



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal

**ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO DA MENINGOENCEFALITE POR
HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 E TIPO 5 EM BOVINOS**

MARIA HELENA BARROS PINTO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA – DF

DEZEMBRO/2023



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal

**ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO DA MENINGOENCEFALITE POR
HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 E TIPO 5 EM BOVINOS**

MARIA HELENA BARROS PINTO

ORIENTADOR: FABIANO JOSÉ FERREIRA DE SANT'ANA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA – DF

DEZEMBRO/2023

ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO DA MENINGOENCEFALITE POR HERPESVÍRUS
BOVINO TIPO 1 E TIPO 5 EM BOVINOS

MARIA HELENA BARROS PINTO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE
ANIMAL, COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM SAÚDE ANIMAL. O PRESENTE TRABALHO FOI
REALIZADO COM APOIO DA COORDENAÇÃO DE
APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL
SUPERIOR – BRASIL (CAPES) – CÓDIGO DE
FINANCIAMENTO 001.

APROVADA POR:

Fabiano José Ferreira de Sant’Ana, Doutor (Universidade de Brasília)

Cláudio Severo Lombardo de Barros, Doutor (Universidade Federal de Santa Maria)

José Manuel Verdes, Doutor (Universidad de la Republica)

Brasília- DF

2023

PINTO, M. H. **Estudo imuno-histoquímico da meningoencefalite por herpesvírus bovino tipo 1 e tipo 5 em bovinos.** Brasília, 2023. 37p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Campus Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Pe	Pinto, Maria Helena Barros Estudo imuno-histoquímico da meningoencefalite por herpesvírus bovino tipo 1 e tipo 5 em bovinos / Maria Helena Barros Pinto; orientador Fabiano José Ferreira de Sant'Ana. -- Brasília, 2023. 37 p.
	Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) -- Universidade de Brasília, 2023.
	1. neuropatologia. 2. doenças de bovinos. 3. herpesvírus bovino. 4. imunohistoquímica. 5. astrócitos. I. Sant'Ana, Fabiano José Ferreira de , orient. II. Título.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BoHV-1 -Herpesvírus bovino tipo 1

BoHV-5 - Herpesvírus bovino tipo 5

CB - Calbindina D 28k

GFAP - Glial Fibrillary Acidic Protein

Iba-1 - Ionized calcium binding adaptor molecule 1

IHC - Immunohistochemistry

IHQ – Imuno-histoquímica

NF - Neurofilamentos

PCR - Reação em cadeia da polimerase

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	v
SUMÁRIO	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	6
3. REFERENCIAS	7
4. INFORMAÇÕES ADICIONAIS	10
5. ARTIGO CIENTÍFICO	11

PINTO, M. H. B. **Estudo imuno-histoquímico da meningoencefalite por herpesvírus bovino tipo 1 e tipo 5 em bovinos.** Brasília, 2023. 37p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Campus Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília.

RESUMO

Os BoHV-1 e BoHV-5 são vírus intimamente relacionados, que pertencem à família *Herpesvirinae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e gênero *Varicellovirus*, podendo causar a meningoencefalite herpética. De forma geral, o diagnóstico presuntivo dessa enfermidade pode ser feito com a associação dos achados epidemiológicos, sinais clínicos e patológicos da infecção. Como nem sempre os corpúsculos de inclusão intranucleares são observados na histopatologia, outros métodos complementares de diagnóstico podem ser aplicados, como a PCR, sorologia, cultivo e isolamento viral, imunofluorescência e imuno-histoquímica (IHQ). Com o objetivo de avaliar e comparar, por IHQ, a reação glial e neuronal no encéfalo de bovinos acometidos por meningoencefalite por herpesvírus bovino tipo 1 e tipo 5, foram analisados seis encéfalos de bovinos, de 10 meses de idade, infectados experimentalmente por BoHV-5 (n=4) e naturalmente por BoHV-1 (n=2). A avaliação imuno-histoquímica identificou detalhes pouco ou não visualizados na histopatologia convencional. Na IHQ para GFAP, foi observada reação similar em todos os casos, com astrogliose e astrocitose nas áreas mais acometidas por inflamação, necrose neuronal e edema, com redução e fragmentação da reatividade dos astrócitos nos casos de BoHV-1. Em relação à IHQ para Iba-1, evidenciou-se microgliose multifocal acentuada com hipertrofia dos microgliócitos nas substâncias branca e cinzenta de quase todas as seções analisadas, e nas áreas com necrose neuronal e nos manguitos perivasculares contendo microgliócitos positivos. Houve marcação reduzida do NF nas áreas mais acometidas, especialmente córtex. A imunoreatividade de CB foi leve a moderadamente reduzida nos corpos neuronais das áreas mais afetadas nos casos de BoHV-1 e BoHV-5, respectivamente. De forma geral, os achados imuno-histoquímicos foram muito similares em todos os bovinos avaliados, independentemente do tipo de vírus envolvido.

Palavras-chave: neuropatologia, doenças de bovinos, herpesvírus bovino, imuno-histoquímica, astrócitos, micróglia.

PINTO, M. H. B. **Immunohistochemical study of meningoencephalitis by bovine herpesvirus type 1 and 5 in cattle.** Brasília, 2023. 37p. Dissertation (Master of Science) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Campus Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília.

SUMMARY

BoHV-1 and BoHV-5 are closely related viruses, belonging to the *Herpesvirinae* family, *Alphaherpesvirinae* subfamily and *Varicellovirus* genus, and can cause herpetic meningoencephalitis. In general, the presumptive diagnosis of this disease can be established with the association of epidemiological, clinical, and pathological findings. As intranuclear inclusion bodies are not always observed in histopathology, other complementary diagnostic methods, such as PCR, serology, viral culture and isolation, immunofluorescence and immunohistochemistry (IHC) can be applied. With the aim of evaluating and comparing, by immunohistochemistry, the glial and neuronal reaction in the brains of cattle affected by meningoencephalitis caused by bovine herpesviruses type 1 and type 5, six brains of 10-months-old calves, experimentally infected by BoHV-5 and naturally by BoHV-1, were used. The IHC evaluation identified details that were little or not visualized in conventional histopathology. In the immunohistochemical evaluation for GFAP, a similar reaction was observed in all cases, with astrogliosis and astrocytosis in the areas most affected by inflammation, neuronal necrosis, and edema, reduction and fragmentation of astrocyte reactivity in cases of BoHV-1. Regarding IHC for Iba-1, marked multifocal microgliosis with microglia hypertrophy was evident in the white and gray matter of almost all analyzed sections, and in areas with neuronal necrosis and in perivascular cuffs containing positive histiocytes. There was reduced NF immunolabeling in the most affected areas, especially the cortex. CB immunoreactivity was mild to moderately reduced in the neuronal bodies of the most affected regions of BoHV-1 and BoHV-5 cases, respectively. In general, the IHC findings were very similar in all cattle evaluated, regardless of the type of virus involved.

Keywords: neuropathology, diseases of cattle, bovine herpesvirus, immunohistochemistry, astrocytes, microglia

1. INTRODUÇÃO

Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e tipo 5 (BoHV-5) pertencem à família *Herpesvirinae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e gênero *Varicellovirus*. São espécies virais intimamente relacionadas, visto que possuem aproximadamente 85% do genoma idêntico. Para diferenciar ambos tipos virais, são necessárias técnicas moleculares como a reação em cadeia de polimerase (PCR), análise de restrição enzimática do genoma e testes de neutralização *in vitro*. O BoHV-1 possui cerca de 137 kilobases (Kb), enquanto que o BoHV-5 possui cerca de 138,4 Kb, sendo ambos envelopados, com DNA de fita dupla linear e um capsídeo icosaédrico que mede aproximadamente 100 a 110 nm de diâmetro. São capazes de permanecerem latentes nos hospedeiros (Franco e Roehe, 2007).

De maneira geral, a infecção em bovinos por BoHV-1 é associada à muitas condições reprodutivas e respiratórias, tais como vulvovaginite pustular infecciosa, balanopostite pustular infecciosa, doença sistêmica em bezerros neonatos, rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) e aborto, porém pode ocasionalmente causar doença neurológica, tendo em vista seu comportamento neurotrópico (Rodenbusch et al., 2020). Já o BoHV-5, é usualmente relacionado à doença neurológica, porém também pode causar doenças do trato genital, sendo isso já demonstrado por isolamento do vírus em sêmen de touros e em abortos (Franco e Roehe, 2007; Cantile e Youssef, 2007; Rissi et al, 2008; Krunert Filho et al., 2013; Rodenbusch, 2022).

O BoVH-1 possui distribuição mundial, sendo registrado na Europa, Américas e até mesmo na Ásia, enquanto que o BoHV-5 possui distribuição desconhecida, influenciada pelo fato de ter pouco mais de 30 anos que foi feita a diferenciação entre os tipos virais e antigamente pensava-se que eles eram o mesmo agente. No entanto, a infecção pelo BoHV-5 parece ser mais relevante no hemisfério sul, possivelmente por

conta do sucesso de programas de vacinação nos países do hemisfério norte, possuindo maior prevalência no Brasil, Argentina, Uruguai e Austrália. No Brasil, o BoHV-1 foi isolado pela primeira vez em 1978, em um caso de vulvovaginite no Estado da Bahia. Nas décadas seguintes, numerosos estudos e relatos confirmaram que o vírus está amplamente disseminado por praticamente todas as regiões do país (Franco e Roehle, 2007; Hashemi, 2022; Rissi e Lemos, 2023).

A transmissão do vírus ocorre de forma direta, pelo contato com secreções respiratória, ocular ou genital, já que o vírus está presente em todas essas secreções, ou de forma indireta, por meio dos aerossóis. Ambos os vírus podem entrar no organismo do bovino pela mucosa da nasofaringe e se replicam no epitélio local, causando sinais clínicos respiratórios, mais brandos quando é o BoHV-5, como congestão local, secreção, erosões ou vesículas locais. Após essa etapa, o agente invade as terminações nervosas dos neurônios sensoriais e seguem para o gânglio trigêmeo, responsável pela inervação local, ou até mesmo para os gânglios olfatório ou facial, por meio do fluxo axonal retrógrado, podendo permanecer latente, onde o animal infectado se torna portador da infecção e não desenvolve sinais clínicos, ou então, no caso da meningoencefalite herpética, causa a doença neurológica após ser transportado para o cerebelo, tálamo e/ou córtex telencefálico (Franco e Roehle, 2007; Rissi e Lemos, 2023).

Sabe-se que a distribuição viral ocorre de forma disseminada no encéfalo, porém com focos heterogêneos, afetando principalmente as regiões do bulbo olfatório, córtex telencefálico, medula oblonga, tálamo, ponte e nervo trigêmeo. Em um estudo de infecção natural onde avaliou-se a carga viral de BoHV-5, foi notado que os córtex frontal, parietal e temporal possuíam maior carga viral em relação ao córtex occipital, evidenciando a relevância da via de infecção com rota rostro-caudal (Rodenburg et al., 2022). Ademais, já foi observada mudança nos sítios de distribuição do herpesvírus bovino em casos de

infecção latente e aguda, havendo diferença entre os dois tipos, visto que o BoHV-1 demonstrou raramente ser detectado em regiões diferentes do gânglio do nervo trigêmeo, enquanto o BoHV-5 foi detectado em diversas regiões do cérebro, evidenciado seu caráter mais neuroinvasivo (Vogel et al., 2003; Mayer-Winkelmann, 2005; Cadore et al., 2011).

Do ponto de vista epidemiológico, a meningoencefalite herpética atinge bovinos majoritariamente jovens (até 36 meses de idade), possuindo baixa morbidade e alta letalidade, podendo ocorrer de forma isolada ou em surtos. A doença não possui predileção sexual ou comportamento sazonal, porém, nota-se afetar principalmente bovinos de criações extensivas e, em menor proporção, os de criação confinada (Colodel et al., 2002; Rissi et al., 2006; Franco e Roehe, 2007; Blume et al. 2018; Rissi e Lemos, 2023).

Os animais acometidos desenvolvem a doença ao passarem por algum fator de estresse, incluindo desmama, aglomerações, transporte, introdução de animais de outros rebanhos, mudanças na alimentação ou de propriedade, confinamento de bezerros, vacinação, castração e até mudanças climáticas não usuais (Rissi et al., 2006). O curso clínico da meningoencefalite por BoHV-1 e BoHV-5 dura em média 15 a 21 dias, e os principais sinais clínicos incluem febre, incoordenação, tremores (principalmente na cabeça), ataxia, corrimento ocular e/ou nasal, cegueira, sialorreia, nistagmo, opistótono, apatia, afastamento do rebanho, convulsões, decúbito, andar em círculos, pressão da cabeça contra objetos, ranger de dentes, perda de reflexos visuais, dificuldade para beber água ou se alimentar, havendo uma variação de sinais e intensidade relacionada à localização heterogênea do vírus no sistema nervoso central, podendo afetar desde o telencéfalo até a medula espinhal (Colodel et al., 2002; Rissi et al., 2006; Massitel et al., 2016; Blume et al., 2018). Há relatos de animais que chegam a recuperar-se após o uso de uso de corticoesteroides e administração de tiamina, às vezes com cegueira, tornando-

se fonte de infecção latente permanente e representando perigo para os demais bovinos saudáveis do rebanho (Cantile e Youssef, 2007; Rissi e Lemos, 2023).

As principais lesões macroscópicas podem ser detectadas no sistema nervoso central, principalmente nas porções rostrais do telencéfalo, entretanto em alguns casos pode-se observar adicionalmente rinite ou conjuntivite. No encéfalo, observa-se hiperemia de leptomeninges, hemorragia e áreas com tumefação, achatamento, amolecimento e liquefação dos giros telencefálicos (malacia), especialmente nas porções mais rostrais, como o córtex frontal (Colodel et al., 2002; Rissi e Barros, 2013; Blume et al., 2018). Herniação do cerebelo na direção do forame magno também pode ocorrer em alguns casos como consequência da tumefação e edema cerebral. Há relatos de animais enfermos com sinais clínicos, porém sem lesões macroscópicas (Blume et al., 2018). Nos casos avançados, nota-se lesões extensas, simétricas e bilaterais de cavitação (malacia) no córtex frontal. Ao exame histopatológico, comumente observam-se lesões nas substâncias branca e cinzenta de todo o encéfalo, com maior frequência no córtex telencefálico, incluindo o frontal, núcleos da base, tálamo e tronco encefálico. Os principais achados histopatológicos incluem meningoencefalite linfoplasmocítica, hiperemia, necrose neuronal (*red neurons*), edema perineuronal, perivascular e do neurópilo, gliose multifocal ou difusa, astrocitose e infiltração de macrófagos espumosos. Em conjunto com os achados descritos anteriormente, o diagnóstico histopatológico da infecção herpética pode ser confirmado com a visualização de corpúsculos de inclusão intranucleares basofílicos em astrócitos ou neurônios (Colodel et al., 2002; Rissi et al., 2006; Blume et al., 2018). Em casos avançados, já foi relatado desaparecimento segmentar do córtex telencefálico (Franco e Roehe, 2007; Rissi e Lemos, 2023).

O diagnóstico presuntivo da meningoencefalite herpética pode ser feito com a associação dos achados epidemiológicos, sinais clínicos e patológicos da infecção. Como

nem sempre os corpúsculos de inclusão intranucleares são observados na histopatologia, outros métodos complementares de diagnóstico podem ser aplicados, como a PCR, cultivo e isolamento viral, imunofluorescência e imuno-histoquímica (Franco e Roehle, 2007; Sá e Silva et al., 2007; Rissi e Lemos, 2023).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo realizar um estudo imuno-histoquímico da meningoencefalite por herpesvírus bovino tipo 1 e tipo 5 em bovinos.

2.2 Objetivo específico

- Avaliar, por imuno-histoquímica, a reação glial e neuronal no encéfalo de bovinos acometidos por meningoencefalite por herpesvírus bovino tipo 1 e tipo 5;
- Comparar, por imuno-histoquímica, a reação glial e neuronal no encéfalo de bovinos acometidos por meningoencefalite por herpesvírus bovino tipo 1 e tipo 5.

3. REFERÊNCIAS

BLUME, G. R.; SILVA, L. F.; BORGES, J. R. J. et al. Caracterização etiológica, epidemiológica e clínico-patológica da meningoencefalite por herpesvírus bovino em bovinos no Estado de Goiás. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 5, p. 902-912, 2018.

CADORE, G. C.; ANZILIERO, D.; WEIBLEN, R., et al. Reativação e distribuição do DNA latente do herpesvírus bovino tipo 5 no encéfalo de ovinos infectados experimentalmente. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 12, p. 1090–1096, 2011.

CANTILE, C.; YOUSSEF, S. Nervous System. In: MAXIE, M.G., **Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals**. Missouri: Elsevier, 2007, p. 250-406.

COLODEL, E. M.; NAKAZATO, L., WEIBLEN R. et al. Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por herpesvírus bovino no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 32, n. 2, p. 293-298, 2002.

FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Herpesviridae. In: FLORES, E. F. **Virologia veterinária**. Santa Maria: Editora UFSM, 2007, p. 433-488.

HASHEMI M, BAKHSHESH M, MANAVIAN M. Bovine Viral Diarrhea Virus and Bovine Herpes Virus-1 in Dairy Cattle Herds in Fars Province, Southern Iran: Seroprevalence and Evaluation of Risk Factors. **Archives of Razi Institute**, v. 77, n. 5, p. 1621-1629, 2022.

KRUNERT FILHO, H. C. K.; DE SALES LIMA, F. E.; CIBULSKI, S. P. et al. Bovine herpesviruses do not play a major role in the differential diagnosis of rabies in cattle in Southern Brazil, **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 41, p. 1-7, 2013.

MASSITEL, J. L., WESGUEBER, J., OLIVEIRA, R. A. M. et al. Presença do genoma de BoHV-5 no líquido cefalorraquidiano de bovinos com meningoencefalite herpética. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 2, p. 548-552, 2016.

MAYER-WINKELMANN, S. V. **Distribuição do DNA dos herpesvírus bovino tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) no encéfalo de coelhos durante a infecção latente.** Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil, 2005, 41 p. Dissertação de Mestrado.

SÁ E SILVA, M.; BRUM, M.C.S.; WEIBLEN, R. et al. Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987-2006). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, p. 403-408, 2007.

RISSI, D. R.; OLIVEIRA, F. N.; RECH, R. R. et al. 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.

RISSI, D. R.; PIEREZAN, F.; SÁ E SILVA, M. et al. Neurological Disease in Cattle in Southern Brazil Associated with Bovine Herpesvirus Infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, n. 3, p. 346-349, 2008.

RISSI, D. R.; BARROS, C. S. Necrotizing meningoencephalitis in a cow. **Veterinary Pathology**, v. 50, n. 5, p. 926-929, 2013.

RISSI, D. R.; LEMOS, R. A. A. Infecções por Herpesvírus Bovino. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; LEMOS, R. et al. **Doenças de Ruminantes e Equídeos.** São Paulo: Editora MedVet, 2023, p. 87-97.

RODENBUSCH, C. R., ALMEIDA, L. L., CASAGRANDE, R. A. et al. Distribuição do herpesvírus bovino tipo 5 em encéfalo de bovino naturalmente infectado. **Archives of Veterinary Science**, v. 27, n. 2, p. 01-07, 2022.

VOGEL, F. S. F.; CARON, L.; FLORES, E. F. et al. Distribution of Bovine Herpesvirus Type 5 DNA in the Central Nervous Systems of Latently, Experimentally Infected Calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 10, p. 4512-4520, 2003.

4. INFORMAÇÕES ADICIONAIS

Como parte da dissertação, foi redigido um artigo científico titulado “Estudo imuno-histoquímico da reação glial e neuronal da meningoencefalite por herpesvírus bovino tipo 1 e tipo 5 em bovinos”, que será submetido posteriormente para publicação no periódico *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Full Scientific Reports

Estudo imuno-histoquímico da reação glial e neuronal na meningoencefalite por herpesvírus bovino tipo 1 e tipo 5 em bovinos

Maria H. B. Pinto¹, Camila Larrañaga², José M. Verdes², Didier Q. Cagnini³, Fabiano J. F. de Sant'Ana¹

¹Universidade de Brasília (UnB), Laboratório de Diagnóstico Patológico Veterinário (LDPV), Brasília, DF, Brazil.

²Universidad de la República (Udelar), Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay.

³Universidade Federal de Jataí, Jataí, GO, Brazil.

Corresponding author: Fabiano J. F. de Sant'Ana, Universidade de Brasília, Laboratório de Diagnóstico Patológico Veterinário, Granja do Torto, 70636-200, Brasília, DF, Brazil. santanafj@yahoo.com

Abstract

Foram analisados por imuno-histoquímica (IHQ) a reação glial e neuronal da meningoencefalite herpética em seis encéfalos de bovinos de 10 meses de idade, infectados experimentalmente por BoHV-5 (n=4) e naturalmente por BoHV-1 (n=2). A avaliação imuno-histoquímica identificou detalhes pouco ou não visualizados na histopatologia convencional. Na IHQ para GFAP, foi observado astrogliose e astrocitose nas áreas mais acometidas por inflamação, necrose neuronal e edema, principalmente no telencéfalo dos casos de BoHV-5, com redução e fragmentação da reatividade dos astrócitos nessas zonas mais acometidas nos casos de BoHV-1. Em relação à IHQ para Iba-1, evidenciou-se microgliose multifocal acentuada com hipertrofia dos microgliócitos nas substâncias branca e cinzenta de quase todas as seções analisadas, bem como nas áreas com necrose neuronal e nos manguitos perivascularares contendo histiócitos positivos. Houve marcação reduzida do NF nas áreas mais acometidas, especialmente córtex. A imunoreatividade de CB foi leve a moderadamente reduzida nos corpos neuronais das áreas mais afetadas nos casos de BoHV-1 e BoHV-5, respectivamente. De forma geral, os achados imuno-histoquímicos foram muitos similares em todos os bovinos avaliados, independentemente do tipo de vírus envolvido.

Keywords

Neuropathology, diseases of cattle, bovine herpesvirus, immunohistochemistry, astrocytes, microglia

Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e tipo 5 (BoHV-5) são vírus intimamente relacionados, que pertencem à família *Herpesvirinae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e gênero *Varicellovirus* (Franco e Roehe, 2007). Esses agentes podem causar várias manifestações clínicas, incluindo meningoencefalite, rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), conjuntivite, vulvovaginite pustular, abortos, balanopostite pustular e forma sistêmica neonatal (Rissi e Lemos, 2023). Usualmente, a manifestação neurológica é atribuída ao BoHV-5, enquanto que os demais quadros são causados pelo BoHV-1 (Sá e Silva et al., 2007). Entretanto, sabe-se que os dois vírus podem estar envolvidos na meningoencefalite, conforme foi previamente confirmado no Brasil (Rissi et al., 2008). Assim, técnicas moleculares como PCR são necessárias para definir o tipo viral envolvido nesses casos (Lunardi et al., 2009; Arruda et al., 2010). A enfermidade neurológica é relativamente frequente na América do Sul, principalmente no Brasil, Argentina e Uruguai (Sá e Silva et al., 2007). No Brasil, a meningoencefalite herpética é comum em várias regiões e é considerada a segunda doença mais frequente que acomete o sistema nervoso central de bovinos (Franco e Roehe, 2007; Queiroz et al., 2018; Terra et al., 2018; Rissi e Lemos, 2023). Usualmente, a meningoencefalite herpética acomete bovinos jovens submetidos a episódios recentes de estresse. A enfermidade apresenta morbidade e mortalidade baixas, porém cursa com letalidade alta (Colodel et al., 2002; Rissi et al. 2006; Lunardi et al., 2009; Blume et al., 2018).

As principais lesões observadas no sistema nervoso central ocorrem no encéfalo e incluem meningoencefalite linfoplasmocítica multifocal, associada à necrose neuronal, edema, gliose, infiltração de macrófagos espumosos e corpúsculos de inclusão intranucleares basofílicos em astrócitos ou neurônios (Colodel et al., 2002; Rissi et al. 2006; Rissi et al., 2008; Lunardi et al., 2009; Cagnini et al., 2015; Blume et al., 2018). Alguns estudos imuno-histoquímicos têm sido realizados avaliando a distribuição do

BoHV-5 (Meyer et al., 2001; Pedraza et al., 2008; Machado et al., 2013; Cagnini et al., 2015) e do BoHV-1 (Meyer et al., 2001) no sistema nervoso central. Adicionalmente, alguns estudos experimentais analisaram outros aspectos patogénicos da infecção neurológica por BoHV-5 em coelhos (Machados et al., 2013) e camundongos (Silva et al., 2022). Assim, o presente estudo objetiva analisar e comparar detalhadamente por imuno-histoquímica a reação glial e neuronal da meningoencefalite herpética em bovinos infectados naturalmente por BoHV-1 e experimentalmente por BoHV-5.

Materiais e métodos

Foram analisados seis encéfalos de bovinos de 10 meses de idade, infectados experimentalmente por BoHV-5 (n=4) (Cagnini et al., 2015) e naturalmente por BoHV-1 (n=2) (Blume et al., 2018) e amostras de dois encéfalos de bovinos de idade semelhante, sem histórico de doença neurológica como causa de morte e negativas para PCR, foram utilizadas como controlos positivos para IHQ.

Em todos os casos, o diagnóstico da infecção foi confirmado previamente por PCR. Os achados clínicos, macro e histopatológicos foram descritos previamente (Cagnini et al., 2015; Blume et al., 2018).

As amostras de encéfalo foram coletadas e fixadas em formol tamponado a 10%. Após a fixação, cortes transversais no encéfalo com intervalos de 1-2 cm foram realizados para avaliação macroscópica. As seguintes seções foram preparadas para avaliação microscópica: córtex frontal e parietal, núcleos basais, tálamo, mesencéfalo, ponte, medula oblonga e cerebelo. Todos os fragmentos foram processados rotineiramente para histologia, incluídos em parafina e corados pela hematoxilina-eosina (HE).

Para imuno-histoquímica (IHQ), de cada seção do encéfalo, foram obtidos cortes adicionais com 4 µm de espessura e colocados em lâminas positivadas, que foram

desparafinizadas em xilol, seguida de imersão em concentrações decrescentes de etanol. A peroxidase endógena foi bloqueada com H₂O₂ a 3% em metanol por 5 min. Recuperação antigênica foi realizada com solução Borg Decloaker, RTU[®] (Biocare Medical, CA). Os anticorpos primários utilizados foram Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), Iba-1, neurofilamentos (NF) e calbindina D 28k (CB) (Tab. 1), que foram incubados *overnight* a 4°C, seguidos de duas incubações de 15 min em temperatura ambiente com anticorpo secundário biotilado e sistema de detecção estreptavidina-peroxidase conjugada. Diaminobenzidina (DAB) foi usado com cromógeno e, posteriormente, os cortes foram contracorados com hematoxilina de Mayer. Nos controles negativos, o anticorpo primário foi substituído por PBS, enquanto para os controles positivos foram utilizadas amostras de encéfalo de animais normais com idade semelhante.

Resultados

Na histopatologia, as lesões detectadas foram muito similares nos casos de BoHV-1 e BoHV-5 e incluíam meningoencefalite linfoplasmocítica multifocal, gliose multifocal, necrose neuronal, segmentar e laminar, edema perineuronal, perivascular e no neurópilo, astrocitose, e corpúsculos de inclusão basofílicos intranucleares em astrócitos e neurônios. Houve discreta variação na intensidade das lesões, mas as regiões acometidas foram principalmente o córtex frontal e parietal, núcleos basais, tálamo e cerebelo. Em algumas áreas do córtex, nos casos de BoHV-1, foi observada infiltração discreta de macrófagos espumosos.

No estudo imuno-histoquímico para GFAP, observou-se que nos casos de BoHV-1, a imunomarcção para astrócitos foi discreta e irregular na substância cinzenta dos núcleos basais e telencéfalos frontal e parietal acentuadamente acometidos, especialmente

por necrose neuronal, edema e inflamação, indicando fragmentação astrocítica (Fig. 1). Já nos encéfalos afetados por BoHV-5, notou-se reatividade moderada a acentuada em astrócitos, evidenciando astrocitose e astrogliose no córtex frontal e parietal, núcleos basais, tálamo e medula oblonga, principalmente próximos aos manguitos (Fig. 2).

A marcação de células positivas a Iba-1 nos casos de BoHV-1 foi acentuada adjacente aos manguitos e aos corpos neuronais necróticos e em áreas com microgliose multifocal, especialmente no córtex, núcleos basais, cerebelo, tálamo e mesencéfalo (Fig. 3 e 4). Nos casos de BoHV-5, a intensidade da imunoreatividade foi muito similar em quase todas as regiões analisadas, afetando somente a substância branca ou cinzenta, com exceção do cerebelo que apresentou distribuição homogênea nessas regiões afetadas. Havia positividade muito evidente e acentuada nas áreas com hipertrofia e hiperplasia (microgliose) de microglíócitos (Fig. 5). Adicionalmente, foi observada microgliose difusa no mesencéfalo que apresentou necrose neuronal concentrada principalmente na região dos colículos e, na ponte de outro animal, havia microgliose sem necrose neuronal significativa.

Houve redução acentuada da reatividade ao NF nos corpos neuronais, axônios e terminações nervosas predominantemente na substância cinzenta mais acometida do telencéfalo, núcleos basais e tálamo nos bovinos infectados por BoHV-1 (Fig. 6). Já nos casos de BoHV-5, a diminuição da imunomarcação foi intensa nos corpos neuronais do córtex frontal e parietal, e moderada nos núcleos basais, medula oblonga e cerebelo.

A CB reagiu moderadamente em corpos neuronais normais e necróticos, astrócitos, células endimárias e parede de vasos (endotélio e fibras elásticas) em todas as regiões nos animais afetados por BoHV-1 (Fig. 7). Já nos casos de BoHV-5, houve marcação discreta no pericário de neurônios necróticos, principalmente no córtex frontal e parietal, núcleos basais e tálamo e reação acentuada na parede vascular nas áreas

inflamadas (Fig. 8) e em focos de gliose (Fig. 9). Corpos neuronais normais, especialmente os de Purkinje, foram fortemente CB-positivos, servindo de controle interno.

Discussão

Embora alguns estudos tenham analisado previamente alguns aspectos patogénicos da infecção por BoHV-5 em bovinos (Meyer et al., 2001; Pedraza et al., 2008; Cardoso et al., 2010) ou em modelos experimentais (Machado et al., 2013; Silva et al., 2022), pela primeira vez, a reação glial e neuronal do encéfalo em casos naturais e experimentais de meningoencefalite por BoHV-1 e BoHV-5 foi avaliada conjuntamente e detalhadamente por imuno-histoquímica. Estudo similar de nosso grupo de pesquisa investigou a reação imuno-histoquímica de células gliais e neuronais em bovinos infectados naturalmente por raiva (Verdes et al., 2016), que é considerada uma das principais doenças neurológicas de bovinos do Brasil (Sanches et al., 2000; Queiroz et al., 2018; Terra et al., 2018; Rissi e Lemos, 2023). Foi observado que bovinos infectados por raiva apresentam proliferação microglial, astrocitose reativa discreta e redução de imunoreatividade a CB em células de Purkinje (Verdes et al., 2016).

O diagnóstico da meningoencefalite herpética em bovinos é realizado associando os achados clínico-patológicos, epidemiológicos e laboratoriais (Rissi e Lemos, 2023). Em nossos casos, o diagnóstico da infecção por BoHV-5 ou -1 foi confirmado em todos os bovinos analisados por PCR e, adicionalmente, pela visualização dos achados histopatológicos, incluindo os corpúsculos de inclusão intranucleares característicos (Cagnini et al., 2015; Blume et al., 2018). Vale ressaltar que um estudo demonstrou que alguns bovinos diagnosticados com raiva apresentaram PCR positivo para herpesvírus

bovino, sugerindo que esse último agente não foi considerado relevante na patogenia das lesões, devido à sua latência (Krunert Filho et al., 2013).

Na avaliação imuno-histoquímica para GFAP do presente estudo, foi observado astrogliose e astrocitose nas áreas mais acometidas por inflamação, necrose neuronal e edema, principalmente no telencéfalo dos casos de BoHV-5. Dados muito similares foram observados em coelhos infectados experimentalmente por BoHV-5 (Machado et al., 2013). Adicionalmente, observou-se no presente estudo que houve redução e fragmentação da reatividade dos astrócitos nessas zonas mais acometidas nos casos de BoHV-1. Possivelmente, essa diferença de reação astrocitária tenha ocorrido em função da diferença do curso clínico entre os grupos analisados (natural e experimental). Estudo prévio tem demonstrado que o encéfalo de bovinos infectados com raiva apresenta aumento discreto da reatividade a GFAP, principalmente no cerebelo (Verdes et al., 2016).

Em relação à IHQ para Iba-1, evidenciou-se microgliose multifocal acentuada com hipertrofia dos microglíócitos nas substâncias branca e cinzenta de quase todas as seções analisadas, bem como nas áreas com necrose neuronal e nos manguitos perivascularares contendo histiócitos positivos. Esses achados reforçam as lesões já detectadas na HE, contudo destacam a hipertrofia relevante dos processos microgliais, que não são visualizados na histopatologia rotineira. A reação generalizada de hipertrofia e hiperplasia da micróglia pelo encéfalo possivelmente está relacionada com a via de infecção e distribuição do vírus que pode alcançar e inflamar todo o encéfalo (Machado et al., 2013; Rodenbusch et al. 2022). Contudo, em camundongos experimentalmente infectados com BoHV-5, microgliose reativa foi observada apenas no córtex cerebral (Silva et al., 2022), refletindo que a patogenia da infecção herpética e reação tecidual podem variar de acordo com a espécie animal e a cepa viral utilizadas.

O anticorpo NF foi mais eficiente na avaliação da injúria neuronal, visto que o mesmo consegue imunodetectar proteínas presentes em qualquer região (pericárdio, axônio, dendritos, etc.) de todos os neurônios do encéfalo. A marcação reduzida desse anticorpo nas áreas mais acometidas, especialmente do córtex, reforça a necrose neuronal já visualizada na HE, que representa um dos achados mais relevantes e importantes na patogenia da infecção herpética (Roizmann et al., 1992; Rissi et al., 2008; Cagnini et al., 2015; Blume et al., 2018).

No presente estudo, a imunoreatividade de CB foi leve a moderadamente reduzida nos corpos neuronais das áreas mais afetadas. Essa redução foi bem menos evidente do que a visualizada pelo NF. Em bovinos e ovinos normais, a reatividade a esse anticorpo é mais intensa e específica em algumas populações de neurônios, principalmente os de Purkinje e interneurônios GABAérgicos da camada granular cerebelar (Vidal et al., 2006; Verdes et al., 2010). CB é considerada um excelente marcador neuronal para neurônios de Purkinje, em situações fisiológicas e patológicas, em bovinos (Verdes et al., 2010), bem como em outras espécies (Sisó et al., 2003; Poncelet et al., 2013). Ademais, esse anticorpo tem sido usado como marcador molecular da homeostase do cálcio intracelular. Estudos já demonstraram redução da imunoreatividade a CB no córtex cerebelar de ratos infectados experimentalmente com o vírus de Borna (Eisenmann et al., 1999), de bovinos infectados naturalmente com raiva (Verdes et al., 2016) e de bovinos intoxicados cronicamente por *Solanum bonariense* (Verdes et al., 2010).

No presente estudo, a avaliação imuno-histoquímica foi muito útil ao identificar alguns detalhes pouco ou não visualizados na histopatologia convencional, que contribuem para o entendimento da patogenia dessa importante infecção viral de bovinos. De forma geral, os nossos achados imuno-histoquímicos foram muitos similares em todos os bovinos avaliados, independentemente do tipo de vírus envolvido. Um estudo

comparativo comprovou que também não há diferenças relevantes entre as lesões histopatológicas no encéfalo de bovinos infectados experimentalmente por esses dois tipos virais (Meyer et al., 2001).

Acknowledgments

We thank Prof. Claudio Barros for his assistance, suggestions and critical review of the manuscript.

Declaration of conflicting interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

This study was supported by grant from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) (Proc. 471837/2013-0 e 315717/2021-1). FJFS is CNPq research fellow.

REFERÊNCIAS

Arruda LP, Nakazato L, Dutra V, et al.: 2010, 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* 30(8):646-650.

Blume GR, Silva LF, Borges JRJ, et al.: 2018, Caracterização etiológica, epidemiológica e clínico-patológica da meningoencefalite por herpesvírus bovino em bovinos no Estado de Goiás. *Pesq Vet Bras* 38(5):902-912.

Cagnini DQ, Cunha PHJ, Pantoja JCF, et al.: 2015, Histopathological, immunohistochemical, and molecular study of BHV-5 infection in the central nervous system of experimentally infected calves. *Pesq Vet Bras* 35(4):337-343.

Colodel EM, Nakazato L, Weiblen R, et al.: 2002, Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por herpesvírus bovino no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Cienc Rural* 32(2):293-298.

Eisenman LM, Brothers R, Tran MH, et al.: 1999, Neonatal Borna disease virus infection in the rat causes a loss of Purkinje cells in the cerebellum. *J Neurovirol* 5:181-189.

Franco AC; Roehe PM. Herpesviridae. In: FLORES, E. F. *Virologia veterinária*. Santa Maria: Editora UFSM, 2007;433-488.

Krunert Filho HCK, de Sales Lima FE, Cibulski SP; et al.: 2013, Bovine herpesviruses do not play a major role in the differential diagnosis of rabies in cattle in Southern Brazil, *Acta Sci Vet* 41:1-7.

Lunardi M, Claus MP, Lisbôa JAN, et al.: 2009, Neurological and epidemiological aspects of BoHV-5 meningoencephalitis outbreak. *Braz. Arch Biol Technol* 52(spec.):77-85.

Machado GF, Bernardi F, Hosomi FYM, et al.: 2013, Bovine herpesvirus-5 infection in a rabbit experimental model: immunohistochemical study of the cellular response in the CNS. *Microb Pathog* 57:10-16.

Meyer G, Lemaire M, Ros C, et al.: 2001, Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. *Arch. Virol* 146(4):633-652.

Pedraza FJ, Alessi AC & Barbosa-Stancioli EF, 2010, Detection of bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine brain by nested PCR in Colombian cattle. *Rev Colomb de Cienc Pecu* 23:292-298.

Queiroz, GR, de Oliveira RAM, Flaiban KKMC, et al.: 2018, Diagnóstico diferencial das doenças neurológicas dos bovinos no estado do Paraná. *Pesq Vet Bras* 38(7):1264-1277.

Rissi DR, Oliveira FN, Rech RR, et al.: 2006, Epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões encefálicas em bovinos afetados por meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. *Pesq Vet Bras* 26(2).

Rissi DR & Lemos RAA. Infecções por Herpesvírus Bovino. In: Riet-Correa, F.; Schild, A. L.; Lemos, R. et al. *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. São Paulo: Editora MedVet 2023;87-97.

Rissi DR, Piereza F, Sá e Silva M, et al.: 2008, Neurological Disease in Cattle in Southern Brazil Associated with Bovine Herpesvirus Infection. *J Vet Diagn Invest* 20(3):346-349.

Rodenbusch CR; Ferreira JC; Cunha DLBW et al.: 2020, Molecular evidence of bovine herpesvirus 1 and 5 in cattle with suspected rabies in Rio Grande do Sul state, Brazil. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 73:101495.

Rodenbusch CR, Almeida LL, Casagrande RA, et al.: 2022, Distribuição do herpesvirus bovino tipo 5 em encéfalo de bovino naturalmente infectado. *Arch Vet Sci* 27(2):01-07.

Roizmann B, Desrosiers RC, Fleckenstein B, et al.: 1992, The family Herpesviridae: an update. *Arch Virol* 123(3/4):425-449.

Silva JCS, Fernandes AWN, Nunes MJM, et al.: 2022, Regulação negativa de Calbindina-D28k durante o envelhecimento neural animal. *Rev Neurocienc* 30.

Sá e Silva M, Brum MCS, Weiblen R, et al.: 2007, Identificação e diferenciação de bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987-2006). *Pesq Vet Bras* 27(10):403-408.

Siso S, Tort S, Pérez L, et al.: 2003, Abnormal neuronal expression of the calciumbinding proteins, parvalbumin and calbindin D-28k, in aged dogs. *J Comp Pathol* 128:9–14.

Poncelet L, Springinsfeld M, Ando K, et al.: 2013, Expression of transferrin receptor 1, proliferating cell nuclear antigen, p27Kip1 and calbindin in the fetal and neonatal feline cerebellar cortex. *Vet J* 196:388–393.

Verdes JM, Sant'Ana FJF, Sabalsagaray MJ, et al.: 2016, Calbindin D28k distribution in neurons and reactive gliosis in cerebellar cortex of natural Rabies virus–infected cattle, *J Vet Diagn Invest* 28(4):361–368.

Verdes JM, Moraña JA, Battes D, et al.: 2010, Calbindin D28k expression and the absence of apoptosis in the cerebellum of *Solanum bonariense* L–intoxicated bovines. *Vet Pathol* 47:569–572.

Vidal E, Bolea R, Tortosa R, et al.: 2006, Assessment of calcium-binding proteins (Parvalbumin and Calbindin D-28K) and perineuronal nets in normal and scrapie-affected adult sheep brains. *J Virol Methods* 136:137–146.

Tables

Tabela 1. Dados dos anticorpos utilizados na avaliação imuno-histoquímica do encéfalo de bovinos infectados naturalmente por herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e tipo 5 (BoHV-5).

Antibody	Source	Clone	Dilution
GFAP, Mouse monoclonal	Biocare Medical	PM065AA	RTU
Calbindin, Rabbit polyclonal	Biorbyt	orb5912	1/200
Iba-1, Goat polyclonal	Abcam	ab5076	1/1000
NF, Mouse monoclonal	CM 066 A, Biocare Medical	901-066-041218	01:50

Figure legends

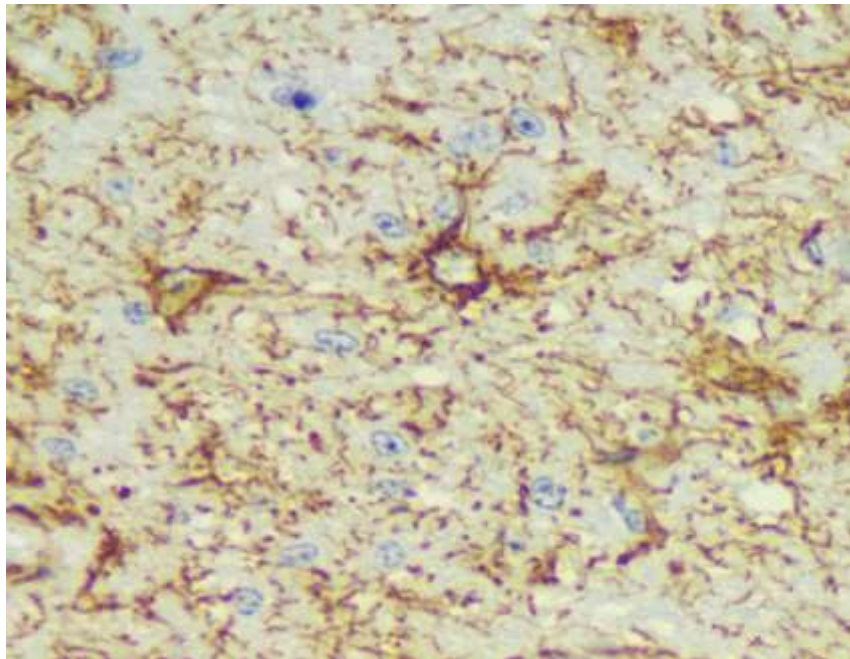


Figura 1. Bovino infectado por BoHV-1, encéfalo (cápsula interna). Área acentuadamente acometida por necrose neuronal e edema evidenciando fragmentação e irregularidade dos processos astrocitários. IHQ, GFAP, 40x.

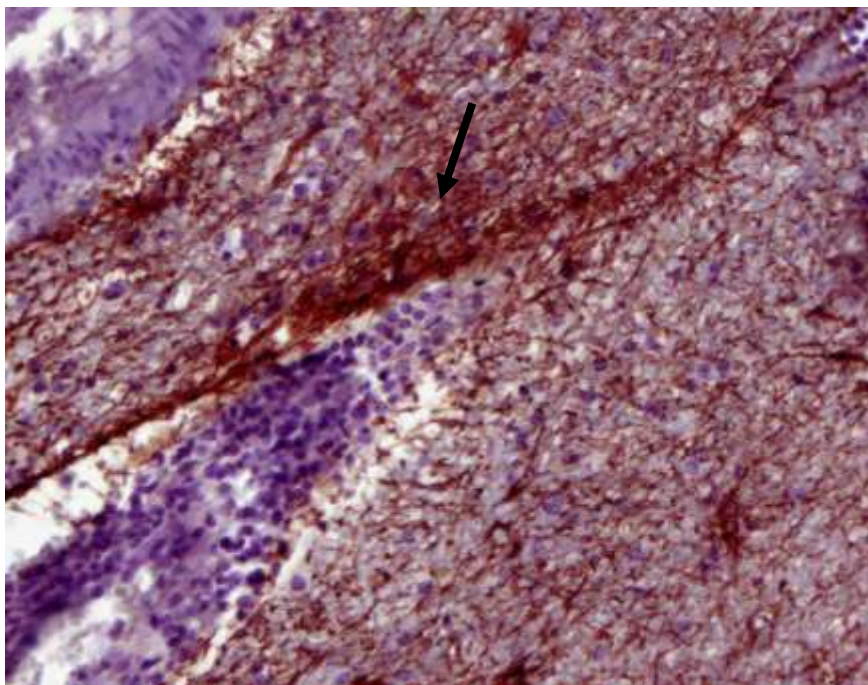


Figura 2. Bovino infectado por BoHV-5, encéfalo (núcleos basais). Área adjacente a manguito perivascular linfocítico revela astrogliose moderada. IHQ, GFAP, 40x.

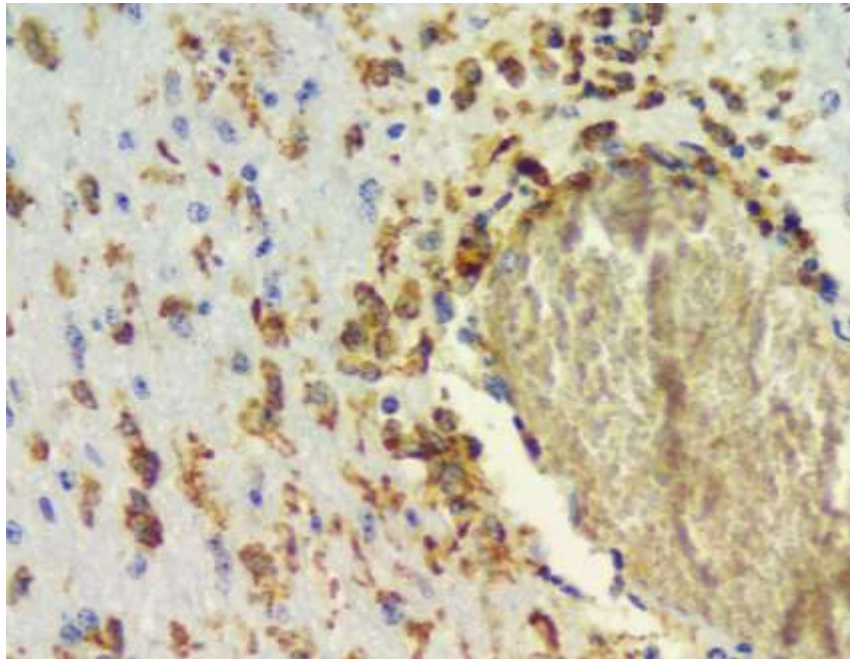


Figura 3. Bovino infectado por BoHV-1, encéfalo (tálamo). Há numerosos histióctos perivasculares Iba-1 positivos. IHQ, Iba-1, 40x.

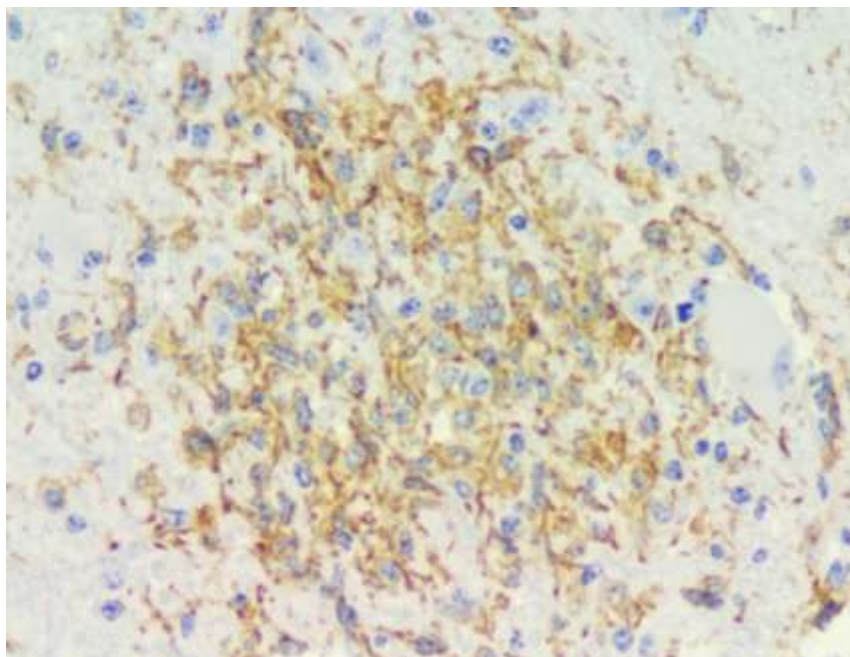


Figura 4. Bovino infectado por BoHV-1, encéfalo (córtex frontal). Há numerosos microglíocitos reativos em foco de gliose. IHQ, Iba-1, 40x.

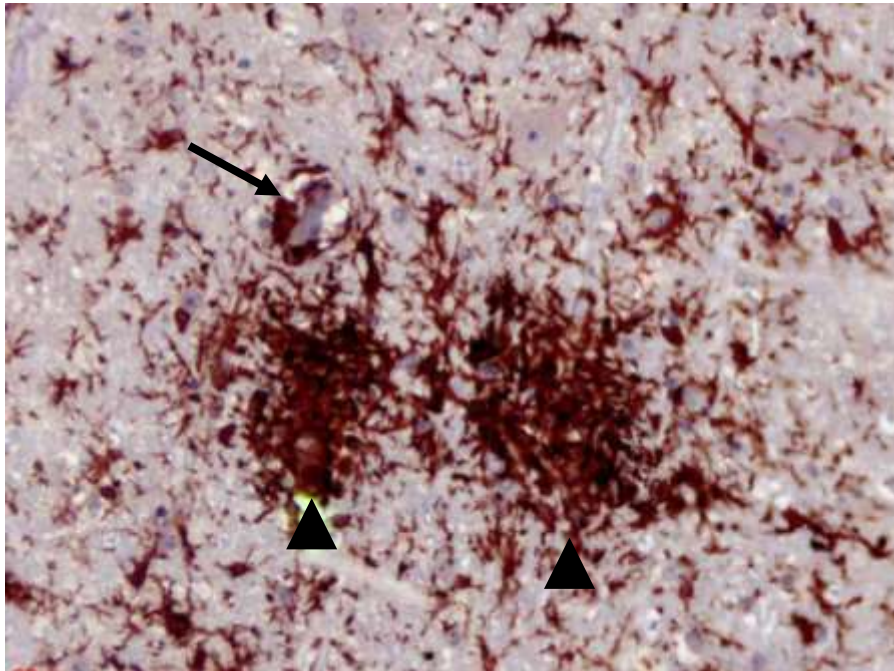


Figura 5. Bovino infectado por BoHV-5, encéfalo (tálamo). Há focos de microgliose e hipertrofia de micróglia (cabeças de seta) e micróglia contornando neurônios necrótico (seta). IHQ, Iba-1, 40x.

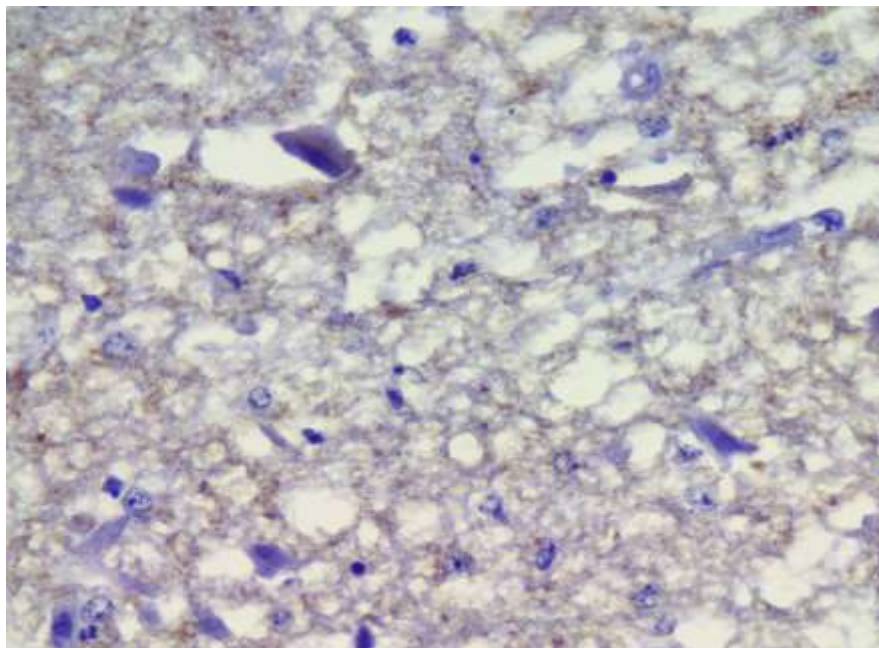


Figura 6. Bovino infectado por BoHV-1, encéfalo (córtex parietal). Área severamente afetada por necrose neuronal e edema, revelando marcação escassa no citoesqueleto de neurônios e seus prolongamentos. IHQ, NF, 40x.

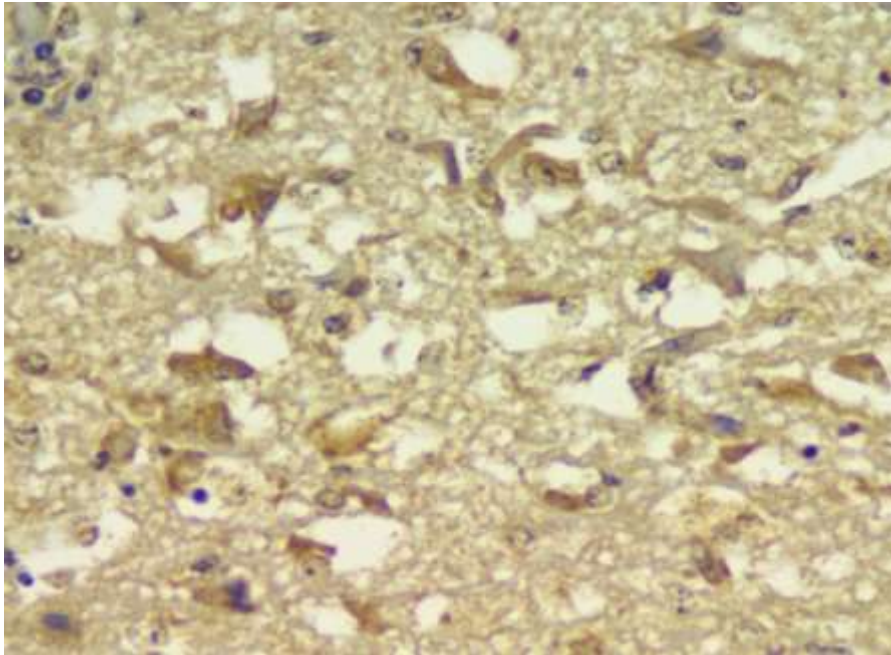


Figura 7. Bovino infectado por BoHV-1, encéfalo (córtex frontal). Área acentuadamente acometida por necrose neuronal, evidenciando-se neurônios necróticos positivos. IHQ, CB, Obj. 40x.

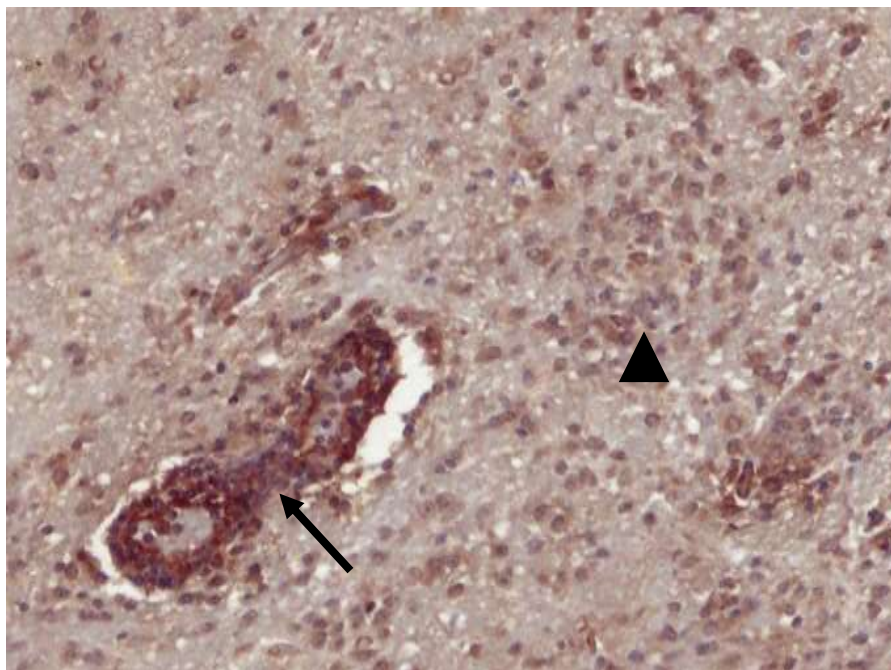


Figura 8. Bovino infectado por BoHV-5, encéfalo (córtex frontal). Há imunomarcção positiva forte no endotélio e fibras elásticas de uma vênula (seta) e nas células gliais em um foco de gliose (ponta de seta) IHQ, CB, 20x.

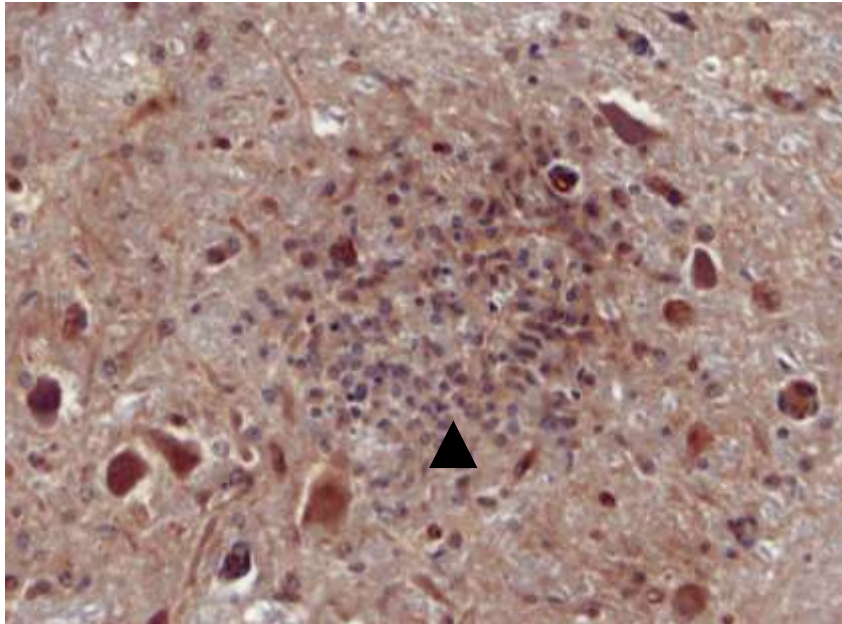


Figura 9. Bovino infectado por BoHV-5, encéfalo (medula oblonga). Nota-se imunomarcção positiva em células gliais (gliose focal) (ponta de seta) e em vários corpos neuronais. IHQ, CB, 20x.