25% do tecido estava afetado, moderada (2) referente a alterações de 25 a 50% e acentuadas (3) indicando comprometimento acima de 50% do tecido avaliado. Os seguintes aspectos foram computados para a obtenção da intensidade das lesões: hemorragia, congestão, edema do neurópilo, infiltrado inflamatório, meningite, gliose focal, gliose difusa, neurônios vermelhos (neurônios com o citoplasma encolhido e eosinofílico e núcleo picnótico), neuronofagia, malacia (necrose do componente neuroectodérmico com manutenção das estruturas mesenquimais e infiltrado de macrófagos tumefeitos e com citoplasma espumoso [células *Gitter*]), e lesão residual (estruturas vasculares e células *Gitter* remanescentes, formando uma estrutura cavitária semelhante a um cisto). Cada um dos aspectos avaliados foi relacionado à seção anatômica examinada, com o objetivo de determinar a localização das lesões produzidas pela doença no SNC. Adicionalmente, foram avaliados qualitativamente o tipo de infiltrado inflamatório e a presença de corpúsculos de inclusão intranucleares característicos de herpesvírus (Rissi et al. 2006, Sant'Ana et al. 2009a).

Os resultados da temperatura retal, frequência cardíaca e respiratória, motricidade ruminal, do hemograma, do fibrinogênio plasmático, da proteína plasmática, do pH ruminal e do líquido cefalorraquidiano foram submetidos à análise descritiva, constituída pelo cálculo das médias aritméticas e dos desvios-padrão. A média e os desvios padrão para o parâmetro da determinação da concentração do sulfeto de hidrogênio ruminal foram calculados e submetidos à análise estatística no programa GraphPad InStat versão 3.0 para Windows (GraphPad Software) e foram avaliadas por análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey. Diferença estatística foi considerada para $p \geq 0,05$ (Sampaio 1998). Para realização da análise estatística foi considerado o valor de 24 ppm nas aferições referentes aos valores inferiores a 25ppm do sulfeto de hidrogênio ruminal.

Todos os procedimentos realizados estavam de acordo com as normas e princípios éticos de experimentação animal, estabelecidos pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da FMVZ/UNESP/Botucatu, sendo o experimento aprovado pela mesma (Protocolo nº 117/2006-CEEA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O período inicial de 15 dias (fase 1) foi importante porque proporcionou a adaptação dos animais nas baias, facilitando o manejo dos mesmos no tronco para a realização dos exames físicos e colheita das amostras para a execução dos exames complementares propostos. Na fase 2, a mudança gradativa no intervalo de sete dias da dieta contendo feno para alimentação exclusivamente com ração, não ocasionou distúrbios metabólicos como acidose ruminal.

¹⁵ QIAamp® DNA Mini Kit (cat nº 51304), Qiagen Biotecnologia Brasil Ltda, Av. Jabaquara 1909, São Paulo, SP.

¹⁶ Promega, Madison, WI, EUA. Representante no Brasil: Prodimol Biotecnologia, Praça Carlos Chagas 49, Santo Agostinho, Belo Horizonte, MG.

¹⁷ Dimetilsulfóxido (DMSO), Sigma-Aldrich®. Representante no Brasil: Interjet produtos para laboratório, Rua Sobralia 254, Vila Gea, São Paulo, SP.

¹⁸ Mastercycler® ep Eppendorf. Eppendorf Brasil, Rua Ferreira Araújo 221, São Paulo, SP.

¹⁹ Biotium, Halward, CA, EUA. Representante no Brasil: Uniscence do Brasil, Av. Cândido Portinari 933/93, São Paulo, SP.

²⁰ GE Healthcare. Ge Healthcare Life Sciences do Brasil, Av. Paulista 37, Bairro Bela Vista, São Paulo, SP.

A composição e a proporção dos ingredientes da ração do presente estudo, bem como os resultados da análise bromatológica e mineral foram muito similares à ração experimental utilizada por Sager et al. (1990) no protocolo de indução por PEM por ingestão excessiva de enxofre.

Para cálculo do consumo de enxofre pelos bovinos na fase 1, verificou-se que a ingestão do feno foi de 2,5% do peso vivo representando a ingestão de 0,35% de enxofre na matéria seca. Para o cálculo da ingestão de enxofre na água foi estimado que um bovino de 120 kg mantido em temperatura ambiente de 28°C deve ingerir aproximadamente 20 litros de água por dia (Gould 2000), totalizando o consumo de 220 mg de enxofre por dia (0,022% de enxofre). A ingestão de enxofre na água e feno na fase 1 totalizou o consumo de 0,37% na matéria seca, valor este acima do nível recomendado (0,15%) por Klasing et al. (2005). Este alto consumo de enxofre na matéria seca ocorreu porque o valor determinado no feno estava o dobro do descrito como normal por Valadares Filho (2006). A explicação para incremento do enxofre no feno pode ser justificada pela intensa adubação com sulfato de amônio realizada pela empresa que comercializou o volumoso objetivando aumentar o seu valor nutritivo. O sulfato de amônio quando utilizado como fertilizante proporciona aumento na concentração de enxofre na forragem (Arthington et al. 2002) e melhora a digestibilidade da fibra em detergente ácido e da fibra em detergente neutro das forragens cultivadas nestes solos, quando fornecida aos ruminantes (Ahmad et al. 1995).

Na fase 3, para o grupo G1, o cálculo do consumo de enxofre foi baseado na ingestão de 2,5% do peso vivo da matéria seca da ração (0,09% de enxofre na matéria seca) somado ao da água (0,022% de enxofre por dia), totalizando, aproximadamente, 0,11% de enxofre na matéria seca. Para o grupo G2, acrescentou-se o sulfato de sódio na ração como fonte de enxofre, que somado à ingestão do enxofre na água totalizou 0,52% de enxofre na matéria seca. O estabelecimento do nível tóxico na dieta fornecida para os bovinos do grupo G2 foi baseado nas recomendações do Klasing et al. (2005), que preconizaram o valor de tolerância máxima de enxofre de 0,30% para dietas compostas com mais de 85% de concentrado.

A temperatura retal e a frequência cardíaca estavam

dentro dos valores considerados normais por Radostits et al. (2007). Entretanto, episódios de taquipnéia foram observados nos Bezerros 3 e 5 do grupo G1 e nos animais 4 e 8 do grupo G2 na fase de adaptação e na fase 3 somente no grupo G2 (Bezerros 4 e 8). Sager et al. (1990) e Gould et al. (1997) ao induzirem PEM com protocolo semelhante ao do presente estudo observaram episódios transitórios de taquipnéia nos bezerros ao ingerirem ração com excesso de enxofre. Os resultados das induções experimentais e as descrições de surtos de PEM por enxofre indicaram que antes dos animais apresentarem sinais neurológicos, a temperatura retal e as frequências cardíaca e respiratória podem estar alteradas (Gunn et al. 1987, Mckenzie et al. 2009) ou não (Loneragan et al. 1998, Haydock 2003). Nos ruminantes, 60% dos gases eructados podem ser inalados, favorecendo a exposição do trato respiratório ao gás sulfídrico durante episódios de produção exagerada de sulfeto de hidrogênio ruminal, podendo ocasionar alterações respiratórias em bovinos (Kung et al. 1998), justificando os episódios de taquipnéia observados na fase 3 nos Bezerros 4 e 8 do grupo G2.

Com relação à motricidade ruminal (Quadro 2), nos dois grupos experimentais observou-se valores normais (Dirksen et al. 1993) somente na primeira fase. A hipomotricidade ruminal observadas nas fases 2 e 3, em ambos os grupos, não foi relatada por Gould et al. (1997), mas estes autores observaram em alguns animais timpanismo gasoso. A hipomotricidade ruminal constatada na fase 2 ocorreu devido à baixa quantidade de fibra oferecida, enquanto que na fase 3 pelo fornecimento de dieta contendo exclusivamente ração. A motricidade ruminal é estimulada pela presença de fibra efetiva (Dirksen et al. 1993).

Os resultados do eritrograma (Quadro 3), leucograma (Quadro 4), do fibrinogênio plasmático e proteína plasmática (Quadro 5) estavam dentro dos valores de referência citados por Radostits et al. (2007). Loneragan et al. (1998) relataram surto de PEM em bezerros de corte recém desmamados e confinados ocasionado pela ingestão excessiva de enxofre na matéria seca (0,9%) e também não observaram alterações nos resultados do leucograma, fibrinogênio e da proteína plasmática. Entretanto, Gunn et al. (1987) relataram surto de PEM ocasionado por flor de

Quadro 2. Valores médios e desvios-padrão ($\bar{x} \pm \sigma$) da temperatura retal (°C), frequência cardíaca (batimentos/min.) e respiratória (movimentos/min.) e motricidade ruminal (movimentos/cinco min.) aferidas nas três fases do protocolo de indução de polioencefalomalacia nos bezerros do grupo que ingeriu ração sem sulfato de sódio (G1) e com sulfato de sódio (G2)

	Temperatura retal		Frequência cardíaca		Frequência respiratória		Motricidade ruminal	
	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2
Fase 1								
1º dia	39±0,3	38,16±0,5	66,2±2,3	70,33±5,4	44±4,3	22±9,1	8,75±0,5	8,5±1,5
7º dia	38,72±0,2	39,41±0,6	65,5±1,9	65±6,1	37±10,5	37,6±6,3	7,5±0,5	8±0,6
14º dia	38,6±0,5	39,15±0,3	64,7±2,6	66,66±4,8	30,75±10,6	38,33±6,9	8,5±0,6	8,3±1,5
Fase 2								
7º dia	39	39,44±0,3	70±8,2	66,4±6,8	31,75±5	38,4±7,2	5,25±0,5	4,2±1,0
Fase 3								
7º dia	38,42±0,2	39,26±0,1	69,2±11,6	76,4±6,0	30,25±5,18	39,6±6,0	3±0,8	3,2±0,4
14º dia	37,85±0,2	39,28±0,2	66,5±4,4	74±10,7	30±2,16	47,6±18,1	1,5±0,5	1,8±0,8

Quadro 3. Valores médios e desvios-padrão ($\bar{x} \pm \sigma$) dos eritrogramas avaliados nas três fases do protocolo de indução de polioencefalomalacia nos bezerros do grupo que ingeriu ração sem sulfato de sódio (G1) e com sulfato de sódio (G2)

	Hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$)		Hemoglobina (g/dL)		Volume globular (%)		VGM(FI)		CHGM(%)	
	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2
Fase 1										
1º dia	6,78 $\pm$ 0,5	6,81 $\pm$ 1,1	9,72 $\pm$ 1,2	10,56 $\pm$ 1,1	29,25 $\pm$ 3,7	32,16 $\pm$ 3,3	43,07 $\pm$ 3,1	48,01 $\pm$ 7,0	33,24 $\pm$ 0,1	32,18 $\pm$ 1,4
14º dia	6,18 $\pm$ 0,6	6,08 $\pm$ 0,3	9,35 $\pm$ 1,5	9,32 $\pm$ 0,5	29,2 $\pm$ 5,67	29,66 $\pm$ 2,0	47,10 $\pm$ 5,5	48,93 $\pm$ 0,9	32,1 $\pm$ 1,5	31,60 $\pm$ 0,9
Fase 2										
7º dia	6,37 $\pm$ 0,6	6,49 $\pm$ 0,5	9,3 $\pm$ 1,0	9,76 $\pm$ 1,0	28 $\pm$ 3,5	29,8 $\pm$ 2,7	43,9 $\pm$ 2,9	45,89 $\pm$ 1,6	33,2 $\pm$ 1,4	32,71 $\pm$ 0,7
Fase 3										
14º dia	6,2 $\pm$ 0,7	6,37 $\pm$ 1,0	9,3 $\pm$ 1,3	9,32 $\pm$ 1,2	30 $\pm$ 4,0	28,2 $\pm$ 3,3	47,9 $\pm$ 3,2	44,52 $\pm$ 2,7	30,9 $\pm$ 0,8	33,14 $\pm$ 1,7

Quadro 4. Valores médios e desvios-padrão ($\bar{x} \pm \sigma$) dos leucogramas avaliados nas três fases do protocolo de indução de polioencefalomalacia nos bezerros do grupo que ingeriu ração sem sulfato de sódio (G1) e com sulfato de sódio (G2)

	Leucócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)		Segmentados ($\times 10^3/\text{mm}^3$)		Linfócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)		Eosinófilos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)		Monócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	
	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2
Fase 1										
1º dia	9,03 $\pm$ 1,0	8,0 $\pm$ 1,73	2,38 $\pm$ 0,3	2,05 $\pm$ 0,8	6,33 $\pm$ 0,9	5,5 $\pm$ 1,63	0,33 $\pm$ 0,1	0	0,13 $\pm$ 0,05	0,11 $\pm$ 0,09
14º dia	7,57 $\pm$ 0,8	8,14 $\pm$ 2,3	1,8 $\pm$ 1,1	2,27 $\pm$ 1,0	5,65 $\pm$ 0,8	5,39 $\pm$ 1,4	0,1 $\pm$ 0,04	0,15 $\pm$ 0,04	0,07 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,03
Fase 2										
7º dia	6,6 $\pm$ 1,3	7,74 $\pm$ 1,7	1,17 $\pm$ 0,3	1,69 $\pm$ 0,4	5,35 $\pm$ 1,2	5,75 $\pm$ 1,7	0,12	1,24	0,12	0,07 $\pm$ 0,01
Fase 3										
14º dia	6,67 $\pm$ 1,4	7,46 $\pm$ 2,1	1,47 $\pm$ 0,3	1,55 $\pm$ 0,5	5,14 $\pm$ 1,4	5,39 $\pm$ 1,26	0,06	0,11 $\pm$ 0,05	0	0,10 $\pm$ 0,02

Quadro 5. Valores médios e desvios-padrão ($\bar{x} \pm \sigma$) do fibrinogênio plasmático (g/dL) e proteína plasmática (mg/dL) avaliados nas três fases do protocolo de indução de polioencefalomalacia nos bezerros do grupo que ingeriu ração sem sulfato de sódio (G1) e com sulfato de sódio (G2)

	Fibrinogênio plasmático (mg/dL)		Proteína plasmática (g/dL)	
	G1	G2	G1	G2
Fase 1				
1º dia	150 $\pm$ 57,7	300 $\pm$ 109,5	8,1 $\pm$ 0,2	6,88 $\pm$ 0,2
14º dia	250 $\pm$ 100	266,66 $\pm$ 103,2	7,15 $\pm$ 0,34	6,33 $\pm$ 0,7
Fase 2				
7º dia	250 $\pm$ 100	440 $\pm$ 89,4	6,9 $\pm$ 0,11	7,0 $\pm$ 0,2
Fase 3				
14º dia	450 $\pm$ 100	360 $\pm$ 89,4	7,65 $\pm$ 0,3	6,84 $\pm$ 0,1

enxofre e observaram leucocitose por neutrofilia em alguns bezerros. McKenzie et al. (2009) realizaram exames hematológicos em bovinos com PEM devido a ingestão de *Raphanus raphanistrum* que continha elevado teor de enxofre (0,62%) e identificaram no eritrograma aumento da hemoglobina, do volume globular e do número de hemácias, possivelmente devido a desidratação e leucocitose com hiperfibrinogemia, indicando processo inflamatório.

Durante o período experimental somente um bezerro apresentou anormalidades encefálicas. No sexto dia da fase 2, o Bezerro 1 do grupo G2 apresentou apatia, ataxia, tremor de cabeça e nistagmo vertical com evolução aguda, levando cerca de 10 horas desde o início dos sinais até a morte. Observações de sinais neurológicos seme-

lhantes foram relatados por Gould (2000), Cebra & Cebra (2004), Burgess (2008) e Sant'Ana et al. (2009a,b).

Sager et al. (1990) observaram sinais neurológicos em apenas cinco de 14 bovinos alimentados com dieta semelhante ao da presente pesquisa, mas com teor de enxofre inferior (0,26%). Os sinais neurológicos nos animais foram identificados sete dias após o início do fornecimento da ração e caracterizados, inicialmente, por apatia, com evolução para ataxia, amaurose, pressão da cabeça contra objetos e andar compulsivo. Gould et al. (1991) forneceram dieta semelhante ao do presente trabalho e observaram sinais neurológicos similares aos descritos por Sager et al. (1990), mas em cinco de nove bovinos após três dias da introdução da ração com 0,36% de enxofre na matéria seca. Em outro estudo desenvolvido por Gould et al. (1997) com dieta semelhante a anterior, os autores identificaram amaurose e ataxia em três bovinos de um lote de quatro animais após dois dias do fornecimento da dieta contendo 0,41% de enxofre na matéria seca. Na presente pesquisa ao fornecer ração com 0,52% de enxofre acreditava-se que o número de animais doentes seria maior quando comparado com os resultados obtidos por Sager et al. (1990) e Gould et al. (1991, 1997), que suplementaram os bovinos com teores inferiores de enxofre e obtiveram maiores taxas de morbidade. Entretanto, os autores citados anteriormente não observaram quadro clínico com evolução aguda como identificado no bezerro 1. Provavelmente estas diferenças estejam associadas ao tipo de grupo genético empregado, pois, no protocolo experimental utilizado por Gould et al. (1997) foram utilizados animais *Bos*

Quadro 6. Valores médios e desvios-padrão ($\bar{x} \pm \sigma$) do sulfeto de hidrogênio ruminal (ppm) avaliados nas três fases do protocolo de indução de polioencefalomalacia nos bezerros do grupo que ingeriu ração sem sulfato de sódio (G1) e com sulfato de sódio (G2)

	G1	G2
Fase 1		
1º dia	24Aa	46±51Aa
7º dia	1.300 ± 621,82Ba	128,83 ± 149,99Aa
14º dia	1.725 ± 618,46Ba	1.255 ± 928,15Aa
Fase 2		
7º dia	47,25 ± 35,45Aa	803,33 ± 610,39Aa
Fase 3		
3º dia	73,5 ± 44,22Aa	3.900 ± 1.282,57Bb
7º dia	50,5 ± 53Aa	3.900 ± 2.284,73Bb
10º dia	205 ± 57,44Aa	3.960 ± 1.289,57Bb
14º dia	49,75 ± 20,82Aa	3.240 ± 1.533,94Bb

Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as fases do período experimental.

Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos G1e G2.

taurus, enquanto no presente estudo foram avaliados bovinos mestiços leiteiros. Pesquisas comparativas entre *Bos taurus* e *Bos indicus* sugerem que há diferenças entre os dois grupos quanto à ingestão alimentar e eficiência de utilização de rações com alta ou baixa densidade de energia (Putrino et al. 2007).

Os valores de gás sulfídrico ruminal (Quadro 6) da fase 1 referente à primeira dosagem dos dois grupos experimentais e da segunda aferição (7º dia) do grupo G2 estavam dentro da faixa de normalidade para a espécie (inferior a 500ppm) determinada por Burgess (2008). Ainda na fase 1, observou-se que na segunda aferição (7º dia) do H_2S ruminal do grupo G1 e na terceira (14º dia) dos dois grupos experimentais, os valores foram superiores aos considerados normais e corroboraram com os resultados de Cunha et al. (2008), que detectaram elevados teores de gás sulfídrico ruminal (5000ppm) em bovinos alimentados exclusivamente com feno que continha também elevados teores de enxofre na análise mineral foliar. Acredita-se que a ingestão de 0,37% de enxofre na matéria seca tenha proporcionado os elevados valores de gás sulfídrico ruminal nos animais suplementados exclusivamente com volumoso (fase 1), justificando a importância da determinação deste elemento na dieta (Gould 2000), especialmente no Brasil, onde diversos surtos de PEM foram relatados, mas a etiologia não foi esclarecida (Lemos 2005, Lima et al. 2005). Sant'Ana et al. (2009a) ao realizar estudo retrospectivo de 31 casos naturais de PEM em bovinos do Rio Grande do Sul e do Centro-Oeste brasileiro relataram a possibilidade de que alguns dos casos descritos estariam associados à intoxicação por enxofre, embora essa hipótese não tenha sido confirmada laboratorialmente.

Após o início do fornecimento da ração (fase 3), os bovinos que receberam sulfato de sódio (G2) apresentaram valores de H_2S ruminal acima do considerado normal (Burgess 2008), enquanto no grupo G1 os valores foram

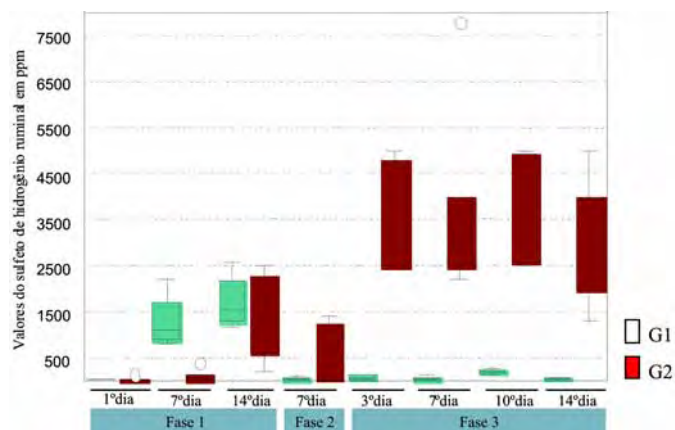


Fig.1. Box plot dos valores do sulfeto de hidrogênio ruminal (ppm) aferidos nas três fases do protocolo de indução de polioencefalomalacia nos bezerros mestiços dos grupos que ingeriram ração sem (G1) e com sulfato de sódio (G2).

inferiores a 280ppm (Fig.1). Com relação aos valores médios do gás sulfídrico foram verificadas diferenças significativas ($p < 0,05$) no G1 no 7º e 14º dias da fase 1 ao comparar com os demais momentos e, no G2, entre as fases 1 e 2 ao comparar com a fase 3. Além disso, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos G1 e G2 somente na fase 3 (Quadro 6). Em determinados momentos, os valores de H_2S ruminal do G2 foram 100 vezes superior aos do G1, indicando que o sulfeto de hidrogênio ruminal é um produto normal do metabolismo da microbiota ruminal, mas quando os bovinos consomem dietas com alto teor de enxofre, ocorre produção excessiva de H_2S no rúmen podendo ocasionar a PEM (Gould 2000). Altos valores de gás sulfídrico ruminal, em bovinos que ingeriram elevadas quantidades de enxofre, também foram descritos por Loneragan et al. (1998), Niles et al. (2002), Loneragan et al. (2005) e Cunha et al. (2008).

Gould et al. (1997) ao compararem a técnica da dosagem de gás sulfídrico ruminal utilizando tubos colorimétricos com a cromatografia líquida de alta eficiência, não observaram diferenças significativas entre os resultados obtidos, confirmando que a metodologia empregada no presente estudo reflete valores confiáveis da concentração de H_2S ruminal, sendo desnecessário o uso de outras técnicas para este propósito.

Variações nos valores do sulfeto de hidrogênio ruminal entre os animais do mesmo grupo e na mesma fase do protocolo experimental também foram relatadas por Niles et al. (2002), que induziram PEM em novilhas fornecendo dieta constituída por 70% de farelo de glúten de milho e 30% de casca de algodão associado com sulfato de sódio em três diferentes concentrações, todas acima do recomendado por Klasing et al. (2005). Isto indica que o metabolismo ruminal do enxofre é rápido e que as concentrações do gás sulfídrico ruminal são dinâmicas e se modificam rapidamente em resposta ao consumo de enxofre e a capacidade de absorção pela parede do rúmen (Loneragan et al. 1998).

Gould et al. (1997), Gould (2000) e Burgess (2008) enfatizaram que o odor de ovo em putrefação produzido pela eructação do gás sulfídrico ruminal foi associado ao aparecimento da PEM. Coghlin (1944) ao detectar odor pútrido de ovo em decomposição estabeleceu como causa do surto a ingestão excessiva de enxofre pelos bovinos. Apesar dos elevados teores de sulfeto de hidrogênio ruminal detectado em todos os animais do G2, especialmente na fase 3, em nenhum momento foi identificado esse tipo de odor nos animais do presente trabalho.

Várias investigações têm focado a associação entre a PEM e as altas concentrações do gás sulfídrico ruminal (Gould et al. 1991, Gould et al. 1997, McAllister et al. 1997, Niles et al. 2002, Cunha et al. 2008). A dosagem do sulfeto de hidrogênio ruminal do Bezerro 1, no momento em que o mesmo apresentava sinais neurológicos compatíveis com PEM, foi de 1250ppm, valor este 2,5 vezes acima do considerado normal por Burgess (2008). Apesar de Gould et al. (1997) e Loneragan et al. (1998) descreverem que em bezerros submetidos a dietas com excesso de enxofre, o aparecimento dos sinais clínicos coincide com o aumento dos valores do sulfeto de hidrogênio ruminal, no presente estudo notou-se isto em apenas um bezerro, enquanto que nos outros animais mesmo apresentando elevadas concentrações de sulfeto de hidrogênio ruminal não foi identificada alteração neurológica no exame clínico.

A determinação do gás sulfídrico ruminal tem sido importante nas investigações dos surtos de PEM porque elevadas concentrações do sulfeto de hidrogênio ruminal indicam participação do enxofre na etiopatogenia desta encefalopatia (Loneragan et al. 1998). A técnica de dosagem de sulfeto de hidrogênio ruminal pelos tubos colorimétricos utilizada neste estudo e por Gould et al. (1997), Niles et al. (2002) e Cunha et al. (2008, 2009a,b) demonstrou ser uma ferramenta útil para monitorar situações de risco e auxiliar no diagnóstico definitivo da PEM por enxofre, podendo ser perfeitamente utilizada à campo. A utilização desta técnica associada à análise de enxofre na dieta, pastos, água e suplementos (Gould 2000) estabeleceriam a participação do enxofre nos casos de PEM no Brasil (Lima et al. 2005), bem como auxiliaria no diagnóstico diferencial de outras causas de encefalopatias (Barros et al. 2006).

Os valores médios do pH do fluido ruminal dos animais dos dois grupos experimentais (Quadro 7), independente da fase, variaram de 6,2 a 7,1 e foram similares aos resultados descritos por Gould et al. (1997). A determinação do pH ruminal de bovinos confinados submetidos a protocolos de indução experimental deve ser realizada para descartar a possibilidade da ocorrência da PEM por alteração no metabolismo da tiamina devido ao consumo excessivo de ração, que pode diminuir o pH. Na presente pesquisa, mesmo oferecendo na fase 3 uma dieta exclusivamente com ração, o menor valor aferido do pH ruminal foi de 6,2 para um animal, excluindo a possibilidade da ocorrência de acidose, pois, de acordo com Owens (2007), o pH de fluido ruminal abaixo de 5,6 indica acidose crônica, enquanto inferior a 5,2 sugere acidose aguda.

Quadro 7. Valores médios e desvios-padrão ($\bar{x} \pm \sigma$) do pH ruminal avaliados nas três fases do protocolo de indução de polioencefalomalacia nos bezerros do grupo que ingeriu ração sem sulfato de sódio (G1) e com sulfato de sódio (G2)

	pH ruminal	
	G1	G2
Fase 1		
1º dia	7,06±0,12	6,90±0,23
7º dia	6,91±0,20	6,88±0,34
14º dia	6,59±0,22	6,73±0,16
Fase 2		
7º dia	6,56±0,24	6,78±0,16
Fase 3		
7º dia	6,8±0,32	6,66±0,21
14º dia	7,15±0,19	6,87±0,27

Quadro 8. Valores individuais da contagem das hemácias, do total e diferencial das células nucleadas, dos teores de glicose (mg/dL) líquorica e proteína (mg/dL) das amostras do líquido cefalorraquidiano colhidas no final da 3 fase do protocolo de indução de polioencefalomalacia nos bezerros do grupo que consumiu ração com sulfato de sódio (G2)

Parâmetros	Bovinos (G2)				
	4	6	7	8	9
Hemácias (células/ μ L)	<1	2	13	24	<1
Células nucleadas (células/ μ L)	1	6	<1	2	<1
Neutrófilos (%)	2	0	4	0	0
Células mononucleares (%)	5	6	4	8	1
Linfócitos (%)	2	40	92	48	0
Macrófagos (%)	3	54	0	44	0
Glicose (mg/dL)	51	32	33	33	41
Proteínas totais (mg/dL)	28,1	17,5	15,2	34,6	13,3

O Quadro 8 apresenta os resultados da análise do LCR dos Bezerros 4, 6, 7, 8 e 9 do grupo G2. O LCR do Bezerro 1 não foi colhido porque a evolução dos sinais neurológicos foi aguda. As contagens totais e diferenciais das células, assim como as concentrações da glicose e da proteína estão dentro dos valores de referência (Stöber 1993). O aumento na contagem total das células e na concentração da proteína são as alterações mais marcantes no LCR de animais com PEM (Cebra & Cebra 2004). Loneragan et al. (1998) ao analisarem o LCR de um animal que havia ingerido dieta rica em enxofre (0,9% matéria seca) e com sinais neurológicos, detectaram aumento da concentração das proteínas (149 mg/dL) e discreta pleocitose (12 leucócitos/ μ L), sendo que 90% eram células mononucleares, 6% linfócitos e 4% neutrófilos.

No Brasil, a raiva é a enfermidade neurológica mais frequentemente diagnosticada nos bovinos revelando a importância sócio-econômica e de saúde pública das enfermidades que acometem o SNC (Galiza et al. 2010). No diagnóstico diferencial das neuropatias dos bovinos, além da raiva, deve-se também incluir todas as causas de PEM (Barros et al. 2006). O exame de imunofluorescência direta para raiva foi negativo para o Bezerro 1, assim como não foi identificada a presença do DNA do BoHV-5 realizado por meio da técnica da PCR. Além disso, as concentra-

Quadro 9. Valores individuais da dosagem de chumbo realizada nos fragmentos de tecido hepático (µg/g) e renal (µg/g) colhidas do bezerro 10 do grupo que ingeriu ração sem sulfato de sódio (G1) e dos bezerros 1, 4 e 7 do que consumiram ração com sulfato de sódio (G2)

Tecido	G1	G2		
	10	1	4	7
Hepático (µg/g)	0,24	<0,05	0,068	0,27
Renal (µg/g)	0,13	<0,05	0,05	0,16

ções de chumbo nas amostras de tecido hepático e renal (Quadro 9) nos Bezerros 1, 4, 7 e 10 estavam abaixo dos níveis considerados tóxicos (Lemos & Riet-Correa 2007).

As alterações macroscópicas do encéfalo observadas no Bezerro 1 indicaram edema do córtex parietal e occipital esquerdo, caracterizado por tumefação com achatamento dos giros cerebrais, sendo que este tipo de lesão foi também descritos em casos naturais (Hamlen et al. 1993, Loneragan et al. 1998, Haydock 2003, Kul et al. 2006) e experimentais (Gould et al. 1991, 1997) de PEM por enxofre. No mesmo animal observou-se que a tumefação do córtex parietal e occipital ocasionou compressão da porção lateral esquerda do cerebelo (Fig.2), porém não foi suficiente para o animal desenvolver opistótono. Acredita-se que neste animal não ocorreu o deslocamento caudal (herniação) do bulbo e do cerebelo no sentido do forame magno, conforme citado por Loneragan et al. (1998) e Kul et al. (2006) porque a evolução clínica foi aguda.

No encéfalo dos animais 5 e 10 sacrificados do grupo G1 e dos Bezerros 4 e 7 do grupo G2 não foram observadas lesões macroscópicas, mas a ocorrência destas depende da severidade e duração do quadro clínico (Sant'Ana et al. 2009a). Áreas de hemorragia no encéfalo são observadas macroscopicamente, principalmente no telencéfalo e tálamo, em surtos de PEM ocasionados por excesso de enxofre detectado em diferentes fontes, como água (Hamlen et al. 1993, Haydock 2003), feno e água (Loneragan et al. 1998) e cevada de malte (Kul et al. 2006).

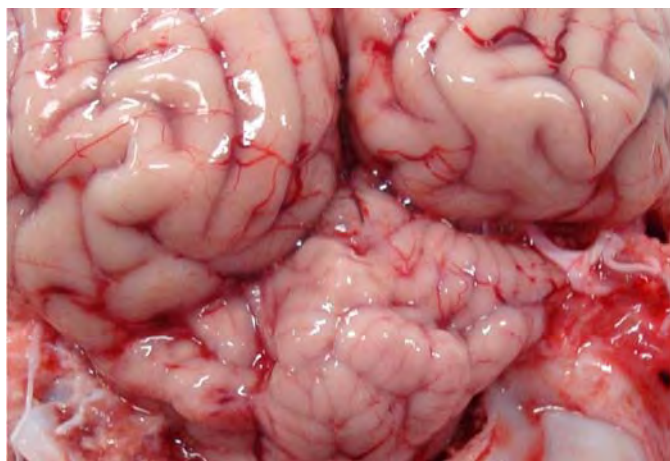


Fig.2. Tumefação com achatamento dos giros dos córtex parietal e occipital (especialmente do hemisfério esquerdo) comprimindo a porção lateral esquerda do cerebelo (Bezerro 1).

O exame macroscópico sob aplicação pela lâmpada de Wood foi realizado conforme recomendado por Edwin & Jackman (1981) no encéfalo dos Bezerros 1, 4 e 7 do grupo G2 e não foi evidenciada a autofluorescência. Jeffrey et al. (1994), Gould et al. (1997), McAllister et al. (1997), Loneragan et al. (1998) e Haydock (2003) evidenciaram autofluorescência nos cérebros dos animais que desenvolveram sinais neurológicos e no exame histopatológico identificaram malacia no córtex referente às áreas de autofluorescência. Acredita-se que a fluorescência seja devido a metabólitos lipídicos em macrófagos (Little 1978) ou material semelhante a colágeno de alto peso molecular (Edwin & Jackman 1981). Para Loneragan et al. (1998), o exame de autofluorescência indica fortes evidências para o diagnóstico preliminar de PEM.

Nos Bovinos 5 e 10 do grupo G1 não foram observadas alterações histopatológicas. Nos Bovinos 1, 4 e 7 do grupo G2, as lesões microscópicas predominaram no córtex frontal, parietal e occipital e incluíram necrose neuronal (neurônios vermelhos), edema de neurópilo e gliose, concordando com Gould (2000). Estas lesões foram acentuadas no bezerro que apresentou sinais neurológicos (Bezerro 1) (Fig.3) e com menor intensidade (discretas a moderadas) nos Bovinos 4 e 7 do mesmo grupo que não apresentaram sinais clínicos. Somente no Bezerro 1 foram observadas alterações discretas, incluindo necrose neuronal e edema, nos núcleos basais (Fig.4), tálamo (Fig.5) e mesencéfalo. Em nenhum animal foi observado infiltrado de macrófagos espumosos (células Gitter), manguitos perivasculares e lesões no cerebelo e no complexo gânglio de Gasser, rete mirabile e hipófise. Hemorragias discretas foram observadas no mesencéfalo do Bovino 4 e no bulbo (Fig.6) do Bovino 7. Necrose neuronal cortical associada a lesões no tálamo, ponte e bulbo como as descritas nesta pesquisa foram evidenciados nos casos naturais de PEM ocasionadas por enxofre (Hamlen et al. 1993, Jeffrey et al. 1994, Loneragan et al. 1998) e na indução experimental realizada por Cunha et al. (2008). Para Hamlen et al. (1993), Jeffrey et al. (1994) e Loneragan et al. (1998), lesões hemorrágicas em estru-

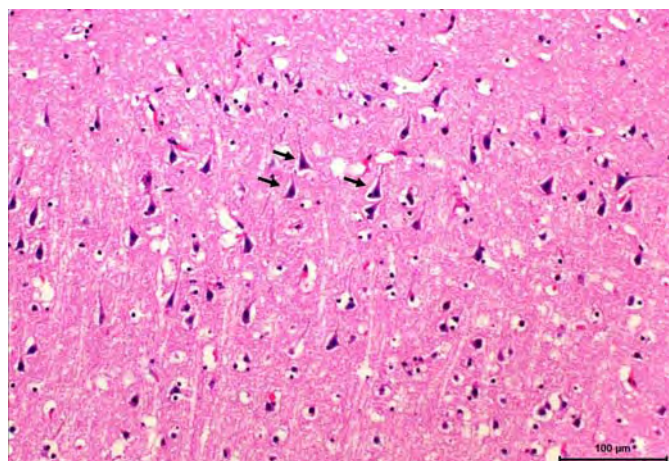


Fig.3. Neurônios vermelhos (setas) no córtex parietal esquerdo (Bezerro 1). HE, obj.20x.

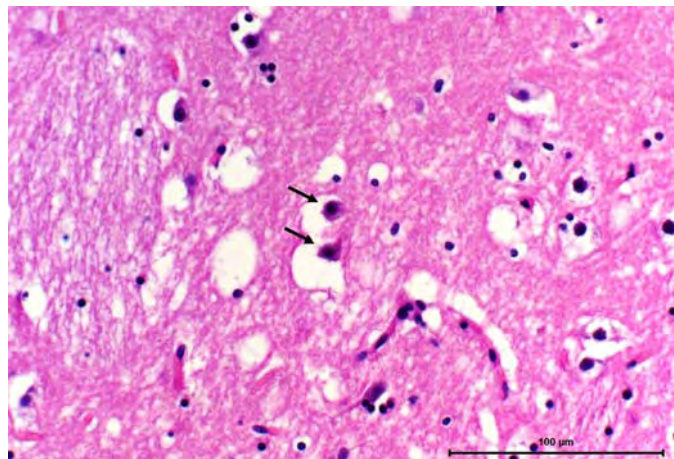


Fig.4. Edema (vacúolos) e necrose neuronal (setas) nos núcleos da base (Bezerro 1). HE, obj.40x.

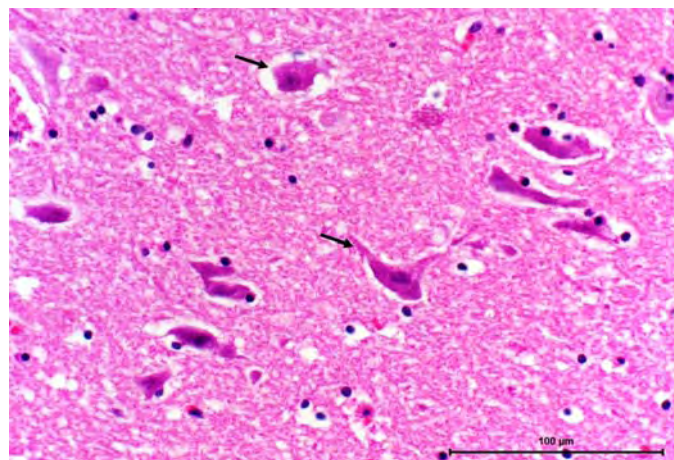


Fig.5. Neurônios vermelhos (setas) no tálamo (Bezerro 1). HE, obj.40x.

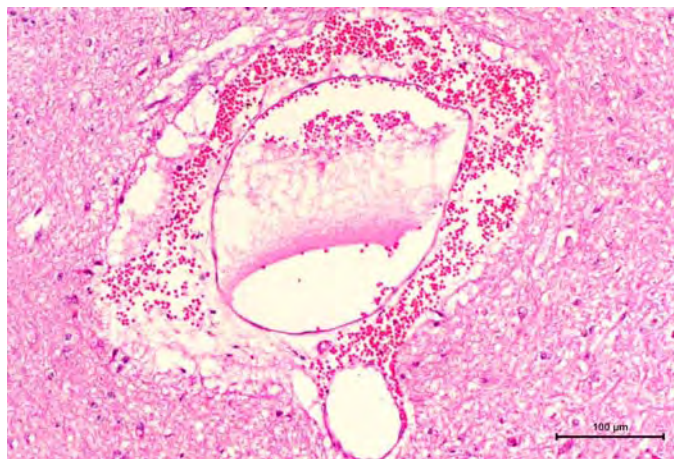


Fig.6. Área de hemorragia discreta perivascular no bulbo (Bezerro 7). HE, obj.20x.

ras mais ventrais do encéfalo como tálamo, ponte e bulbo associadas com necrose cortical podem auxiliar no diagnóstico diferencial da PEM por enxofre daquela ocasionada por deficiência de tiamina. Lesões corticais de PEM em

associação a alterações em estruturas ventrais do encéfalo também foram detectadas em casos naturais da doença em bovinos do Brasil (Sant'Ana et al. 2009a).

Necrose fibrinóide de pequenas arteríolas no tálamo e mesencéfalo (Hamlen et al. 1993) e hemorragias focais no tálamo e mesencéfalo secundárias a degeneração de veias e vênulas (Loneragan et al. 1998) foram descritas em dois surtos de PEM por enxofre. No presente trabalho, discreta hemorragia no mesencéfalo somente foi identificada em um bezerro do G2. Possivelmente, este tipo de anormalidade não foi constante, pois o consumo de enxofre na dieta (0,52%) foi inferior ao dos dois estudos. Os animais dos surtos diagnosticados por Hamlen et al. (1993) e Loneragan et al. (1998) ingeriram respectivamente, 0,70% e 0,90% de enxofre na matéria seca. Para Loneragan et al. (1998) a detecção de lesões profundas no encéfalo pode ser uma consequência da exposição a elevadas quantidades de sulfeto de hidrogênio, determinada pela quantidade de enxofre ingerido.

A identificação de alterações histológicas sugestivas de PEM em animais que não apresentam alterações neurológicas, mas com elevados valores de sulfeto de hidrogênio ruminal, como observada nos Bovinos 4 e 7 do grupo G2, também foram relatadas por Niles et al. (2002).

O protocolo utilizado no presente estudo baseado no fornecimento de uma dieta rica em enxofre foi eficaz na indução de PEM em bovinos. Além disso, para estabelecer o diagnóstico definitivo da PEM por enxofre ficou evidenciado a importância de se utilizar na rotina métodos complementares, tais como, dosagem de gás sulfídrico ruminal, detecção do DNA do BoHV-5 pela PCR, imunofluorescência direta para raiva, determinação da concentração do chumbo nos fragmentos de tecido hepático e renal e do enxofre na dieta associados ao exame histopatológico.

A necessidade de aumentar a produtividade da bovinocultura no país tem exigido a utilização de novas estratégias nutricionais, como a utilização de dietas ricas em energia e pobre em fibra associada com o uso de subprodutos da agroindústria. Consequentemente criam-se condições de risco para a ocorrência da PEM por enxofre, estimulando o desenvolvimento de pesquisas com o estabelecimento de modelos experimentais que permitam melhor compreensão da etiopatogenia da PEM no Brasil.

CONCLUSÃO

O protocolo experimental constituído por uma dieta rica em carboidrato de alta fermentação, baixa quantidade de fibra efetiva e altos níveis de enxofre (0,52%) ocasionou alterações clínicas e histológicas e elevadas concentrações de sulfeto de hidrogênio ruminal compatíveis com quadro de intoxicação por enxofre.

Agradecimentos.- Às acadêmicas Ana Claudia Gorino e Mariana Fontanetti Marinheiro do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (Unesp) Campus de Botucatu, pelo auxílio na execução do experimento.

REFERÊNCIAS

- Arthington J.D., Recheigl J.E., Yost G.P., McDowell L.R. & Fanning M.D. 2002. Effects of ammonium sulfate fertilization on bahiagrass quality and copper metabolism in grazing beef cattle. *J. Anim. Sci.* 80:2507-2512.
- Ahmad M.R., Allen V.G., Fontenot J.P. & Hawkins G.W. 1995. Effect of sulfur fertilization on chemical composition, ensiling characteristics, and utilization by lambs of sorghum silage. *J. Anim. Sci.* 73:1803-1810.
- Barros C.S.L., Driemeier D., Dutra I.S. & Lemos R.A.A. 2006. Doenças do Sistema Nervoso de Bovinos no Brasil. Agnes, São Paulo, p.166-171.
- Burgess B.A. 2008. Polioencephalomalacia. *Large Anim. Vet.* 8:1-6.
- Cebra C.K. & Cebra M.L. 2004. Altered mentation caused by polioencephalomalacia, hypernatremia, and lead poisoning. *Vet. Clin. North Am., Food Anim. Pract.* 20:287-302.
- Christian R.G. & Tryphonas L. 1971. Lead poisoning in cattle: Brain lesions and hematologic changes. *Am. J. Vet. Res.* 32:203-216.
- Claus P.C., Alfieri A.F. & Alfieri A.A. 2002. Herpesvírus Bovino Tipo 5 e Meningoencefalite Herpética Bovina. *Semina* 23:131-141.
- Claus M.P., Alfieri A.F., Folgueras-Flatschart A.V., Wosiacki S.R., Médici K.C. & Alfieri A.A. 2005. Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR. *J. Virol. Meth.* 128:183-188.
- Coghlin C.L. 1944. Hydrogen sulphide poisoning in cattle. *Can. J. Comp. Med.* 8:111-113.
- Coles E.H. 1984. *Patologia Clínica Veterinária*. 3ª ed. Manole, São Paulo, p.360-400.
- Colodel E.M., Nakazato L., Weiblen R., Mello R.M., Silva R.R.P., Souza M.A., Filho J.A.O. & Caron L. 2002. Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por herpesvírus bovino no estado de Mato Grosso, Brasil. *Ciência Rural* 32:293-298.
- Cunha P.H.J., Badial P.R., Oliveira Filho J.P., Amorim R.L., Cagnini D.Q. & Borges A.S. 2008. Intoxicação experimental por enxofre em bovinos Nelore. *Anais 21º Encontro Nacional de Diagnóstico Veterinário, Campo Grande, MS*, p.20-21.
- Cunha P.H.J., Badial P.R., Oliveira Filho J.P., Cagnini Q.D., Marinheiro M.F., Gorino A.C. & Borges A.S. 2009a. Avaliação da concentração do sulfeto de hidrogênio ruminal utilizando tubos colorimétricos em bovinos criados extensivamente. *Anais do 8º Congresso Brasileiro de Buiatria, Belo Horizonte, MG. Ciênc. Anim. Bras. (Supl.1):83-87.*
- Cunha P.H.J., Delfiol D.J.Z., Cagnini Q.D., Badial P.R., Oliveira Filho J.P., Olivo G., Amorim R.M. & Borges A.S. 2009b. Identificação molecular do herpesvírus bovino tipo 5 em um bovino confinado associado com diagnóstico diferencial laboratorial de outras causas de polioencefalomalacia. *Anais 8º Congresso Brasileiro de Buiatria, Belo Horizonte, MG. Ciênc. Anim. Bras. (Supl.1):93-98.*
- David N., Hübner S.O., Riet-Correa F., Danisa H. & Lemos R.A. 2007. Reactivation of latent bovine herpesvirus type 5 in cattle with polioencephalomalacia induced by ammonium sulphate. *Pesq. Vet. Bras.* 27:435-441.
- Dewhurst R.J., Kim E.J., Evans R.T., Cabrita A.R.J. & Fonseca A.J.M. 2007. Effects of dietary sulphur sources on concentrations of hydrogen sulphide in the rumen head-space gas of dairy cows. *Animal* 1:531-535.
- Dirksen G., Gründer H.D. & Stöber M. 1993. *Exame Clínico dos Bovinos*. 3ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.373-381.
- Edwin E.E. & Jackman R. 1973. Ruminal thiaminase and tissue thiamine in cerebrocortical necrosis. *Vet. Rec.* 92:640-641.
- Edwin E.E. & Jackman R. 1981. Nature of the autofluorescent material in cerebrocortical necrosis. *J. Neurochem.* 37:1054-1056.
- Elias F., Schild A.L. & Riet-Correa F. 2004. Meningoencefalite e polioencefalomalacia por herpesvírus bovino-5: distribuição das lesões no sistema nervoso central de bovinos naturalmente infectados. *Pesq. Vet. Bras.* 24:123-131.
- Galiza G.J.N., Silva M.L.C.R., Dantas A.F.M., Simões S.V.D., Riet-Correa F. 2010. Doenças do sistema nervoso de bovinos no semi-árido nordestino. *Pesq. Vet. Bras.* 30:267-276.
- Gonçalves R.C., Viana L., Sequeira J.L., Bandarra E.P., Chiacchio S.B. & Kuchembuck M.R.G. 2001. Aspectos clínicos, anatomopatológicos e epidemiológicos da polioencefalomalácia em bovinos, na região de Botucatu, SP. *Vet. Notícias* 7:54-57.
- Gooneratne S.R., Olkowski A.A., Klemmer R.G., Kessler G.A. & Christensen D.A. 1989. High sulfur related thiamine deficiency in cattle: A field study. *Can. Vet. J.* 30:139-146.
- Gould D.H. 1998. Polioencephalomalacia. *J. Anim. Sci.* 76:309-314.
- Gould D.H. 2000. Update on sulphur-related polioencephalomalacia. *Vet. Clin. North Am., Food Anim. Pract.* 16:481-496.
- Gould D.H., McAllister M.M., Savage J.C. & Hamar D.W. 1991. High sulfide concentrations in rumen fluid associated with nutritionally induced polioencephalomalacia in calves. *Am. J. Vet. Res.* 52:1164-1169.
- Gould D.H., Cummings B.A. & Hamar D.W. 1997. In vivo indicators of pathologic ruminal sulfide production in steers with diet-induced polioencephalomalacia. *J. Vet. Diag. Invest.* 9:72-76.
- Gunn M.F., Baird J.D. & Wilkie J.S.N. 1987. Accidental sulfur poisoning in a group of Holstein heifers. *Can. Vet. J.* 28:188-192.
- Hamlen H., Clark E. & Janzen E. 1993. Polioencephalomalacia in cattle consuming water with elevated sodium sulfate levels: A herd investigation. *Can. Vet. J.* 34:153-158.
- Haydock D. 2003. Sulfur-induced polioencephalomalacia in a herd of rotation cattle. *Can. Vet. J.* 44:828-829.
- Jeffrey M., Duff J.P., Higgins R.J., Simpson V.R., Jackman R., Jones T.O., Mechie S.C. & Liversey C.T. 1994. Polioencephalomalacia associated with the ingestion of ammonium sulphate by sheep and cattle. *Vet. Rec.* 134:343-348.
- Jensen R., Griner L.A. & Adams O.R. 1956. Polioencephalomalacia of cattle and sheep. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 129:311-321.
- Klasing K.C., Goff J.P., Greger J.L. & King J.C. 2005. *Mineral Tolerance of Animals*. 2nd ed. National Academics Press, Washington DC, p.372-385.
- Kul O., Karahan S., Basalan M. & Kabakci N. 2006. Polioencephalomalacia in cattle: A consequence of prolonged feeding barley malt sprouts. *J. Vet. Med. Assoc.* 53:123-128.
- Kung L., Bracht J.Y. & Tavares J.Y. 1998. Effects of various compounds on in vitro ruminal fermentation and production of sulfide. *Anim. Feed Sci. Technol.* 84:69-81.
- Lemos R.A.A. 2005. *Enfermidades do sistema nervoso de bovinos de corte das regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP. 150p.
- Lemos R.A.A. & Riet-Correa F. 2007. Polioencefalomalacia, p.658-670. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds), *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. Vol.2. 3ª ed. Pallotti, Santa Maria.
- Lemos R.A.A., Nakazato L., Barros C.S.L., Gattas C.B.A. & Bonilla R. 1997. Meningoencefalite eosinofílica em bovinos no estado do Mato Grosso do Sul. *Arqs Inst. Biológico, São Paulo*, 64(Supl.1):43.
- Lemos R.A.A., Driemeier D., Guimarães E.B., Dutra I.S., Mori A.E. & Barros C.S.L. 2004. Lead poisoning in cattle grazing pasture contaminated by industrial waste. *Vet. Hum. Toxicol.* 46:326-328.
- Lima E.F., Riet-Correa F., Tabosa I.M., Dantas A.F.M., Medeiros J.M. & Sucupira Júnior G. 2005. Polioencefalomalacia em caprinos e ovinos na região semi-árida do Nordeste do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 25:9-14.
- Little P.B. 1978. Identity of fluorescence in polioencephalomalacia. *Vet. Rec.* 103:76.
- Loneragan G.H., Gould D.H., Callan R.J., Sigurdson C.J. & Hamar D.W. 1998. Association of excess sulfur intake and an increase in hydrogen sulfide concentrations in the ruminal gas cap of recently weaned beef calves with polioencephalomalacia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 213:1599-1604.

- Loneragan G.H., Wagner J.J., Gould D.H., Garry F.B. & Thoren M.A. 2001. Effects of water sulfate concentrations on performance, water intake, and carcass characteristics of feedlot steers. *J. Anim. Sci.* 79:2941-2948.
- Loneragan G.H., Gould D.H., Wagner J., Garry F. & Thoren M. 2005. The magnitude and patterns of ruminal hydrogen sulfide production, blood thiamine concentration, and mean pulmonary arterial pressure in feedlot steers consuming water of different sulfate concentrations. *Bovine Pract.* 39:16-22.
- Lunardi M., Claus M.P., Lisboa J.A.N., Amude A.M., Headley S.A., Alfieri A.F. & Alfieri A.A. 2009. Neurological and epidemiological aspects of a BoHV-5 meningoencephalitis outbreak. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 52:77-85.
- McKenzie R.A., Carmichael A.M., Schibrowski M.L., Duigan S.A., Gibson J.A. & Taylor J.D. 2009. Sulfur-associated polioencephalomalacia in cattle grazing plants in the family Brassicaceae. *Aust. Vet. J.* 87:27-32.
- Mayhew I.G. 1989. *Large Animal Neurology: A handbook for veterinary clinics.* Lea and Febiger, London, p.49-55.
- McAllister M.M., Gould D.H. & Raisbeck M.F. 1997. Evaluation of ruminal sulfide concentrations and seasonal outbreaks of polioencephalomalacia in beef cattle in a feedlot. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 211:1275-1279.
- Mella C.M., Perez-Oliva O. & Loew F.M. 1976. Induction of bovine polioencephalomalacia with feeding system based on molasses and urea. *Can. J. Comp. Med.* 40:104-110.
- Mendes L.C.N., Borges A.S., Peiró J.R., Feitosa F.L.F. & Anhesini C.R. 2007. Estudo retrospectivo de 19 casos de polioencefalomalácia, em bovinos, responsivos ao tratamento com tiamina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 59:239-241.
- Moro L., Nogueira R.H.G., Carvalho A.U. & Marques D.C. 1994. Relato de três casos de polioencefalomalacia em bovinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 46:409-416.
- Nakazato L., Lemos R.A.A. & Riet-Correa F. 2000. Polioencefalomalacia em bovinos nos estados de Mato Grosso do Sul e São Paulo. *Pesq. Vet. Bras.* 20:119-125.
- Niles G.A., Morgan S.E. & Edwards W.C. 2000. Sulfur-induced polioencephalomalacia in stocker calves. *Vet. Human Toxicol.* 42:290-291.
- Niles G.A., Morgan S., Edwards W.C. & Lalman D. 2002. Effects of dietary sulfur concentrations on the incidence and pathology of polioencephalomalacia in weaned beef calves. *Vet. Human Toxicol.* 44:70-72.
- Osweiler G.D., Carr T.F., Sanderson T.P., Carson T.L. & Kinker J.A. 1995. Water deprivation-sodium ion toxicosis in cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7:583-585.
- Owens F. 2007. Acidose clínica e subclínica. *Anais 3º Simpósio de Nutrição de Ruminantes, Botucatu, SP, p.157-173. (Palestra)*
- Perez S.E., Vagnozzi A., Sur J.H., Odriozola E., Campero C.M. & Odeon A.C. 2003. Retrospective analysis of cases with a diagnosis of cerebrocortical necrosis and its relation with type 5 bovine herpesvirus. *Revta Argent. Microbiol.* 35:69-73.
- Pritchard D. & Eggleston G.W. 1978. Nardoo fern and polioencephalomalacia. *Aust. Vet. J.* 54:204-205.
- Putrino S.M., Leme P.R., Luz e Silva S., Manella M.Q., Nogueira Filho J.C.M. Lima C.G. & Alleoni G.F. 2007. Digestibilidade aparente de dietas com níveis crescentes de concentrado em novilhos Brangus e Nelore. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 59:406-413.
- Radostits O.M., Gay C.C., Blood D.C. & Hinchcliff K.W. 2007. *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats.* 10th ed. W.B. Saunders, Philadelphia, p.724-725.
- Raisbeck M.F. 1982. Is polioencephalomalacia associated with high-sulfate diets? *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 180:1303-1305.
- Riet-Correa G., Duarte M.D., Barbosa J.D., Oliveira C.M.C., Cerqueira V.D., Brito M.F. & Riet-Correa F. 2006. Meningoencefalite e polioencefalomalacia causada por Herpesvírus bovino-5 no Estado do Pará. *Pesq. Vet. Bras.* 26:44-46.
- Rissi D.R., Oliveira F.N., Rech R.R., Pierezan F., Lemos R.A.A. & Barros C.S.L. 2006. Epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões encefálicas em bovinos afetados por meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. *Pesq. Vet. Bras.* 26:123-132.
- Rissi D.R., Rech R.R., Flores E.F., Kommers G.D. & Barros C.S. 2007. Meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. *Pesq. Vet. Bras.* 27:251-260.
- Rissi D.R., Pierezan F., Sá e Silva M., Flores E.F. & Barros C.S.L. 2008. Neurological disease in cattle in southern Brazil associated with Bovine herpesvirus infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20:346-349.
- Sager R.L., Hamar D.W. & Gould D.H. 1990. Clinical and biochemical alterations in calves with nutritionally induced polioencephalomalacia. *Am. J. Vet. Res.* 51:1969-1974.
- Salvador S.W.C., Lemos R.A.A., Riet-Correa F., Roehe P.M. & Osório A.L.A.R. 1998. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. *Pesq. Vet. Bras.* 18:76-83.
- Sampaio I.B.M. 1998. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal.* UFMG, Belo Horizonte. 221p.
- Sanches A.W.D., Langohr I.M., Stigger A.L. & Barros C.S.L. 2000. Doenças do sistema nervoso central em bovinos no Sul do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 20:113-118.
- Sant'Ana F.J.F., Rissi D.R., Lucena R.B., Lemos R.A.A., Nogueira A.P.A. & Barros C.S.L. 2009a. Polioencefalomalacia em bovinos: epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões no encéfalo. *Pesq. Vet. Bras.* 29:487-497.
- Sant'Ana F.J.F., Lemos R.A.A., Nogueira A.P.A., Togni M., Tessele B. & Barros C.S.L. 2009b. Polioencefalomalacia em ruminantes. *Pesq. Vet. Bras.* 29:681-694.
- Sant'Ana F.J.F., Nogueira A.P.A., Souza R.I.C., Cardinal S.G., Lemos R.A.A. & Barros C.S.L. 2009c. Polioencefalomalacia experimental induzida por amprólio em ovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 29:747-752.
- Santos M.N., Jardim Filho J.O. & Grando F.A. 1983. Polioencefalomalacia em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 3:37-39.
- Sousa R.S. & Irigoyen L.F. 1999. Intoxicação experimental por *Phalaris angusta* (Gramineae) em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 19:116-122.
- Stöber M. 1993. Sistema nervoso central, p.341-362. In: Dirksen G., Gründer H.D. & Stöber M. (Eds), *Exame Clínico dos Bovinos.* Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Traverso S.D., Colodel E.M., Loretto A.P., Seitz A.L., Correa A.M., Krauspenhar C. & Driemeier D. 2001. Polioencefalomalacia em bovinos leiteiros no Rio Grande do Sul suplementados com enxofre. 10º Enapave, Pirassununga, p.72. (Resumo)
- Traverso S.D., Loretto A.P., Donini M.A. & Driemeier D. 2004. Lead poisoning in cattle in southern Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 56:418-421.
- Trueman K.F. & Clague D.C. 1978. Sodium chloride poisoning in cattle. *Aust. Vet. J.* 54:89-91.
- Valadares Filho S.C., Pina D.S. & Chizzotti M.L. 2006. Degradação ruminal da proteína dos alimentos e síntese de proteína microbiana, p.13-44. In: Valadares Filho S.C., Paulino P.V.R. & Magalhães K.A. (Eds), *Exigências Nutricionais de Zebuínos e Tabelas de Composição de Alimentos BR-Corte.* Suprema Gráfica, Viçosa, MG. 142p.