

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA DE ARAÇATUBA

**DISTRIBUIÇÃO GENÔMICA E ANTIGÊNICA DO BHV5 EM
ENCÉFALOS BOVINOS COM MENINGOENCEFALITE NÃO
SUPURATIVA: CASOS CLÍNICOS**

Tássia de Paula Giroto
Bióloga

ARAÇATUBA – SP
2015

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

**DISTRIBUIÇÃO GENÔMICA E ANTIGÊNICA DO BHV5 EM
ENCÉFALOS BOVINOS COM MENINGOENCEFALITE NÃO
SUPURATIVA: CASOS CLÍNICOS**

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

Tássia de Paula Giroto
Orientadora: Prof^a. Adj. Tereza Cristina Cardoso Silva

Araçatuba – SP
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da FMVA / UNESP

G527d Giroto, Tássia de Paula
Distribuição genômica e antigênica do BHV5 em encéfalos
bovinos com meningoencefalite não supurativa: casos clínicos /
Tássia de Paula Giroto. -- Araçatuba, 2015.
XX f. : il. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba.
Orientadora: Profa. Tereza Cristina Cardoso Silva

1. Herpesvírus bovino 5. 2. Encéfalo. 3. Citocinas. I. T.

CDD 636.02774



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba
Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Distribuição genômica e antigênica do BHV5 em encéfalos bovinos com
meningoencefalite não supurativa: casos clínicos

AUTORA: TÁSSIA DE PAULA GIROTO

ORIENTADORA: Dra. TEREZA CRISTINA CARDOSO DA SILVA

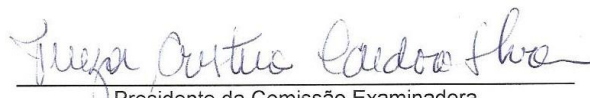
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRA em CIÊNCIA ANIMAL
(MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E PRODUÇÃO ANIMAL) pela Comissão Examinadora.


Dra. ANDRÉA FONTES GARCIA


Dra. CRISTINA MARIA RODRIGUES MONTEIRO


Dra. TEREZA CRISTINA CARDOSO DA SILVA

DATA DA REALIZAÇÃO: 14 de dezembro de 2015.


Presidente da Comissão Examinadora
Dra. TEREZA CRISTINA CARDOSO DA SILVA
- Orientadora -

DADOS CURRICULARES

Tassia de Paula Giroto - Nascida em 21 de março de 1990, na cidade de Birigui – SP. Graduada em Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - (UFMS) – Três Lagoas – MS. Ingressou no programa de Mestrado em Ciência Animal em março de 2014. Atualmente é professora concursada para a escola estadual Profa. Lydia Helena Frandsen Sthur do ensino Fundamental, Ciclo II e médio, localizada na cidade de Birigui, São Paulo.

“A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria”.

Paulo Freire

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida, pela saúde, por colocar em meus caminhos verdadeiros aliados do dia-dia.

Aos meus pais Antônio e Geni por me apoiarem e auxiliarem na tomada de decisões. Cada conquista da minha vida se deve ao empenho de ambos em minha formação profissional e social.

Ao meu namorado Fernando, por me apoiar e respeitar minhas decisões e escolhas com muito amor.

Aos meus amigos e familiares que torceram pelo meu sucesso.

As minhas colegas do laboratório de virologia animal – UNESP, Araçatuba, por me ajudarem nessa trajetória.

Aos funcionários Gilmara Castilho, Cilene Vidovix, Alexandre José Teixeira. Ao Prof. Roberto Gameiro e Pedro Florindo pelo aprendizado, amizade e apoio.

Ao professor Eduardo.F. Flores por gentilmente ter cedido o anticorpo.

A minha orientadora Tereza Cristina Cardoso por me aceitar como orientada de mestrado sem me conhecer como aluna e profissional, pela confiança investida e por auxiliar em decisões profissionais.

À Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP – campus de Araçatuba.

Ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP – campus de Araçatuba.

SUMÁRIO

CAPITULO 1

1.	Considerações gerais	12
1.1.	Pecuária brasileira	12
1.2.	Família <i>Herpesviridae</i>	13
1.3.	Replicação dos <i>Herpesvirus</i>	14
1.4.	Herpesvirus bovino 5	16
1.5.	Sinais clínicos e alterações patológicas	18
1.6.	Reposta inflamatória	19
2.	Objetivos	21
3.	Considerações finais	22
4.	Referências	23

CAPITULO 2

	Artigo científico	28
--	--------------------------	-----------

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1. Representação esquemática da estrutura da partícula viral do *alfaherpesvirus*. Estrutura viral: (1) Envelope de glicoproteínas, (2) Tegumento externo; (3) Tegumento interno; (4) Capsídeo; (5) Capsômeros; (6) Núcleo contendo o material genético do vírus, com o poro nuclear aparente. (Scheffer,2013).

FIGURA 2. Fotomicrografia ilustrando os infiltrados inflamatórios classificados como suave, moderado e severo. (ANAPAT, 2015).

DISTRIBUIÇÃO GENÔMICA E ANTIGÊNICA DO BHV5 EM ENCÉFALOS BOVINOS COM MENINGOENCEFALITE NÃO SUPURATIVA: CASOS CLÍNICOS.

RESUMO – A meningoencefalite por herpesvírus bovino 5 (BHV5) foi descrita em várias regiões do mundo. A doença ocorre na forma de surtos ou de casos isolados. No Brasil, encefalites causadas pelo BHV5 têm sido confirmadas de forma crescente nos rebanhos, sendo considerada a segunda maior causa de encefalite com etiologia determinada em bovinos. Nesse sentido, o presente estudo objetivou caracterizar as regiões do sistema nervoso central (SNC) com maior frequência do BHV5, o envolvimento de diferentes populações de linfócitos e a expressão de citocinas relacionadas ao processo inflamatório. As amostras (n=8) foram submetidas às análises histopatológica, imuno-histoquímica e molecular. A principal lesão observada foi caracterizada como infiltrado perivascular, classificado em leve, moderado e severo. Em todos os casos o infiltrado perivascular foi notado de forma severa no bulbo olfatório, lobos frontal, temporal e parietal. A expressão de citocinas foi principalmente detectada nas regiões do bulbo olfatório e lobo piriforme. Este estudo abordou que a incidência do BHV5 ocorreu principalmente na região frontal, visto que a contaminação pelo vírus ocorre de forma nasal, tendo como primeiro contato a região frontal do cérebro com o BHV5.

Palavras-chave: Herpesvírus bovino 5, encéfalo, citocinas

GENOMIC AND ANTIGENIC DISTRIBUTION OF BHV5 AMONG BOVINE BRAINS WITH NON-SUPPURATIVE MENINGOENCEPHALITIS: CLINICAL CASES

SUMMARY – Meningoencephalitis caused by bovine Herpesvirus 5 (BHV5) has been described worldwide. The disease occurred as outbreaks of isolates clinical cases. In Brazil, encephalitis caused by BHV5 has been confirmed by the increase of positive animals, being the second major cause of bovine viral encephalitis. Likewise, the aim of this study was to characterize brain regions from central nervous system (CNS) presenting high frequency of BHV5 antigen and genome, phenotype lymphocytes subpopulations among perivascular cuffs and compare these results with cytokines transcription. The samples (n=8) were submitted to histopathological analysis, immunohistochemistry and molecular evaluation. The main histopathological lesions were characterized as perivascular cuffs, classified as severe, and sometimes moderate. All cases, perivascular infiltrates were severe in olfactory bulb, and frontal, temporal and parietal lobes. The cytokines expression was considered up regulated in olfactory bulb and piriform lobe. This study addressed the BHV5 distribution mainly observed in frontal regions from CNS, what confirmed the respiratory route as important for virus infection.

Keywords: bovine herpesvirus 5, brain, cytokines

CAPÍTULO 1

1. Considerações gerais

1.1 Pecuária brasileira

O Brasil segundo a Confederação da Agricultura e Pecuária (CNA), se destaca como um dos principais produtores do agronegócio brasileiro em todos os estados na produção de carne bovina. De acordo com a CNA, as exportações do Brasil neste setor cresceram 737% em 14 anos, passando de US\$ 779 milhões (R\$ 2,7 bilhões a preços de hoje), no ano de 2000, para US\$ 6,4 bilhões (R\$ 22,2 bilhões), em 2014 (RIBEIRO, 2015). A bovinocultura se apresenta como uma das principais atividades agropecuárias do Estado de São Paulo, superada somente pela cana-de-açúcar. O rebanho bovino brasileiro na região central, (São Paulo, Minas Gerais e Goiás) é constituído predominantemente, de animais das raças zebuínas, enquanto os localizados nos estados do Sul (Rio Grande do Sul e Santa Catarina) possuem um rebanho predominante de raças europeias (CARNE..., 2015). As projeções do Ministério da Agricultura para 2019/2020, mostram que a produção nacional de carnes deverá suprir até 2020 cerca de 44,5% do mercado mundial. A relação entre as exportações brasileiras e o comércio mundial mostra que, em 2019/2020 as vendas de carne bovina representarão 30,3% do mercado, em comparação com 25% atuais. (BRASIL, 2010).

Pelos cálculos, o país continuará liderando o mercado nos próximos 10 anos, entretanto o crescimento pode ser menor, uma vez que as exportações brasileiras são compostas predominantemente por carne industrializada. O produto "in natura" dificilmente será vendido para os mercados mais exigentes, com barreiras sanitárias rígidas, principalmente, no que se refere às doenças virais (VALOR...,2007).

1.2 Família *HERPESVIRIDAE*

Já foram caracterizados mais de 80 *Herpesvírus*, provenientes de diferentes animais. As partículas virais do *Herpesvírus* apresentam baixa resistência ao meio ambiente e, não possuem resistência fora do organismo infectado. Em geral, a sua transmissão requer contato direto para que ocorra a infecção viral (DAVISON, 2010; SCHUWYZER; ACKERMANN, 1996) divisão das famílias em subfamílias do herpesvírus, é baseada nas propriedades biológicas, enquanto a classificação em gênero é respectivamente na disposição genômica e sorológica (DAVISON, 2010).

A divisão das famílias em subfamílias é baseada nas propriedades biológicas entre os vírus que a compõem, dividindo-se em três: *alphaherpesvirinae*, *betaherpesvirinae* e *gammaherpesvirinae*. A primeira subfamília *alphaherpesvirinae* é constituída pelos *Alphaherpesvirus*, caracterizados por sua ampla gama de hospedeiros, pelo seu desenvolvimento de lise celular e sua capacidade de desenvolver infecções latentes nos gânglios nervosos (DAVISON, 2010). A segunda subfamília *betaherpesvirinae*, possui hospedeiros limitados e a replicação tem ciclo longo, apresentando permanecer em latência nas glândulas secretoras, tecido linfóide, rins e outros tecidos. A terceira subfamília *gammaherpesvirinae*, no qual os hospedeiros são escassos, todos os respectivos membros replicam-se em células linfóides e algumas produzem infecções citocidas em células epiteliais e fibroblásticas. Os vírus desta subfamília são específicos de linfócitos T e B que são transformados em células tumorais (FENNER et al. 1992; FERRARI et al., 2007). Com frequência podem produzir infecção latente no tecido. (DAVISON, 2010).

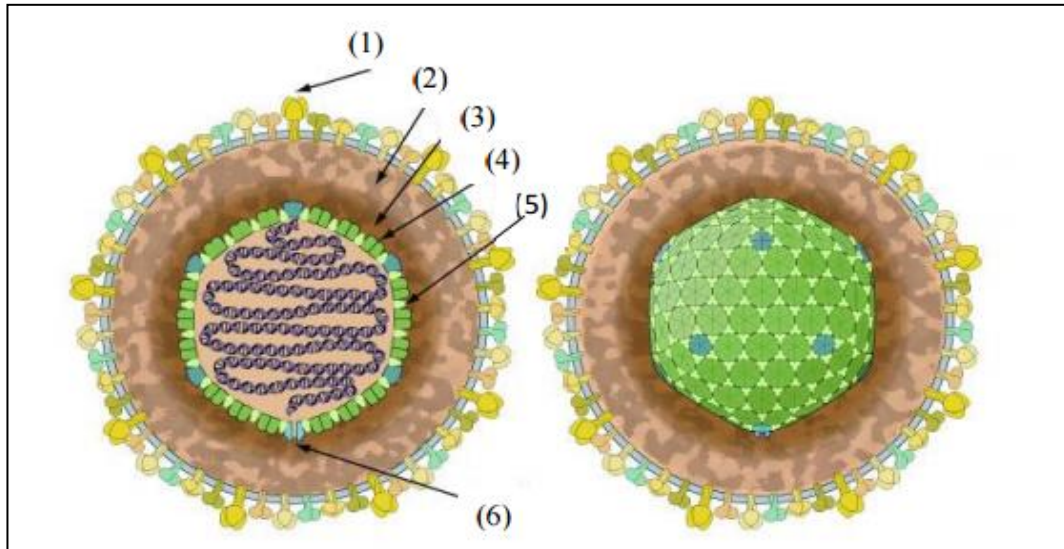


Figura 1- Representação esquemática da estrutura da partícula viral do *alfaherpesvirus*. Estrutura viral: (1) Envelope de glicoproteínas, (2) Tegumento externo; (3) Tegumento interno; (4) Capsídeo; (5) Capsômeros; (6) Núcleo contendo o material genético do vírus, com o poro nuclear aparente. (SCHEFFER, 2013).

A partícula viral do herpesvírus é constituída por quatro estruturas: núcleo, capsídeo, tegumento e envelope (Figura 1). O diâmetro varia de 120 a 300 nm, sem forma definida. O núcleo abriga uma molécula de DNA de fita dupla linear, protegido por um capsídeo icosaédrico de aproximadamente 100 a 110 nm de diâmetro, formado por 162 capsômeros (DAVISON, 2010; DEL MÉDICO-ZAJAC et al., 2010; FRANCO et al., 2012).

1.3 Replicação dos **HERPESVÍRUS**

Os alfa herpesvírus possuem um ciclo de replicação relativamente curto. Dois ciclos replicativos com características distintas são reconhecidos na biologia dos alfa herpesvírus: a infecção aguda ou produtiva e a infecção latente (ABDELMAGID et al., 1995; BRATANICH et al., 1991). A infecção produtiva ocorre nos locais de

penetração do vírus no hospedeiro e provavelmente, também em neurônios antes do estabelecimento e durante a reativação da infecção latente. Esta etapa do ciclo replicativo caracteriza-se pela expressão de todos os genes virais, replicação do genoma e produção de progênie viral infecciosa (CARON et al., 2002; CHOWDHURY et al., 2000; FRANCO et al., 2012). O início da infecção depende da interação do vírion com receptores de superfície da célula (processo chamado adsorção) e da entrada do nucleocapsídeo no citoplasma (penetração) (CARON et al., 2002).

O BoHV1 e BoHV5 apresentam 4 fases para realizar a sua penetração completa nas células do hospedeiro, denominadas de: adsorção, fusão, penetração e liberação. Cada fase, por sua vez, apresenta características próprias, como descritas a seguir: 1-adsorção: ocorre pelo contato da membrana externa do vírus com a membrana plasmática da célula; 2-fusão: se dá pela penetração e pela intensa ligação entre o envelope viral e a camada interna da membrana plasmática da célula do hospedeiro; 3-penetração: ocorre pelo processo de endocitose da membrana plasmática próximo ao local de fusão, e as partículas virais se encontram no interior da célula; 4-liberação: após a formação do DNA viral ocorre a entrada do material genético viral no nucleocapsídeo pré-formado e sua liberação para o meio extracelular. Todo este processo de adsorção à penetração viral está completo após 60 segundos de ter iniciado o contato com a célula alvo, observado em ensaios experimentais (DAVISON, 2010).

No interior do citoplasma celular o vírus passa para o núcleo e a enzima polimerase II viral dependente de DNA celular, transcreve 3 classes de RNA: α (alfa), β (beta) e γ (gama), segundo uma seqüência coordenada e regulada por

enzimas celulares. Assim, o RNA α processa o respectivo RNAm, que transcreve proteínas tipo α , que iniciam a expressão do RNAm β , e quando se tem a produção de β proteínas, suprime a transcrição de RNAm α . Nesse momento, começa a replicação do DNA viral, que se utiliza das proteínas α e β , assim como, proteínas das células hospedeiras. A transcrição se inicia novamente, quando ocorre a formação do RNAm γ , transcrito a partir de seqüências distribuídas por todo o genoma, produzindo proteínas γ . Durante todo o ciclo são codificadas mais de 70 proteínas virais e grande parte são do tipo α e β , consideradas enzimas e a maioria das γ consideradas estruturais (CARON et al., 2002). O DNA recém-sintetizado é introduzido no capsídeo pré-formado. A síntese de DNA, RNA e proteínas da célula hospedeira reduz à medida que começa a biossíntese viral e cessa 3-5 horas após a iniciada a infecção (DAVISON, 2010).

1.4 HERPESVÍRUS bovino 5

Os herpesvírus bovinos 1 e 5 são muito equivalentes entre si em aspectos estruturais, biológicos, antigênicos e moleculares (DEL MÉDICO-ZAJAC et al., 2010). Os genomas do BHV1 e BHV5 apresentam uma homologia de aproximadamente 85%, de acordo com testes de cruzamento de hibridização do genoma completo (ABDELMAGID et al., 1995), tanto que anteriormente o BHV5 foi classificado como subtipo 1.3 do BHV1 sendo reclassificado com base em algumas características biológicas e moleculares que o distingue dos isolados respiratórios e genitais do BHV1 (DAVISON, 2010).

Neste sentido, a subfamília *alphaherpesvirinae* é constituída pelos *Alphaherpesvirus* caracterizados por sua capacidade de desenvolver infecções

latentes nos gânglios nervosos. (FRANCO et al., 2012). Ambos BHV1 e BHV5 são vírus neurotrópicos que se estabelecem no gânglio trigêmio (BELTRÃO et al., 2000; FULLER; LEE, 1992; STEINER; KENNEDY, 1995). A principal diferença entre esses vírus parece estar relacionada à sua habilidade de invadir, replicar no sistema nervoso central (SNC) e causar enfermidade neurológica (MELTZLER et al., 1986). Amostras de alphaherpesvírus identificadas como BHV1 têm sido quase que exclusivamente isoladas de casos de doença respiratória ou genital, enquanto os herpesvírus isolados de casos de doença nervosa têm sido identificados como BHV5 no Brasil (CAMPOS et al. 2009; COLODEL et al., 2002; D'ARCE et al., 2002; ELIAS et al., 2004; GOMES et al., 2002).

O BHV5 possui a capacidade de invasão do sistema neurológico, tanto em infecção natural quanto na experimental em bovinos (PEREZ et al., 2002; VOGEL et al. 2003), ovinos (SILVA et al., 1998, 1999), lagomorfos (CARON et al., 2002) e em caprinos jovens (DEL MÉDICO-ZAJAC et al., 2010). Os pequenos ruminantes são importantes hospedeiros da enfermidade, uma vez que o vírus desenvolve latência nessas espécies e pode atuar como transmissores da enfermidade para bovinos imunossuprimidos em condições naturais nos momentos de imunossupressão, sendo comum o pastoreio de bovinos e caprinos em um mesmo ambiente no Brasil (SILVA et al., 1998).

A meningoencefalite por BHV5 foi descrita no Rio Grande do Sul (ELIAS et al., 2004; RIET-CORREA et al., 1989), Mato Grosso do Sul e São Paulo (SALVADOR et al., 1998), Paraná, Mato Grosso (COLODEL et al., 2002), Rio de Janeiro e Minas Gerais (GOMES et al., 2002), Pará (RIET-CORREA et al., 2006). Os surtos têm sido observados em bezerros de até 3 meses (ELIAS et al., 2004; RIET-

CORREA et al., 1989) e bovinos adultos de até 6 anos (ELIAS et al., 2004; SALVADOR et al., 1998).

1.5 Sinais clínicos e alterações patológicas

Os sintomas têm sido relatados como: ataxia, hipermetria, andar em círculos, movimentos de pedalagem, paralisia, decúbito esternal, convulsões depressão, isolamento do rebanho, tremores, nistagmo, bruxismo, ptialismo e morte (PEREZ et al., 2002). Na meningoencefalite por BHV5 as alterações macroscópicas nem sempre são visualizadas, entretanto quando presentes, são caracterizadas por hiperemia e congestão dos vasos da leptomeninge, tumefação das porções anteriores do telencéfalo com áreas achatadas no tálamo, cápsula interna, ventrículo lateral e córtex occipital de coloração amarelada ou acastanhada, medindo 0,5 a 3cm de diâmetro (RIET-CORREA et al., 2006; RISSI et al., 2006; SALVADOR et al., 1998).

Na meningoencefalite não supurativa, a análise histopatológica dos fragmentos do encéfalo, demonstra como principal alteração uma reação inflamatória intensa, com presença de infiltrados perivasculares. A meningite difusa e severa, composta por infiltrado inflamatório é uma alteração microscópica muito freqüente (ELIAS et al., 2004; RIET-CORREA et al., 2006; SALVADOR et al., 1998). Os cortes histológicos também demonstram alterações circulatórias formadas por congestão, edema e hemorragia, distribuídos tanto na substância branca quanto na cinzenta, também na meninge que apresenta hiperplasia do endotélio vascular,

vasculite, e tumefação das células endoteliais (ELIAS et al., 2004; RIET-CORREA et al., 2006; RISSI et al., 2006).

A realização de imunomarcacão contrastada com hematoxilina Harris's em cortes de tecidos, apresentam alterações histopatológicas de degeneração neuronal, parênquima infiltrante e infiltrado inflamatório perivascular, evidenciando reação positiva para o BHV5.

1.6 Resposta inflamatória

Após replicação na mucosa nasal, a invasão BHV5 no cérebro ocorre principalmente através da via olfatória e neurônios sensoriais do gânglio trigêmeo (PEREZ et al., 2002). No entanto, outros caminhos para a propagação do BHV5 devem ser considerados, tais como a entrada mediada por leucócitos através das barreiras cerebrais ou a via complexo coróide e meninges e a expressão da metaloproteinase 9 (MMP9) que constitui um elemento chave para a migração de leucócitos que degrada o colágeno do tipo IV, o primeiro componente da membrana basal. (MACHADO et al., 2013).

Alterações histológicas concentram-se principalmente sobre os aspectos de degeneração neuronal e infiltrados inflamatório. Entretanto, esses padrões são controversias devido à dificuldade de isolamento do BHV5 em casos respectivos e estágios diferentes da doença: agudo, latente e reativação da infecção do vírus. (PEREZ et al., 2002). Infiltrado perivascular e no parênquima, são resultados de recrutamento de células inflamatórias no local de infecção, sendo mudanças associadas com a infecção do herpesvírus (GRIFFIN et al., 2010).

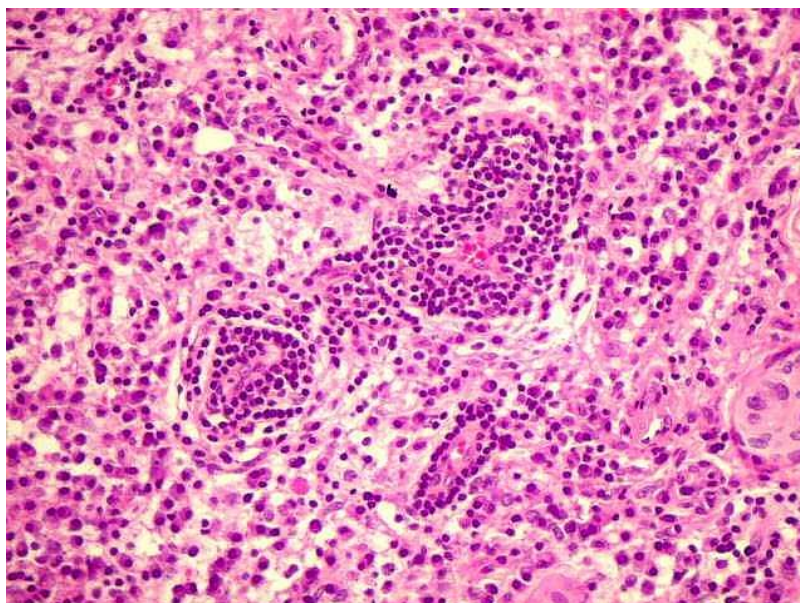


Figura 2 - Fotomicrografia ilustrando os infiltrados inflamatórios classificados como suave, moderado e severo

Os níveis de citocinas são os marcadores de uma resposta inflamatória no cérebro. Após a exposição viral a ativação de células T induz a expressão de um maior número de citocinas que facilitam tanto a resposta de anticorpos e mediação por células. (CROUSE et al., 2015). As citocinas contribuem para a disfunção ou morte da célula (GRIFFIN et al., 2010). A maior fonte dessas citocinas podem ser micróglias presentes no SNC ou linfócitos infiltrantes que chegam aos locais da infecção através de tráfego celular mediado por quinasas levando a quebra da barreira hematoencefálica (GRIFFIN et al., 2010). Os infiltrados perivascularares constituídos por linfócitos CD3+ foram detectados principalmente no bulbo olfatório, hipocampo, lóbulos piriforme, frontal, parietal e temporal. Semelhante a modelos em coelhos, em que o exame microscópico revelou mudanças histológicas no córtex cerebral (lobo frontal, temporal, parietal e piriforme), caracterizados como infiltrados perivascularares mononucleares, entretanto alguns coelhos infectados não apresentaram sintomas (MACHADO et al., 2013).

2 OBJETIVOS

- a) Examinar a distribuição e intensidade do BHV5 nas diferentes regiões do cérebro.
- b) Reconhecer a participação das principais populações de linfócitos T e B na resposta inflamatória no cérebro.
- c) Fazer análise histopatológica do SNC, determinando as alterações microscópicas presentes nas amostras de encéfalo com meningoencefalite não supurativa.
- d) Relacionar a presença da expressão do gene de citocinas pró-inflamatórias e pré-inflamatórias no sistema nervoso central.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- a) O presente estudo forneceu informações importantes para neuropatogênese BHV5 na fase aguda.
- b) Os dados apresentados sugerem conhecimento adicional para a propagação e subsequente resposta inflamatória do BHV5.
- c) No entanto, mais estudos são necessários para demonstrar o perfil de citocina envolvidas na infecção do vírus que leva a um desfecho fatal.

REFERÊNCIAS

ABDELMAGID, O. Y.; MINOCHA, H.C.; COLLINS, J.K.; CHOWDHURY, S.I. Fine mapping of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) glycoprotein D (gD) neutralizing epitopes by type-specific monoclonal antibodies and sequence comparison with BoHV-5 gD. **Virology**, v. 206, n. 1, p. 242-253, 1995.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. Faculdade de Ciências Médicas. Departamento de Anatomia Patológica. **Meningioma rico em infiltrado linfoplasmocitário.** Disponível em: <<http://anatpat.unicamp.br/nptmeningioma13.html>>. Acesso em: 22 nov. 2015.

BELTRÃO, N.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; SILVA, A. M. ROEHE, P. M.; IRIGOYEN, L. F. Acute infection and neurological disease by bovine herpesvirus type 5 (BHV-5): rabbits as experimental model. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 4, p. 144-150, 2000.

BRATANICH, A. C.; SARDI, S. I.; SMITSAART, E. N.; SCHUDEL, A. A. Comparative studies of BHV-1 variants by in vivo - in vitro tests. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 38, n. 1, p. 41-48, 1991.

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 coinfections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 139, n. 1/2, p. 67-73, 2009.

CARNE bovina: estudo do mercado mundial. Disponível em: <<http://agrocarnes.com.br>>. Acesso em: 20 out. 2015.

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. **Veterinary Microbiology**, v. 84, n. 4, p. 285-295, 2002.

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 rabbit. **Journal of Virology**, v.74, n.5, p. 2094-2106, 2000.

COLODEL M. E., NAKAZATO L., WEIBLEN R., MELLO R. M., SILVA R. P., SOUZA M. A., OLIVEIRA J. A., CARON L. Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por herpesvírus bovino no estado do Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**, v. 2, n. 2, p. 293-298, 2002.

CROUSE, J.; KALINKE, U.; OXENIUS, A. Regulation of antiviral T cell responses by type 1 interferons. **Nature Review Immunology**, v. 15, n. 4, p. 231-242, 2015.

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. **Veterinary Microbiology**, v. 88, n. 4, p.315-324, 2002.

DAVISON, A. J. Herpesvirus systematics. **Veterinary Microbiology**, v. 143, n. 1, p. 52-69, 2010.

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

RIBEIRO, S. **Produção de carne bovina deve crescer quase 20% esse ano, estima CNA.** 2015. Disponível em: <<http://agenciabrasil.ebc.com.br/economia/noticia/2015-08/producao-de-carne-bovina-deve-crescer-quase-20-neste-ano-estima-cna>>. Acesso em: 15 out. 2015.

ELIAS, F.; SCHILD, A. L.; RIET-CORREA, F. Meningoencefalite e encefalomalácia por Herpes vírus bovino-5 (BHV-5): distribuição das lesões no sistema nervoso central de bovinos naturalmente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 3, p. 123-131, 2004.

FENNER, F.; BACHMANN, P.A.; GIBBS, E.P.J.; MURPHY, F. A.; STUDDERT, M. J.; WHITE, D. O. **Virologia Veterinaria**. Zaragoza: Ed. Acribia., 1992. 349-354p.

FERRARI, H. F.; LUVIZOTTO, M. C. R.; 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, n. 1/2, p. 335-340, 2007.

FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M.; VARELA, A. P. M. Herpesviridae, In: FLORES, E. F. (Org.) **Virologia veterinária: virologia geral e doenças víricas**. 2. ed. Santa Maria: Ed. UFSM, 2012. Cap. 18, p. 503-570.

FULLER, A. O.; LEE, W. C. Herpes simplex virus type 1 entry through a cascade of virus-cell interactions requires different roles of gD and gH in penetration. **Journal of Virology**, v. 66, n. 8, p. 5002-2012, 1992.

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. **Arquivos Brasileiros Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 2, p. 217-220, 2002.

GRIFFIN, B. D.; VERWEIJ, M. C.; WIERTZ, E. J. H. J. Herpesvirus and immunity: art of invasion. **Veterinary Microbiology**, v. 143, n. 1, p. 89-100, 2010.

MACHADO, G. F.; BERNANRDI, F.; HOSOMI, F. Y. M.; PEIRÓ, J. R.; WEIBLEN, R.; ROEHE, P. M.; ALESSI, A. C.; MELO, G. D.; RAMOS, A. T.; MAIORKA, P. C. Bovine herpesvirus-5 infection in a rabbit experimental model: immunohistochemical study of cellular response in the CNS. **Microbial Pathogenesis**, v. 57, p. 10-16, 2013.

METZLER, A. E.; SCHUDEL, A. A.; ENGELS, M. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. **Archives of Virology**, v. 87, n. 3/4, p. 205-217, 1986.

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

RIET-CORREA, F.; VIDOR, T.; SCHILD, A. L.; MENDEZ, M. C. Meningoencefalite e necrose do córtex cerebral em bovinos causado por herpesvírus bovino-1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 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 poliencefalomalacia causadas por Herpesvírus bovino-5 no Estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 1, 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. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 123-132, 2006.

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

SALVADOR, S. C.; LEMOS, R. A. A.; RIET-CORREA, F.; ROEHE, P. M.; OSÓRIO, A. L. R. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvírus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n. 2, p. 76-83, 1998.

SCHERRER, C.M. Herpesvírus e pestivírus em rebanhos bubalinos do Rio Grande do Sul. 2013. Mestrado em ciências veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. 2013

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

SILVA, A. M.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; BOTTON, S. A.; IRIGOYEN, L. F.; ROEHE, P. M.; BRUM, M. C. S.; CANTO, M. C. Infecção aguda e latente em ovinos inoculados com herpesvírus bovino 5 (BHV-5). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n. 3/4, p. 99-106, 1998.

SILVA, A. M.; WEIBLEN, R.; IRIGOYEN, L. F.; ROEHE, P. M.; SUR, H. J.; OSORIO, F. A.; FLORES, E. F. Experimental infection of sheep with bovine herpesvírus type-5 (BHV-5): acute and latent infection. **Veterinary Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 89-99, 1999.

STEINER, I.; KENNEDY, P. G. Herpes simplex virus latent infection in the nervous system. **Journal of Neurovirology**, v. 1, n. 1, p. 19-29, 1995.

VALOR da produção agropecuária deve crescer 8,6% em 2007. 2007. Disponível em: <<http://www.ambienteemfoco.com.br>>. Acesso em: 10 out. 2015.

VOGEL, F. S. F.; CARON, L.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; WINKELMANN, E. R., MAYER, S. V.; BASTOS, R. G. Distribution of bovine herpesvírus type 5 DNA in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 10, p. 4512-4520, 2003.

CAPITULO 2

Archives of Virology

Brief report

Cellular response and cytokines gene expression to natural bovine herpesvirus 5 (BHV5) infection: broader distribution in central nervous system

Tassia P. Giroto¹, Heitor F. Ferrari ², Bruna R.S.M. Oliveira¹, Carolina UF Fabri¹, Lucas H. Okamura¹, Eduardo F. Flores³, Tereza C. Cardoso^{1*}

¹Univ – Universidade Estadual Paulista, Laboratory of Animal Virology and Cell Culture, College of Veterinary Medicine, Araçatuba, São Paulo, Brazil, 16050-680,

²Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium, Faculdade Medicina Veterinária, Araçatuba, São Paulo, Brazil, 16016500.

³Federal University of Santa Maria, Virology Section, Santa Maria, RS, Brazil, 97115-900.

Corresponding author:

Tereza. C. Cardoso

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal

Curso de Medicina Veterinária

Rua Clóvis Pestana, 793.

16.050-680 Araçatuba, SP, Brasil.

Fax: +55-18-622 6487

e-mail: tcardoso@fmva.unesp.br

Abstract

Since little information regarding to inflammatory immune cells phenotype, cytokine and virus gene expression regarding to BHV5 natural infection, this study aimed to describe these features in twelve brain regions. Tissue sections were analysed for nature and extend of perivascular cuffs in Virchow-Robin space and parenchyma per brain area. The lesions produced were more severe in olfactory bulb, hippocampus, piriform, frontal, temporal and parietal lobes mainly characterized as inflammatory infiltrates localized in Virchow-Robin spaces. These histopathological lesions positively correlated with BHV5 antigens distribution ($r=0.947$; $p<0.005$). The same brain areas whereas perivascular cuffs were graded as severe, inflammatory cells were composed by CD3+ phenotype in Virchow-Robin space. Pro-inflammatory cytokine gene expression, *INFG*, *IL2*, *TNF* and *LTBR*, was mostly detected in olfactory bulb and piriform lobe ($P<0.005$). However, *IL4*, considered to transcribed an anti-inflammatory chemokine, was also expressed in olfactory bulb, piriform and frontal cortex and last in hippocampus ($p<0.005$). This study addressed interesting information about natural immune response to BHV5 fatal infection and suggested an increase immune activation followed by inflammatory cytokine expression, positively correlated to viral presence in cranial portion of brain region.

Key words: Viral meningoencephalitis, inflammatory response, cattle

Running title: Immune response among brain regions of BHV5 infected cows.

Bovine *Herpesvirus* 5 (BHV5) is member of the family *Herpesviridae*, sub-family *alphaherpesvirinae*, [5] and is primary etiological agent of non-suppurative meningoencephalitis, described as a cause of significant economic losses to beef cattle in Latin America [6,7,18]. The most important biological properties is a lifelong latent infection in sensory nerve ganglia after acute infection, whereas the infection is manifested by occasional reactivation of infection providing an adequate means of transmission and spread, generally only detected by outbreaks [13,14,17,19,20].

Following replication in the nasal mucosa, BHV5 invasion into brain occur mainly through the olfactory pathway and sensory neurons of trigeminal ganglion [17]. However, other pathways for BHV5 spread must be considered, such as leucocyte-mediated entry across cerebral barriers or via choroid plexus and meninges [15]. Likewise, it has been demonstrated the metalloproteinase 9 (MMP9 gelatinase B) expression in brains from naturally infected cows and experimental infected rabbits [8,11,16]. This is an important issue since MMP9 is considered a key component for leucocyte migration by degrade type IV collagen. Neuropathological patterns were obtained from central nervous system (CNS) by experimental infection of calves and rabbits, which can represent some atypical histological changes from naturally infected animals [1,10,11,15,16,19]. These histological changes are primarily focused on aspects of neuronal degeneration and inflammatory infiltrates. Besides, these patterns are controversial due to the difficulty to isolate the BHV5 from respective cases and the different stages of the disease: acute, latency and re-activation of virus infection [17]. Moreover, under experimental situation not all BHV5 infected animals develop neurological disorders. Perivascular cuffing and parenchymal infiltration within the brain, which are result of inflammatory cell recruitment to sites of infection, are changes that be associated with herpesvirus

infection [10,12]. However, due to variability in response, the influence of lymphocyte recruitment on the resolution of BHV natural infections remain unclear.

Cytokine levels are surrogate markers of inflammatory cascade in the brain. After viral exposure, apart from early innate immune response, activation of T cells leads to the expression of a larger number of cytokines that facilitate both cell-mediated and antibody responses [4]. Likewise, cytokines contribute to cell death or cell dysfunction [12]. A major source of these cytokines could be the microglial cells present in the CNS or infiltrating lymphocytes which reach to the site of infection through chemokine-mediated cell trafficking as well as due to the breakdown of blood-brain barrier [12]. Little information is available regarding cellular response and cytokine gene mapping among BoHV5 natural infections. The purpose of this study was to examine BHV5 distribution, involvement of the main populations of lymphocytes (T and B), perivascular infiltrates and pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines gene expression in CNS.

For the present study, 8 cattle brains diagnosed as positive for natural infection with BHV5 and 10 health brains, used as control specimens, were obtained from routine at Laboratory of Animal Virology at University of São Paulo State. The whole brain was sampled and sagittal sectioned into two halves. The brain portions consisting by 12 regions of CNS: Ob (olfactory bulbs and rostral olfactory peduncles), PI (Piriform lobe), H (hippocampus), Fc (frontal cortex), Tc (temporal cortex), Pc (parietal cortex), Oc (occipital cortex), T (thalamus), M (mesencephalon), P (pons), Mob (medulla oblongata), Sc (cervical spinal cord) were chosen to be analyzed for histopathology, immunohistochemistry and molecular analysis. The sections were immersed in 10% phosphate-buffered formalin were sectioned into 10-15-mm thick tissue sections, blocked and immersed in 98% formic acid during 24 h and

embedded in paraffin wax. Non-fixed sections were stored under -86°C for molecular analysis.

The number of cuffs was counted for each of 12 brain regions and the average number and standard error were calculated. In addition, perivascular cuffs were classified as mild (increase in cell nuclei or incomplete ring of cell nuclei within the Virchow-Robin space), moderate (complete ring of cells in the Virchow-Robin space) or severe (two or more complete cell layers in the Virchow-Robin space). Viral antigen was detected with anti-BHV5 monoclonal antibody (BHV5 2F9) kindly provided by Prof. Eduardo Furtado Flores. The monoclonal anti-human CD3 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and anti-mouse CD45R/B220 (Sigma-Aldrich) were used and cross-react with bovine species. Briefly, sections were dewaxed in xylene and dehydrated in absolute alcohol before being immersed for 15 min in hydrogen peroxide/methanol block to quench endogenous peroxidase activity. Because epitope retrieval was required before lymphocyte immunostaining, sections were immersed in a 0.05% trypsin (Sigma-Aldrich) for 10 min. The slides were washed in phosphate buffered solution and incubated with biotinylated secondary antibody and streptavidin-HRP complex (LSAB+ Kit K0690 Dako) according to manufacturer's instructions [1,2,10]. The reaction was developed with 3,3'-diaminobenzidine (K3468, Dako). The slides were counterstained with Harris's hematoxylin, dehydrated, cleared and mounted with coverslips. Negative control sections were prepared replacing the primary antibodies with 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich). The numbers of B and T cells per perivascular cuff and infiltrating surrounding parenchyma were assessed with Axiolmager® A.1 light microscope connected to an AxioCam®MRc (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). The images were processed using AxioVision® v.4.8 software (Carl Zeiss) for viral antigen,

lymphocyte T and B detection. Fifteen cuffs (five mild, five moderate and five severe) were analyzed for each brain region in each animal.

Viral DNA was extracted from each brain region using DNAzol™ according to manufacturer's instructions (Invitrogen®). An average of 100 ng of genomic DNA was used for qPCR as described previously. The primers and respective probes used were: BoHV5 forward 5'-GGTACTTCTTCTTGGTGATG-3'; BoHV5 reverse 5'-TCGGTCTTCGTCAAGTTC-3'; BoHV5 probe FAM-AGGTCTTCTCGCACTC-MGB as described previously [3,9]. The reaction was carried out and analyzed by the software on a StepOnePlus™ real time instrument v. 7.3 (Applied Biosystems®). The data were obtained from three replicates of each sample. The expression of the housekeeping Histone 2a gene (*H2A*) was also quantified in a similar way for normalization. The viral DNA level at corresponding time p.i. in infected and uninfected cells was quantified in comparison to the housekeeping gene. The comparative delta-delta *Ct* method was used to analyze the results.

In order to quantify pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines gene expression total RNA was isolated from 12 brain regions. The total RNA was treated with DNase and reverse transcribed into cDNA using a reverse transcriptase (Superscript III, Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA). Analyzed genes, corresponding to bovine immune related genes detailed on Table 1. The single tube TaqMan® assays primers and probes were used. The results are expressed as a relative gene expression, which indicates how many times (fold change) the gene expression of a cytokine is higher (upregulated) or lower (down regulated) among brain areas. Culture of bovine monocytes were used to validate the reaction. The average expression was calculated, and Log₂ transformed for each gene. The quantitative PCR mixtures (50 µl) contained 1.2 µg of cDNA, 400 nM primers and 200

nM probes FAM-mGB (5`region) customized for *Bos taurus* bovine sequences. The PCR was initiated by sequential amplification of 40 cycles at 95°C (15s) and 60°C (60s). Quantification of gene expression was performed by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method using bovine histone 2a gene (*H2A*; Bt03252057_g1) as a reference gene described previously [3].

Total perivascular counts per animal were compared between brain region with the non-parametric Exact Wilcoxon Sum Rank Test and rates $\pm$ proportion Fisher Exact Test. In addition, the distribution of perivascular cuffing within the brain was studied by assessing the total number of cuffs in brain regions results with Exact Wilcoxon Sum Rank Test comparing the cranial and caudal regions. For T and B-lymphocytes, significant differences between groups were determined by one-way ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison Test. A value of $p < 0.005$ was considered statistically significant. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). All statistical analyses were performed using Prism software (GraphPad v. 6.1, La Jolla, CA, USA)

In these cases of BHV5 natural infection, a non-suppurative meningoencephalitis characterized by foci of perivascular cuffing with mononuclear cells, principally lymphocytes, was observed (Fig. 1A, B, C and D). The perivascular cuffing was noticed in olfactory bulb (Fig. 1A), frontal, temporal and parietal lobes (Fig. 1B and C) and last, in piriform lobe (Fig. 1D). These changes ranged in composition from a few cells (Fig. 1C and D) to, multiple layers of cell nuclei in the Virchow-Robin spaces (Fig. 1A, B and C). Lymphocytes infiltration into the brain parenchyma was rare. According to classification of these perivascular cuffing, it was considered severe in olfactory bulb, piriform lobe, hippocampus, and frontal, temporal and parietal lobes (Fig. 1E). Positive correlation was found between these changes

and BHV5 antigen distribution ($r=0.947$; $p<0.005$). These achieves were similar to what has been reported in experimental infected rabbits. However, some of infected rabbits did not develop neurological symptoms [15], fact that was not observed in this study. In rabbit model, microscopic examination revealed histological changes in cerebral cortex (frontal, temporal, occipital, parietal and piriform lobes) characterized by mononuclear perivascular cuffs.

Herein, inflammatory infiltrates constituted by CD3+ lymphocytes were detected mainly in olfactory bulb, hippocampus, piriform, frontal, temporal and parietal lobes (Fig. 2A-H). A strong association between CD3+ lymphocytes and BHV5 antigens was detected in olfactory bulb, frontal, temporal, and parietal lobes (Fig. 1F and Fig. 2E). These achieves are in accordance to what has been described in rabbits infected by BHV5 [15]. However, from rabbits presenting neurological symptoms, BHV5 antigens were detected in cerebellum, fact not observed in this study. Regarding to CD45R+ lymphocytes, only temporal and parietal lobes revealed 10% of positive cells (Fig.2G and H), similar to previous study [15].

All animals examined in this study were considered under acute phase of BHV5 infection. In this respect, molecular analysis revealed olfactory bulb and piriform lobe as main brain area whereas BHV5 *glyco-C* gene was mostly expressed (Fig. 3; $p<0.005$). Previous study, demonstrated an uniform distribution of BHV5 DNA among brain areas when rabbits were experimental infected [15]. In another study, during acute phase, BHV5-infected rabbits revealed viral DNA mostly in trigeminal ganglia, cerebellum, anterior cortex and pons-medulla [8,16]. However, in experimental infected calves, BHV5 DNA was consistently detected in trigeminal ganglia, midbrain, thalamus and olfactory bulb [19]. From all studied animals, natural

or experimental infected, olfactory bulb is a consensus regard to brain region where BHV5 is frequently detected.

In general, latency and reactivation are considered critical strategies for herpesviruses to survive in nature [17]. Typically, most cells infected by either alpha-human-and-animal *herpesvirus* support lytic replication, while only specific subsets of cells normally harbour latent viruses [6,7]. This study was the first to describe anti-and-pro-inflammatory cytokines in natural cases of BHV5 infection. Chemokines cause the accumulation and activation of leukocytes in tissues [4]. Attraction of leukocytes to tissues is essential for inflammation and the host response to infection, In this study, it was observed a maximum gene expression of *INFG*, *IL2*, *IL4*, *TNF* and *LTBR* in olfactory bulb, hippocampus, piriform, temporal and parietal lobes (Fig. 3). It is known that importance of *INFG* gene to transcribe INF-gamma is to produce an anti-viral response [4]. However, instead of being directly antiviral, it induces effector proteins production in the cells, which inhibits various stages of viral replication, assembly or release. Besides the balance among inflammatory and anti-inflammatory cytokines is necessary to avoid tissue damage [12]. Likewise, *IL4* gene, which encode IL-4 immunosuppressive cytokine, was detected at higher level in olfactory bulb, hippocampus and piriform and frontal lobes (Fig. 3). It might be possible that the expression of this cytokine would suppress the immune response and contribute to virus recovery.

In conclusion, these achieves provide important information to BHV5 neuropathogenesis in cattle suffering of acute phase. The data presented herein suggest additional knowledge to BHV5 spread and subsequent inflammation response. Nevertheless, further studies are needed to demonstrated cytokine profile involved in virus infection leads to fatal outcome.

Acknowledgements

The authors thank the Fundação Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Grants 2012/16715-6) for their support. EF Flores and TC Cardoso are recipient of CNPq (Brazilian Council for Research) funding.

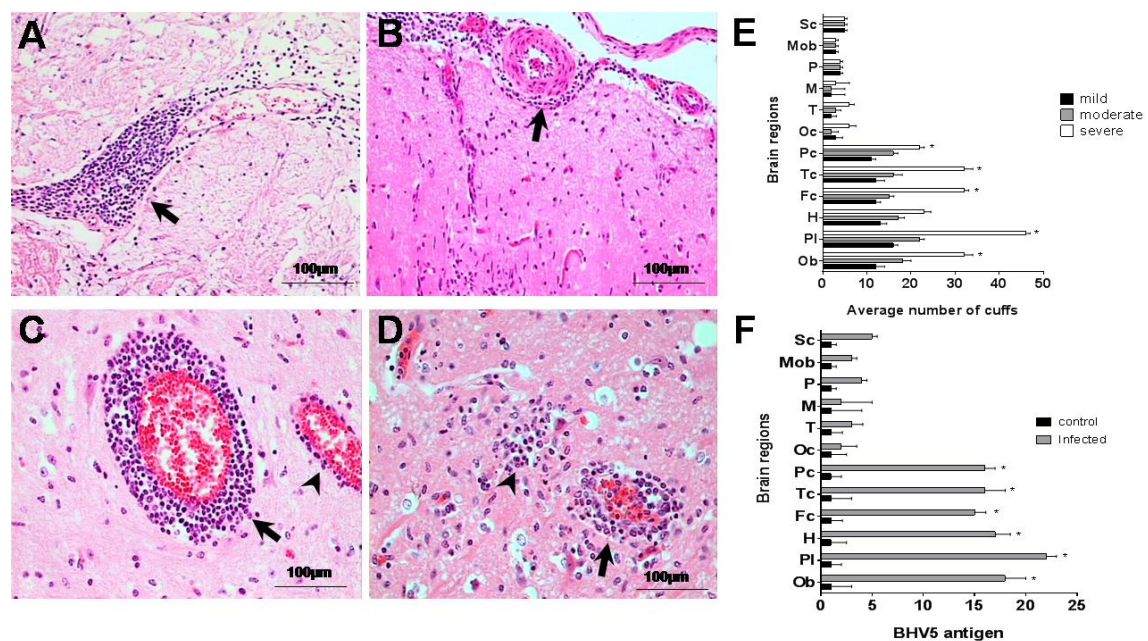


Fig. 1. Photomicrographs of histopathological changes (HE staining) characterized by perivascular cuffing in Virchow-Robin space (100-µm): A) olfactory bulb microscopy image revealing an intense mononuclear infiltration (arrow); B) Perivascular cuff in cortical area of frontal lobe; C) Perivascular cuffs characterized as severe (arrow) and mild (arrow head) observed in frontal, temporal and parietal lobes; D) Perivascular cuffs considered moderate (arrows) localized in hippocampus and arrow head parenchyma infiltrates; E) Average number of perivascular cuffs according to classification of mild, moderate and severe per brain area; F) Frequency of BHV5 antigen detection by immunohistochemistry assay per brain area. The mean value was statistically significant * $p < 0.005$.

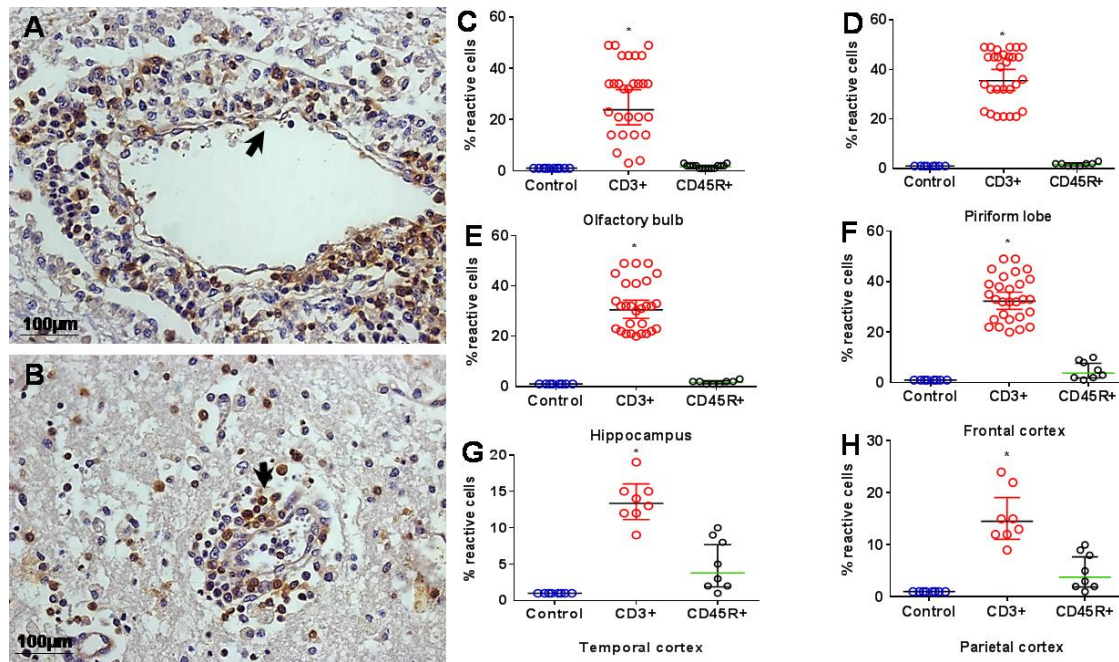


Fig. 2. Photomicrograph of CD3+ and CD45R+ lymphocytes detected by immunohistochemistry assay. A) Perivascular cuff graded as severe mainly composed by CD3+ lymphocytes (brownish deposits) in Virchow-Robin space; B) CD45R+ lymphocytes detected among perivascular cuff graded as moderate (100-μm); C-H) Number of CD3+ and CD45R+ lymphocytes detected and divided per brain area from BHV5 infected and control. The mean value was statistically significant * $p < 0.005$.

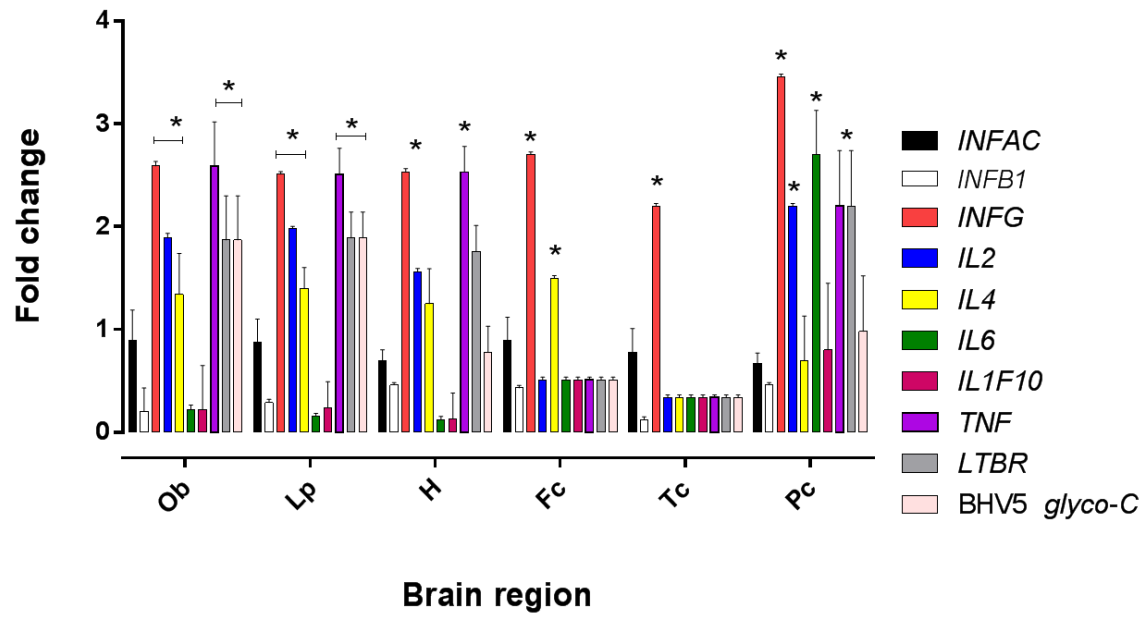


Fig. 3. Bar graph showing cytokine and BHV5 gene expression per brain area. Values are fold changes were calculated. The mean value was statistically significant * $p < 0.005$. Bars indicate the mean ($\pm$ standard deviation).

References

1. Cardoso TC, Ferrari HF, Garcia AF, Bregano LC, AL Andrade, Nogueira AHC (2010). Immunohistochemical approach to the pathogenesis of clinical cases of Bovine Herpesvirus type 5 infection. *Diagnostic Pathol* 5:57.
2. Cardoso TC, Gomes DE, Ferrari HF, Silva-Frade C, Rosa ACG, Andrade AL, Luvizotto MCR (2010). A novel in situ polymerase chain reaction hybridisation assay for the direct detection of bovine herpesvirus type 5 in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Virol Meth* 163:509-512.
3. Cardoso TC, Silva-Frade C, Táparo CV, Okamura LH, Flores EF. (2013). Validation of a reference control for an SYBR-Green fluorescence assay-based real-time PCR for detection of bovine herpesvirus 5 in experimentally exposed bovine embryos. *Mol Cell Prob* 27:237-42.
4. Crouse J, Kalinke U, Oxenius A (2015). Regulation of antiviral T cell responses by type 1 interferons. *Nature Rev Immunol* 15:232-242.
5. Davison AJ (2010). Herpesvirus systematics. *Vet Microbiol* 143:52-69.
6. Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellet PE, Roizman B, Studdert MJ, Thiry E (2009). The order *Herpesvirales*. *Arch Virol* 154:171-177.
7. Del Médico Zajac MP, Ladelfa MF, Kotsias F, Muylkens B, Thiry J, Thiry E, Romera SA (2010). Biology of bovine herpesvirus 5. *Vet J* 184:138-145.
8. Dezengrini R, Weiss M, Torres FD, Oliveira MS, Furian F, Mello CF, Weiblen R, Flores EF (2009). Bovine herpesvirus 5 induces an overproduction of nitric oxide in the brain of rabbits that correlates with virus dissemination and precedes the development of neurological signs. *J Neurovirol* 15:153-163.

9. Diallo IS, Corney BG, Rodwell BJ (2011). Detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 using multiplex real-time polymerase chain reaction. *J Virol Meth* 175:46-52.
10. Ferrari HF, Luvizotto MCR, Rahal P, Cardoso TC (2007). 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. *J Virol Meth* 143:335-340.
11. Flôres FS, Vogel F, Caron L, Flores EF, Weiben R, Wikelman ER, Mayer SV, Bastos RG (2003). Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous system of latency, experimentally infected calves. *J Clin Microbiol* 41:4512-4520.
12. Griffin BD, Verweij MC, Wiertz EJHJ (2010). Herpesvirus and immunity: art of invasion. *Vet Microbiol* 143:89-100.
13. Jones C, Silva LF, Sinani D (2011). Regulation of the latency-reactivation cycle by products encoded by bovine herpesvirus 1 (BHV-1) latency-related gene. *J Neurol* 17:535-545.
14. Lovato L, Inman M, Henderson G, Doster A, Jones C (2003). Infection pf cattle with a bovine herpesvirus 1 strain that contains a mutation in latency-related gene leads to increased apoptosis in trigeminal ganglia during the transition from acute infection to latency. *J Virol* 77:4848-4857.
15. Machado GF, Bernardi F, Hosomi FYM, Peiró JR, Weiblen R, Roehe PM, Alessi AC, Melo GD, Ramos AT, Maiorka PC (2013). Bovine herpesvirus-5 infection in a rabbit experimental model: immunohistochemical study of cellular response in the CNS. *Microbial Pathog* 57:10-16.
16. Mayer SV, de Quadros VL, Vigel FSF, Winkelmann ER, Arenhart S, Weiblen R, Flores EF (2006). Dexametasone-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* 39:335-343.

17. Perez SE, Bretschneider G, Leunda MR, Osorio EA, Flores EF, Odeón AC (2002). Primary infection, latency, and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. *Vet Pathol* 39:437-44.

18. Silva MS, Brum MCS, Loreto ELS, Weiblen R, Flores EF (2007). Molecular and antigenic characterization of Brazilian bovine herpesvirus type 1 isolates recovered from the brain of cattle with neurological disease. *Virus Res* 129:191-199.

19. Silveira F, Vogel F, Caron L, Flores EF, Weiblen R, Winkelmann ER, Mayer SV, Bastos RG. (2003) Distribution of Herpesvirus type 5 DNA in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. *Journal Clin Microbiol* 41:4512-4520.

20. Kook I, Doster A, Jones C (2015). Bovine herpesvirus 1 regulatory proteins are detected in trigeminal ganglionic neurons during the early stages of stress-induced escape from latency. *J Neurovirol* 87:11214-22.