**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de

DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS ASOCIADOS A LA NEUROPATOGÉNESIS
DEL ALFAHERPESVIRUS BOVINO 5 (BoHV5) EN SU HOSPEDADOR
NATURAL**

AUTOR: **RENSETTI**, Daniel Ernesto.

DIRECTOR: **PÉREZ**, Sandra Elizabeth.

CODIRECTOR: **VALERA**, Alejandro.

LUGARES DE TRABAJO: -Laboratorio de Virología - Sanidad Animal y Medicina Preventiva (SAMP), FCV-UNCPBA, Tandil.

-Laboratorio de Virología-INTA Balcarce.

MIEMBROS DEL JURADO:

GALOSI, Cecilia Mónica.

ROMERA, Alejandra Sonia.

DUTRA, Fernando.

AÑO 2020

A mi Familia

AGRADECIMIENTOS

A Sandra y a Pedro, les agradezco eternamente, su amistad y su nobleza. En estos años no solo me acompañaron en mi formación como investigador y como docente, sino también, y lo más importante, en cómo ser una mejor persona.

A Alejandro, por brindarme esta posibilidad, por su acompañamiento y consejos.

A todos los integrantes la cátedra de Virología del SAMP FCV UNCPBA. A Guille, Carolina, Lidia y Pamela.

Al Dr. Odeón, por abrirme las puertas de su laboratorio y más aún, por darme la posibilidad de conocer y trabajar junto a Maia, una persona excelente, a quien le debo gran parte de todo esto.

Al Dr. Marcelo Martí y Dr. Modenutti, Mode, por el ultimo aventón, por estar ahí.

Por sobre todas las cosas, a mi familia, mi fortaleza. A mi esposa, que siempre me alentó a continuar a pesar de todo, a mis hijas, motores de mi vida. Sin el amor, la paciencia y compañía de las 3 nada de esto sería posible.

Seguramente me esté olvidando de muchos, pero sepan que no estar acá, no significa que no los tenga en mis pensamientos.

GRACIAS A TODOS!

**CITAS BIBLIOGRÁFICAS CORRESPONDIENTES A LAS PUBLICACIONES PARCIALES
DEL TRABAJO DE TESIS**

-Rensetti D, Marin M, Quintana S, Morán P, Verna A, Odeón A, Pérez S. Involvement of toll-like receptors 3 and 7/8 in the neuropathogenesis of bovine herpesvirus types 1 and 5. *Res Vet Sci*. 2016. 107:1-7.

-Rensetti D, Marin M, Morán P, Odeón A, Verna A, Pérez S. Bovine herpesvirus type 5 replication and induction of apoptosis in vitro and in the trigeminal ganglion of experimentally-infected cattle. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2018. 57:8-14.

-Marin M, Burucúa M, **Rensetti D**, Rosales J, Odeón A, Pérez S. Distinctive features of bovine alphaherpesvirus types 1 and 5 and the virus-host interactions that might influence clinical outcomes. *Arch Virol*. 2019. 1:17.

-Marin M, Burucúa M, **Rensetti D**, Rosales J, Odeón A, Pérez S. Differential expression of cyclins mRNA in neural tissues of BoHV-1- and BoHV-5-infected cattle. *Microb Pathog*. 2019. 136: 103691.

INDICE

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	XIII
RESUMEN.....	XVIII
SUMMARY	XXII
1-INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA FAMILIA <i>HERPESVIRIDAE</i>	2
1.2. CLASIFICACION Y COMPOSICION DE LA PARTICULA VIRAL.....	3
1.3. ORIGEN Y CLASIFICACION DEL BoHV5.....	8
1.4. PARTICULARIDADES DEL GENOMA	10
1.5. REPLICACIÓN VIRAL.....	13
1.6. EPIDEMIOLOGIA	19
1.7. PATOGENIA.....	23
1.7.1. ENTRADA Y DISEMINACIÓN VIRAL.....	23
1.7.2. INFECCIÓN PRIMARIA, LATENCIA Y REACTIVACIÓN VIRAL.....	26
1.7.3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LOS CUADROS NEUROLÓGICOS	39
1.8. ....INMUNIDAD INNATA - ROL DE LOS RECEPTORES TIPO TOLL EN LA RESPUESTA A LA INFECCION POR ALFAHERPESVIRUS	41
1.9.ROL DE LOS COMPONENTES DEL CICLO CELULAR EN LAS INFECCIONES POR ALFAHERPESVIRUS.....	47
1.10.LA APOPTOSIS EN LAS INFECCIONES POR ALFAHERPESVIRUS.....	49
HIPÓTESIS	54
OBJETIVO GENERAL.....	55
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
2-MATERIALES Y MÉTODOS	57
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	58
PROCEDIMIENTOS GENERALES	58
2.1. CULTIVOS CELULARES.....	58
2.2. VIRUS	59
2.3. PREPARACIÓN DE LOS INÓCULOS VIRALES	60

2.4. INOCULACIÓN EXPERIMENTAL DE TERNEROS CON BoHV1 Y BoHV5	60
2.5. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS Y AISLAMIENTO VIRAL A PARTIR DE SECRECIONES NASALES Y OCULARES	63
2.6. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO NERVIOSO	64
2.7. AISLAMIENTO VIRAL A PARTIR DE MUESTRAS DE TEJIDO	66
2.8. IDENTIFICACIÓN VIRAL MEDIANTE IFD	67
2.9. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	68
2.10. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ARN	69
2.11. TRATAMIENTO DEL ARN CON DNAsa I	70
2.12. RETROTRANSCRIPCIÓN	71
2.13. HISTOLOGÍA	71
2.14. INMUNOHISTOQUÍMICA	72
2.15. ESTUDIOS ESPECÍFICOS	73
2.15.1. PCR EN TIEMPO REAL CON HIGH RESOLUTION MELTING (HRM) PARA EL ANÁLISIS DE DISTRIBUCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN VIRAL EN TEJIDO NERVIOSO BOVINO.	74
2.15.2. RT-PCR EN TIEMPO REAL PARA EL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS TLR EN EL SISTEMA NERVIOSO BOVINO	75
2.15.3. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES VIRALES EN MUESTRAS DE GANGLIO TRIGÉMINO Y SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	78
2.15.4. DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE LINFOCITOS T CD8 ⁺ EN SNC Y GT	81
2.15.5. EXPRESIÓN DE LOS COMPONENTES DEL CICLO CELULAR DURANTE LA INFECCIÓN POR BoHV1 y BoHV5	82
2.15.6. EXPRESIÓN DE PERFORINA Y ENZIMAS CITOLÍTICAS (GRANZIMAS A Y B)	83
2.15.7. EVALUACIÓN DE LA APOPTOSIS <i>IN VITRO</i>	84
2.16. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	90
3-RESULTADOS	91
3.1. MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y AISLAMIENTO VIRAL EN SECRECIONES NASALES Y OCULARES EN LOS TERNEROS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON BoHV1 Y BoHV5	92
3.2. ANÁLISIS SEROLÓGICO DE LOS ANIMALES INOCULADOS	97

3.3. PRESENCIA DE LESIONES MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS EN TERNEROS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON BoHV1 Y BoHV5.	98
3.4. AISLAMIENTO VIRAL A PARTIR DE MUESTRAS DE SISTEMA NERVIOSO	104
3.5. DISTRIBUCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ADN DE BoHV1 Y BoHV5 EN TEJIDO NERVIOSO POR PCR EN TIEMPO REAL-HRM	107
3.6. EXPRESIÓN DE GENES VIRALES EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y GANGLIO TRIGÉMINO	109
3.7. EXPRESIÓN DE TLR EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE TERNEROS DURANTE LA INFECCIÓN AGUDA POR BoHV1 Y BoHV5	112
3.8. EXPRESIÓN DE TLR EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE TERNEROS DURANTE LA LATENCIA Y POSTERIOR REACTIVACION DE BoHV1 Y BoHV5	115
3.9. EVALUACION DE LA APOPTOSIS EN CULTIVOS CELULARES Y TEJIDO NERVIOSO INFECTADOS CON BoHV1 Y BoHV5	118
3.9.1. CAMBIOS MORFOLÓGICOS NUCLEARES EN CULTIVOS CELULARES INFECTADOS CON BoHV1 Y BoHV5	119
3.9.2. REPLICACIÓN DE LAS DISTINTAS CEPAS DE ALFAHERPESVIRUS BOVINO EN LAS LÍNEAS CELULARES UTILIZADAS PARA EVALUAR APOPTOSIS	125
3.9.3. DETECCIÓN DE CÉLULAS APOPTÓTICAS MEDIANTE ENSAYO TUNEL	128
3.9.4. DETERMINACIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA	130
3.9.5. APOPTOSIS NEURONAL EN EL GANGLIO TRIGÉMINO Y SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE TERNEROS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON BoHV1 Y BoHV5	132
3.10. EXPRESIÓN DE CICLINAS EN TEJIDO NERVIOSO DE BOVINOS INFECTADOS CON BoHV1 Y BoHV5	134
3.11. DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE LINFOCITOS T CD8 ⁺ EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y GANGLIO TRIGÉMINO	139
3.12. EXPRESIÓN DE PERFORINA Y ENZIMAS CITOLÍTICAS (GRANZIMAS A Y B) EN TEJIDO NERVIOSO DURANTE LA INFECCIÓN POR BoHV1 Y BoHV5	141
4-DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	145
5-BIBLIOGRAFIA.....	188
ANEXO	242

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1 Morfología del herpesvirus.....	4
FIGURA 1.2 Esquema del patrón de restricción BstEII de diferentes subtipos de BoHV5.....	10
FIGURA 1.3 Representación esquemática del genoma de BoHV5.....	11
FIGURA 1.4 Ciclo de replicación de HSV.....	15
FIGURA 1.5 Diagrama representando la transcripción, traducción y replicación de un herpesvirus típico.....	17
FIGURA 1.6 Etapas de la infección por el herpes simplex virus.....	29
FIGURA 1.7 Etapas potenciales que ocurren durante el escape de latencia inducido por DXM	36
FIGURA 1.8 Ubicación y vías de señalización de los receptores tipo Toll.....	44
FIGURA 1.9 Vías de señalización de la apoptosis.....	52
FIGURA 2.1 Secciones y bloques del SNC.....	65
FIGURA 2.2: Localización de las submuestras del SNC.....	66
FIGURA 3.1.A: Presentación de secreciones nasales y oculares (infección aguda).....	93
FIGURA 3.1.B: Presentación de secreciones nasales y oculares (infección latente)	94
FIGURA 3.1.C: Presentación de secreciones nasales y oculares (reactivación)	94
FIGURA 3.2.A: Títulos de BoHV1 y BoHV5 en secreciones nasales y oculares (infección aguda)	95
FIGURA 3.2.B: Títulos de BoHV1 y BoHV5 en secreciones nasales y oculares (infección latente)	96
FIGURA 3.2.C: Títulos de BoHV1 y BoHV5 en secreciones nasales y oculares (reactivación)	96

FIGURA 3.3.A: Observación macroscópica de cerebros de los animales del grupo control	99
FIGURA 3.3.B: Observación macroscópica de los cerebros de los animales con infección aguda	100
FIGURA 3.3.C: Observación macroscópica de los cerebros de animales con infección latente	101
FIGURA 3.3.D: Observación macroscópica de los cerebros de animales luego de la reactivación	102
FIGURA 3.4: Lesiones microscópicas en tejido neural de terneros infectados con BoHV1 y BoHV5	104
FIGURA 3.5.A: Títulos de BoHV1 y BoHV5 en el cerebro y el GT de terneros inoculados experimentalmente con un inóculo de dosis alta.....	105
FIGURA 3.5.B: Ausencia de virus infeccioso en el cerebro y el ganglio trigémino de terneros inoculados experimentalmente con un inóculo de dosis baja de BoHV1 y BoHV5 (latencia).....	106
FIGURA 3.5.C: Títulos de BoHV1 y BoHV5 en el cerebro y el GT de terneros inoculados experimentalmente luego de la reactivación.....	107
FIGURA 3.6: Expresión relativa de ARNm de TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 en tejido nervioso de bovinos infectados de forma aguda con BoHV1 y BoHV5.....	115
FIGURA 3.7: Expresión relativa de ARNm de TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 en tejido nervioso de bovinos infectados con BoHV1 y BoHV5 luego de 48 h de inducir la reactivación con DXM.....	118
FIGURA 3.8: Imágenes representativas de cambios nucleares en células MDBK teñidas con DAPI.....	120
FIGURA 3.9: Porcentaje de células con cambios nucleares.....	122
FIGURA 3.10: Imágenes representativas de células MDBK TUNEL positivas.....	129
FIGURA 3.11: Fragmentación del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%	131
FIGURA 3.12: Detección de caspasa 3 escindida en GT de bovinos infectados experimentalmente.....	133

FIGURA 3.13: Detección de caspasa 3 escindida en cerebro de bovinos infectados experimentalmente.....	134
FIGURA 3.14: Expresión relativa de ciclinas A2, E1 y B1 en ganglio trigémino de terneros infectados con BoHV1 y BoHV5.....	136
FIGURA 3.15: Imágenes representativas de la detección inmunohistoquímica de linfocitos CD8 ⁺ en tejido nervioso de terneros infectados experimentalmente con BoHV1 y BoHV5.....	140

INDICE DE TABLAS

TABLA 2.1: Cebadores y sondas utilizados para la detección del ARNm de los TLR mediante Real Time RT-PCR.....	76
TABLA 2.2: Cebadores utilizados para la detección del ARNm de los genes virales de cinética inmediata temprana, temprana y tardía en tejido nervioso de bovinos infectados con BoHV1 y BoHV5 mediante RT-PCR.....	79
TABLA 2.3: Cebadores utilizados para determinar la cuantificación relativa de ARNm de las ciclinas A2, B1 y E2 en tejido nervioso de bovinos infectados con BoHV1 y BoHV5 mediante Real time RT-PCR.....	83
TABLA 2.4: Cebadores utilizados para determinar la expresión de granzimas A y B y perforina en tejido nervioso de bovinos infectados con BoHV1 y BoHV5 mediante RT-PCR.	84
TABLA 3.1: Rango en el título de anticuerpos neutralizantes en las distintas etapas de la infección de terneros inoculados con BoHV1 y BoHV5 y sin infectar.....	98
TABLA 3.2: Aislamiento viral y análisis por PCR en Tiempo Real-HRM en muestras de tejido nervioso de bovinos en los distintos estadios de la infección por BoHV1 y BoHV5.....	109
TABLA 3.3: Análisis por RT-PCR de la expresión de genes virales representativos de la cinética inmediata temprana en diferentes sectores del sistema nervioso y en los distintos estadios de la infección.....	110
TABLA 3.4: Análisis por RT-PCR de la expresión de genes virales representativos de la cinética temprana en diferentes sectores del sistema nervioso y en los distintos estadios de la infección.....	111
TABLA 3.5: Análisis por RT-PCR de la expresión de genes virales representativos de la cinética tardía en diferentes sectores del sistema nervioso y en los distintos estadios de la infección.....	112

TABLA 3.6: Niveles de expresión del ARNm de los TLR 3, 7, 8 y 9 en secciones de tejido nervioso bovino durante la infección aguda por BoHV1 y BoHV5 y animales no infectados	114
TABLA 3.7: Niveles de expresión de ARNm de los TLR en secciones de tejido nervioso de bovinos latentemente infectados con BoHV1 y BoHV5 y animales control.....	116
TABLA 3.8: Niveles de expresión relativa de ARNm de los TLR en secciones de tejido neural de animales latentemente infectados con BoHV1 y BoHV5 y en animales control (C) luego de la reactivación inducida por DXM.....	117
TABLA 3.9: Porcentaje de células con cambios morfológicos nucleares a las 6 y 24 horas después de la inoculación viral o del tratamiento.....	124
TABLA 3.10: Porcentajes de células con cambios nucleares y títulos de las cepas de BoHV1 y BoHV5 en diferentes cultivos celulares a las 6 y 24 horas después de la inoculación.....	127
TABLA 3.11: Expresión relativa de las ciclinas bovinas A2, E1 y B1 en el SNC de bovinos infectados con BoHV y BoHV5.....	138
TABLA 3.12: Expresión de ARNm de perforina en tejido nervioso bovino durante la infección aguda, latencia y reactivación del BoHV1 y BoHV5.....	142
TABLA 3.13: Expresión de granzima A en tejido nervioso bovino durante la infección aguda, latencia y reactivación del BoHV1 y BoHV5.....	143
TABLA 3.14: Expresión de granzima B en tejido nervioso bovino durante la infección aguda, latencia y reactivación del BoHV1 y BoHV5.....	144

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

BoHV5: alfaherpesvirus bovino 5

ADN: ácido desoxiribonucleico

kb: kilo base

nm: nanómetro

dUTPasa: desoxiuridina 5' trifosfato nucleótido hidrolasa

HHV1: alfaherpesvirus humano 1

ICTV: Comité Internacional de Taxonomía Viral

HSV1: herpes simplex virus 1

HHV3: alfaherpesvirus humano 3

VZV: varicela zoster virus

EHV4: alfaherpesvirus equino 4

BoHV2: alfaherpesvirus bovino 2

BoHV1: alfaherpesvirus bovino 1

BEHV: herpesvirus de la encefalitis bovina

SHV1: alfaherpesvirus de suidos 1

PRV: virus de la pseudorabia porcina

IBR: rinotraqueítis infecciosa bovina (*infectious bovine rhinotracheitis*)

VNO: virus del Nilo Occidental

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

VIS: virus de la inmunodeficiencia de los simios

PBLs: leucocitos de sangre periférica (*peripheral blood leukocytes*)

UL: fragmento largo único (*unique long fragment*)

US: fragmento corto único (*unique short fragment*)

IR: repeticiones internas (*internal repeats*)

TR: repeticiones terminales (*terminal repeats*)

pb: pares de bases

gB, gC, gD, etc: glicoproteína B, C, D, etc

IE: genes de activación inmediata temprana (*immediate early genes*)

HveC: receptor 1 de nectina

PVR o CD155: receptor humano para el poliovirus

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

TGN: red trans-Golgi (*trans Golgi network*)

MVB: cuerpos multivesiculares (*multi-vesicular bodies*)

EE: endosomas tempranos (*early endosomes*)

vhs: proteína inhibidora de la síntesis proteica celular (*virion host shut off*)

pi: post-infección

hpi: horas post infección

GT: ganglio trigémino

SNC: sistema nervioso central

SNP: sistema nervioso periférico

LR: gen relacionado a la latencia (*latency-related gene*)

ORF: Marco abierto de lectura (*open reading frame*)

ARN α : ARNm inmediato temprano

ARN β : ARNm temprano

ARN γ : ARNm tardío

DXM: dexametasona

GR: receptor de glucocorticoides (*glucocorticoid receptor*)

MR: receptor de mineralocorticoides (*mineralocorticoid receptor*)

GRE: elementos de respuesta de glucocorticoides (*glucocorticoid response elements*)

AP-1: activador de transcripción (activator protein) 1

NF- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

VP: proteína del tegumento viral

TLR: receptor tipo toll (*toll-like receptor*)

PAMPs: patrones moleculares asociados a los patógenos

DAMPs: patrones moleculares asociados al peligro

TIR: receptor Toll/IL-1

IL: interleuquina

GU: guanina-uracilo

CpG: islas CpG ricas en citosina-guanina

IFN: interferón

NK: natural killer

cdk: quinasas dependientes de ciclinas

MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos

TNF: factor de necrosis tumoral

FasL: ligando de Fas

PARP: poli ADP ribosa polimerasa

MMP: potencial de membrana mitocondrial

Apaf-1: proteasa activadora de apoptosis 1 (*apoptosis protease-activating factor-1*).

Cyt-c: citocromo C

MDBK: células Madin-Darby de riñón bovino

MEM: medio esencial mínimo

SFB: suero fetal bovino

BoTur: células de turbinados bovinos

HeLa: células de carcinoma cervical humano

μl: microlitro

dpi: días post-infección

PV: peso vivo

min: minutos

seg: segundos

pm: picomolar

CO₂: dióxido de carbono

DICC₅₀/ml: dosis infectiva cultivo celular 50 por mililitro

ECP: efecto citopático

IFD: inmunofluorescencia directa

DNAsa: desoxirribonucleasa

ADNc: ADN complementario

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

moi: multiplicidad de infección

DON: deoxinivalenol

DMSO: dimetilsulfóxido

NaCl: cloruro de sodio

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol

DTT: deoxinucleotidil transferasa terminal

IEtu1: unidad de transcripción inmediata temprana 1 (*immediate-early transcription unit 1*)

TBS: buffer salino TRIS (Tris buffered saline)

HRM: análisis de alta resolución de fusión (*high resolution melting*)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*polimerase chain reaction*)

TK: timidina kinasa

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción

MgCl₂: cloruro de magnesio

dNTPs: dinucleótidos trifosfato

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

PAR-1: receptor activado por proteasas 1

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS ASOCIADOS A LA NEUROPATOGÉNESIS DEL HERPESVIRUS BOVINO 5 (BoHV5) EN SU HOSPEDADOR NATURAL

Palabras clave: BoHV5, neuropatogénesis, TLR, ciclinas, apoptosis.

RESUMEN

El alfa herpesvirus bovino 5 (BoHV5) es el agente etiológico de la meningoencefalitis no supurativa en terneros, causal de brotes fatales frecuentes en Argentina y Brasil y cuya patogenia aún no ha sido completamente esclarecida. Este virus está estrechamente relacionado con el alfa herpesvirus bovino 1 (BoHV1), el cual causa enfermedades respiratorias, abortos, trastornos genitales y, ocasionalmente, encefalitis en el ganado. Aunque ambos virus son neurotrópicos y comparten propiedades biológicas similares, se desconoce el motivo por el cual estos BoHV difieren en su capacidad para causar enfermedades neurológicas. Con el objeto de estudiar diversos aspectos de la neuropatogénesis del BoHV5 y comparar los hallazgos con BoHV1, se obtuvieron muestras de tejido neural de terneros inoculados intranasalmente con BoHV1 y BoHV5 durante la infección aguda, la latencia y la reactivación. Se determinó la distribución del genoma de ambos virus en sistema nervioso observándose que en la infección aguda, la

distribución de BoHV1 es más amplia que la de BoHV5, mientras que durante la latencia y reactivación sólo el genoma de BoHV5 está presente en este tejido. También se analizó la expresión de genes virales representativos de la cinética inmediata temprana (IE), temprana (E) y tardía (L) en los distintos estadios de infección. No se detectó expresión génica viral en tejido nervioso durante la infección aguda de terneros infectados con BoHV1 o BoHV5. En terneros latentemente infectados con BoHV5 se detectó la expresión del gen TK en todos los sectores del sistema nervioso central evaluados y se detectaron genes L en la corteza cerebral y en ganglio trigémino (GT) durante la latencia de BoHV5 y BoHV1, respectivamente, lo cual permite asumir que en este estadio existe cierto nivel de expresión de genes IE que iniciarían la cascada de expresión génica. Durante la etapa de reactivación no se detectó la expresión de genes IE o E en tejido nervioso de bovinos infectados. En esta etapa se detectó la expresión de genes L, gD de BoHV1 y gB de BoHV5. Esto sugiere que la expresión de genes L es un evento clave para que se logre la infección productiva en esta etapa. Por otro lado se evaluaron las variaciones en los niveles de expresión de los receptores tipo toll (TLR) en diferentes regiones del SNC bovino. En general, los resultados de este estudio demostraron que la infección del sistema nervioso por los BoHV estimuló

la expresión de los TLR3, TLR7 y TLR8 y no modificó significativamente la expresión de TLR9, y fue posible determinar que la magnitud en la variación de la expresión de los TLR se correlaciona con las manifestaciones clínicas que se pueden observar en cada etapa del ciclo infeccioso de los BoHV. Por otro lado, se analizaron los niveles de expresión de ARNm de ciclinas mediante qRT-PCR, observandose que existen diferencias notables en la modulación de la expresión de ciclinas por BoHV1 y BoHV5, particularmente en GT, el sitio principal de latencia de los alfa herpesvirus. En este trabajo se evaluó la presencia de linfocitos CD8⁺ citotóxicos mediante inmunohistoquímica y se determinó la expresión de perforina y granzimas en el tejido nervioso. No se detectó una presencia abundante de linfocitos T CD8⁺. Estos fueron más evidentes durante la infección aguda por BoHV1 y menos evidentes en el GT de los bovinos infectados con BoHV5. Del mismo modo, la ausencia de expresión de perforina y granzimas durante la infección aguda facilitaría la diseminación viral en el tejido nervioso. Durante la latencia de BoHV5, fue posible determinar la expresión de granzima B, lo cual sugiere que antígenos virales mantendrían activos a los linfocitos citotóxicos durante esta etapa. Por último, se analizó la capacidad de BoHV5 para inducir apoptosis en cultivos celulares y en tejido nervioso. Pudiéndose observar

que BoHV1 tendría más capacidad para inducir apoptosis *in vitro* e *in vivo*. Los cambios apoptóticos se corresponden con la capacidad de replicación de las cepas de BoHV1 y BoHV5.

En este estudio se demostró que la reactivación molecular espontánea puede ser un evento frecuente en las infecciones por ambos alfa herpesvirus. Se detectó una regulación positiva significativa de todos los TLR después de la infección primaria de los tejidos neurales por ambos BoHV, a excepción de TLR9 que no demostró variaciones significativas. Las diferencias notables en los niveles de ARNm de TLR durante la infección aguda y la reactivación proporcionan evidencia de que la respuesta inmune innata puede estar involucrada en los resultados clínicos observados en cada etapa. Se observaron también, diferencias marcadas entre la inducción *in vitro* de apoptosis por las cepas BoHV1 Cooper y BoHV5 97/613. Se demostró una asociación entre la magnitud de la replicación de los BoHV y la inducción de apoptosis en el GT. Por otro lado se demostró por primera vez la modulación de BoHV5 sobre la expresión de ciclinas en los tejidos neurales de su hospedador natural. Estos hallazgos sugieren que la inducción de apoptosis y la respuesta inmune innata orquestan el resultado final de la infección por alfa herpesvirus del sistema nervioso bovino.

STUDY OF THE MECHANISMS ASSOCIATED WITH BOVINE ALPHAHERPESVIRUS 5 (BoHV5) NEUROPATHOGENESIS IN ITS NATURAL HOSPEDATOR

Keywords: BoHV5, neuropathogenesis, TLR, cyclin, apoptosis

SUMMARY

Bovine alphaherpesvirus 5 (BoHV5) is the etiological agent of non-suppurative meningoencephalitis in calves, the cause of frequent fatal outbreaks in Argentina and Brazil. BoHV5 pathogenesis of which has not been fully elucidated yet. This virus is closely related to bovine alphaherpesvirus 1 (BoHV1), which causes respiratory diseases, abortions, genital disorders, and occasionally encephalitis in cattle. Although both viruses are neurotropic and share similar biological properties, the reason why these alphaherpesviruses differ in their ability to cause neurological disease is unknown. In order to study various aspects of BoHV5 neuropathogenesis and to compare the findings with BoHV1 infection, neural tissue samples were obtained from calves intranasally inoculated with BoHV1 and BoHV5 during acute infection, latency, and reactivation. The distribution of the genome of both viruses in the nervous system was determined, observing that during acute infection, the distribution of BoHV1 is broader than

that of BoHV5, while during latency and reactivation only the BoHV5 genome is present in this tissue. The expression of viral genes representative of the immediate-early (IE), early (E) and late (L) kinetics in the different stages of infection was also analyzed. No viral gene expression was detected in nervous tissue during acute primary infection of calves infected with BoHV1 or BoHV5. In calves latently infected with BoHV5, the expression of the TK gene was detected in all the sectors of the central nervous system evaluated and L genes were detected in the cerebral cortex and in the trigeminal ganglion (TG) during the latency of BoHV5 and BoHV1, respectively, which allows us to assume that at this stage there is a certain level of expression of IE genes that would initiate the gene expression cascade. During the reactivation stage, the expression of IE or E genes was not detected in nervous tissue of infected cattle. At this stage, the expression of L genes, BoHV1 gD and BoHV5 gB was detected. This suggests that L gene expression is a key event for productive infection to be achieved at this stage. On the other hand, variations in the levels of expression of toll-like receptors (TLR) in different regions of the bovine CNS were evaluated. In general, the results of this study demonstrated that infection of the nervous system by BoHV stimulated the expression of TLR3, TLR7, and TLR8 and did not significantly modify the expression

of TLR9. It was possible to determine that the magnitude in the variation of TLR expression is correlated with the clinical manifestations that can be observed at each stage of the infectious cycle of BoHV. The expression levels of cyclins mRNA were analyzed using qRT-PCR, observing that there are notable differences in the modulation of cyclin expression by BoHV1 and BoHV5, particularly in the TG, the main latency site of alphaherpesviruses. In this work, the presence of cytotoxic CD8⁺ lymphocytes was evaluated by immunohistochemistry and the expression of perforin and granzymes in nervous tissue was determined. An abundant presence of CD8⁺ T lymphocytes was not detected. These cells were more evident during acute BoHV1 infection and less evident in the TG of BoHV5- infected cattle. Similarly, the absence of perforin and granzyme expression during acute infection would facilitate viral spread in nervous tissue. During BoHV5 latency, it was possible to determine the expression of granzyme B, which suggests that viral antigens would keep cytotoxic lymphocytes active during this stage. Finally, the ability of BoHV5 to induce apoptosis in cell cultures and in nervous tissue was analyzed. It was evident that BoHV1 would have more capacity to induce apoptosis *in vitro* and *in vivo*. The apoptotic changes are in agreement with the level of replication of BoHV1 and BoHV5 strains.

This study demonstrated that spontaneous molecular reactivation can be a frequent event in infections by both BoHV. A significant positive regulation of all TLR was also detected after primary infection of neural tissues by both viruses, except for TLR 9 who did not show significant variations. The notable differences in the TLR mRNA levels during acute infection and reactivation provide evidence that the innate immune response may be involved in the clinical outcomes observed at each stage. The remarkable differences in TLR mRNA levels during acute infection and reactivation provide evidence that the innate immune response may be involved in the clinical outcomes observed at each stage. Marked differences were also observed between in vitro induction of apoptosis by the BoHV1 Cooper and BoHV5 97/613 strains. An association between the magnitude of BoHV replication and the induction of apoptosis in the TG was demonstrated. On the other hand, the modulation of BoHV5 on the expression of cyclins in the neural tissues of its natural host was demonstrated for the first time. These findings suggest that the induction of apoptosis and the innate immune response orchestrate the final outcome of alphaherpesviruses infection of the bovine nervous system.

1-INTRODUCCIÓN

1.1. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA FAMILIA *HERPESVIRIDAE*

El alfaherpesvirus bovino 5 (BoHV5) es un virus perteneciente al orden *Herpesvirales*, familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alfaherpesvirinae* y género *Varicellovirus*. Es responsable de cuadros de meningoencefalitis no supurativa altamente prevalentes en nuestro país y en el sur y centro de Brasil (Carrillo y col., 1983; Magyar y col., 1993; Horiuchi y col., 1995; Schwyzer y Ackermann, 1996; Silva y col., 1999).

Virtualmente cada especie de vertebrado estudiada hasta el momento sustenta al menos un virus de esta familia y están adaptados de forma eficiente a cada hospedador natural causando usualmente infecciones asintomáticas, excepto en animales jóvenes, en individuos inmunosuprimidos o cuando infectan especies diferentes al hospedador natural. Esto implica que los herpesvirus han co-evolucionado con las especies vertebradas durante milenios, dando lugar a la estrecha adaptación observada (Davison, 2002).

1.2. CLASIFICACION Y COMPOSICION DE LA PARTICULA VIRAL

La inclusión de un virus en la familia *Herpesviridae* se basa en la arquitectura del virión. El mismo consta de un *core* que posee ADN lineal de doble cadena de aproximadamente 140 kilobases (kb). El genoma está rodeado por una nucleocápside icosaédrica de aproximadamente 100-125 nm de diámetro compuesta por 162 capsómeros (150 hexámeros y 12 pentámeros) que representan subunidades parcialmente huecas (Figura 1.1). Alrededor de la nucleocápside se presenta el tegumento, una capa fibrosa y asimétrica, compuesta de glicoproteínas, lipoproteínas y proteínas con acción enzimática, que son liberadas al citoplasma de la célula huésped cuando se produce la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática. En general, estas proteínas se encargan de tomar el control de la maquinaria molecular de la célula. Por último, poseen una envoltura compuesta por una membrana lipoproteica doble en la cual se insertan las glicoproteínas virales (Flores, 1996; Roizman y Pellet, 2007).

Figura 1.1: Morfología del herpesvirus. (Izquierda) Reconstrucción de la cápside del herpesvirus humano 1 (HHV1) generada por imágenes de un microscopio de crio-electrón, visto a lo largo de los dos ejes. En azul se observan las hexonas, en rojo las pentonas, y en verde los tripletes. (Derecha) Representación esquemática de un virión con diámetros en nm. (G) Genoma, (C) Cápside, (T) Tegumento, (E) Envoltura. (Fenner 2011).

Los virus incluidos en la familia *Herpesviridae* comparten varias propiedades biológicas:

1- El genoma codifica un gran número de enzimas involucradas en el metabolismo de los ácidos nucleicos (timidina quinasa, timidilato sintetasa, dUTPasa, ribonucleótido reductasa), en la síntesis de ADN (ADN polimerasa, helicasa, primasa) y en el procesamiento de proteínas (proteínas quinasas).

2- La síntesis del ADN y el ensamblado de la cápside ocurren en el núcleo.

3- La producción de la progenie viral está siempre acompañada por la destrucción de la célula infectada.

4- La capacidad de establecer un estado de latencia en su hospedador natural.

En las células que contienen virus latente, el genoma viral se encuentra circularizado (episoma) y sólo se expresan unos pocos genes virales. Los genomas latentes conservan la capacidad de replicarse y causar enfermedad en el momento de la reactivación. Las infecciones latentes en hospedadores clínicamente normales proporcionan un reservorio para la transmisión del virus (Roizman y col., 1991).

Los miembros de la familia *Herpesviridae* se clasifican en tres subfamilias (*Alfaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gammaherpesvirinae*) basándose en las propiedades biológicas de los miembros conocidos hasta el momento (Roizman y col., 1973, 1979). Asimismo, utilizando datos de homología de las secuencias de ADN, de la similitud en la organización genómica y de estudios de proteínas virales mediante ensayos inmunológicos, dichos virus se clasifican en diversos géneros. Las principales características de cada subfamilia y los géneros que la integran de

acuerdo al Comité Internacional de Taxonomía Viral (*International Committee on the Taxonomy of Viruses*, ICTV), son los siguientes:

- Subfamilia *Alfaherpesvirinae*: los miembros de esta subfamilia se caracterizan por tener un rango variable de hospedadores, un ciclo de replicación corto, una rápida diseminación en cultivo de tejidos, una alta eficiencia en la destrucción de las células infectadas (Rock, 1993; Fenner y col., 1993; Denis y col., 1994) y la capacidad de infectar células nerviosas y establecer latencia en ganglios sensoriales (Denis y col., 1994; Engels y Ackermann, 1996). Esta subfamilia contiene los géneros *Simplexvirus*, *Varicellovirus*, *Mardivirus*, *Iltoavirus* y *Scutavirus*.
- Subfamilia *Betaherpesvirinae*: posee un rango restringido de hospedadores. El ciclo viral es largo y el progreso de la infección en cultivo celular es lento. El virus puede mantenerse en estado de latencia en glándulas secretoras, células linforeticulares, riñones y otros tejidos. Esta subfamilia está compuesta por los géneros *Citomegalovirus*, *Muromegalovirus*, *Proboscivirus* y *Roseolovirus*.
- Subfamilia *Gammaherpesvirinae*: el rango de hospedadores de los miembros de esta subfamilia está limitado a la familia u orden a la cual

pertenece el hospedador natural. *In vitro*, todos los miembros replican en células linfoblásticas y algunos también causan infecciones líticas en células epiteliales y fibroblásticas. Los virus de esta subfamilia son usualmente específicos de linfocitos T y B y se ha demostrado la presencia de virus latente en tejidos linfoides. Esta subfamilia contiene los géneros *Linfocriptovirus*, *Rhadinovirus*, *Macavirus* y *Percavirus*.

Los alfa herpesvirus constituyen la mayor subfamilia y contienen diferentes patógenos relacionados a los humanos y los animales. Los conocimientos existentes sobre los mismos provienen en su mayoría de estudios realizados con el alfa herpesvirus humano 1 (HHV1), también conocido como herpes simplex virus 1 (HSV1), virus prototipo de los alfa herpesvirus. Otros alfa herpesvirus de importancia clínica son, entre otros, el alfa herpesvirus humano 3 (HHV3, varicela zoster virus [VZV]), el alfa herpesvirus de los suidos 1 (SHV1) o virus de la pseudorabia porcina (PRV), el alfa herpesvirus equino 4 (EHV4) o virus de la rinoneumonitis equina (Rock, 1993; Flores, 1996), el alfa herpesvirus bovino 2 (BoHV2) o virus de la mamilitis bovina (Mohanty y Dutta, 1988) y el alfa herpesvirus bovino 1 (BoHV1), que es el alfa herpesvirus más estudiado de los bovinos (Flores, 1996).

1.3. ORIGEN Y CLASIFICACION DEL BoHV5

El BoHV1 y BoHV5 son dos alfa herpesvirus estrechamente relacionados que infectan el ganado. El primer caso de meningoencefalitis bovina asociada con una infección por herpesvirus fue reportado en Australia por Johnston y col., en el año 1962. Basándose en la morfología del virión, efecto citopático en cultivo celular y propiedades antigénicas, el virus aislado fue considerado una variante neuropatogénica de BoHV1. Mediante el análisis del genoma viral y su asociación con las distintas manifestaciones clínicas, las cepas de BoHV antigénicamente relacionadas, años atrás fueron clasificadas en distintos tipos y subtipos: BoHV1 subtipo 1 (o virus de IBR): causante de enfermedad respiratoria y abortos; BoHV1 subtipo 2 (que se subdividió a su vez en BoHV1-2a, responsable de enfermedad genital y abortos y BoHV1-2b causante de enfermedad genital) (Horiuchi y col., 1995; Schwyzer y Ackermann, 1996). Estudios comparativos de este agente con diferentes cepas de BoHV1 basados en mapeos de sitios de restricción del ADN viral (Brake y Studdert, 1985), pruebas de neutralización cruzada (Bagust y Clark, 1972; Metzler y col., 1986) y reactividad contra anticuerpos monoclonales (Metzler y col., 1986) indicaron que estas cepas de virus diferían en sus propiedades genómicas y antigénicas. Así, el anteriormente nombrado

Herpesvirus de la Encefalitis Bovina (BEHV) (Studdert, 1989) o BoHV1 subtipo 3 (Metzler y col., 1986) fue reconocido como una especie de virus distinta por el Comité Internacional sobre Taxonomía de Virus en 1992 (Roizman y col., 1992) y re-clasificado como BoHV5.

Las cepas de BoHV5 se clasifican en tres subtipos basándose en el análisis del ADN viral mediante el empleo de endonucleasas de restricción. Las cepas prototipo, para los subtipos *a*, *b* y *no-a-no-b*, son las cepas australiana N569, la cepa argentina A663 y algunos aislamientos brasileros (D'Arce y col., 2002), respectivamente (Figura 1.2). Recientemente, se determinó que la cepa A663 es un recombinante natural entre BoHV1 y 5 (Maidana y col., 2017).

Figura 1.2: Esquema del patrón de restricción BstEII de diferentes subtipos de BoHV5 que muestran los subtipos a, b, non-a-non-b. M: Marcador de peso molecular (Imagen extraída de Del Médico y col. 2009)

1.4. PARTICULARIDADES DEL GENOMA

El BoHV1 y BoHV5 tienen una disposición de genoma de tipo "D", que consiste en un fragmento largo único (UL) y un fragmento corto único (US) flanqueados por secuencias de repetición (repeticiones internas y terminales, IR e TR, respectivamente) (Roizman y Pellet, 2007). El ADN del virión incluye cantidades equimolares de moléculas de ADN que difieren en la orientación del fragmento US con respecto al fragmento UL y, al menos en BoHV1, niveles bajos

(5%) de los genomas tienen el fragmento UL en una orientación invertida (Schyns y col., 2003) (Figura 1.3). Estos datos obtenidos para BoHV1 se pueden extrapolar razonablemente al genoma de BoHV5.

Figura 1.3: Representación esquemática del genoma de BoHV5. Se presentan las secuencias únicas larga (UL) y corta (US) y las flechas indican sus posibles orientaciones. La US es flanqueada por dos secuencias repetitivas invertidas, las repeticiones interna (IR) y terminal (TR). El código de color de las glicoproteínas es el siguiente: relleno negro indica que la conservación media, al nivel de proteína, entre BoHV5 y BoHV1 es mayor a 90%; relleno gris indica un nivel de conservación entre 80 y 90%; relleno blanco indica un nivel de conservación menor a 80%. Imagen extraída de Del Médico Zajac y col. (2010).

El genoma de BoHV5 tiene una longitud de 137.821 pares de bases (pb) y es aproximadamente 2kb más largo que el genoma de BoHV1, con una composición G + C del 75% (Delhon y col., 2003). El genoma de BoHV5 contiene 72 genes, los cuales están presentes en su totalidad en BoHV1; sin embargo, BoHV5 carece de un homólogo de UL 0.5 (Delhon y col., 2003). La región UL contiene 60 genes

putativos. La región US contiene ocho genes y está flanqueada por los elementos TR e IR, los cuales contienen una copia de dos genes reguladores cada uno.

BoHV1 y BoHV5 exhiben un promedio del 82% de identidad aminoacídica entre las diferentes proteínas. Las proteínas con mayor similitud ($\geq 95\%$ de identidad aminoacídica) son aquellas involucradas en la replicación del ADN viral y en el procesamiento de proteínas del virión (Delhon y col., 2003). Las secuencias menos conservadas entre ambos virus ($\leq 75\%$) estarían involucradas en el control del ciclo del virus, en la interacción virus-célula y en la neuropatogénesis viral (Delhon y col., 2003).

Peshev y col. (1998) describen una similitud genómica de aproximadamente un 85% entre los aislamientos respiratorios y encefálicos, mientras que la identidad de las cepas genitales y respiratorias excede el 95%.

Whetstone y col. (1993) determinaron la presencia de polimorfismos en la longitud de los fragmentos del genoma para los distintos tipos y subtipos del BoHV y mediante la hibridización con sondas de ADN detectaron áreas de variación genómica. Para BoHV5 estos polimorfismos fueron localizados en la región IR y en la región TR derecha, en correspondencia con las regiones donde se transcriben los genes de expresión inmediata (IE) (Seal y Whetstone, 1994).

1.5. REPLICACIÓN VIRAL

La replicación de los alfa herpesvirus ha sido estudiada más extensamente para HSV1 y BoHV1. La adsorción de estos virus se produce a través de la unión de los peplómeros glicoproteicos del virión a los receptores de la célula hospedadora, uno de los cuales es el proteoglicano heparán sulfato. Diversos estudios han demostrado que las diferentes glicoproteínas virales (gB, gC, gD, gE, gH, gK y gL) son necesarias para la entrada del virus a la célula (Li y col., 1995; Schröder y Keil, 1999; Dasika y Letchworth, 1999, 2000; Hanon y col., 1999). BoHV1.1 y BoHV1.2 difieren en algunos epítopes de la gC; dichos cambios pueden alterar la adsorción y pueden ocasionar diferencias en la virulencia del subtipo viral (Rijsewijk y col., 1999). Aunque la totalidad de las moléculas involucradas en la entrada del BoHV1 a la célula no está completamente dilucidada, está claramente establecido que el virus se une a las moléculas de heparán sulfato presentes en la membrana celular (Hanon y col., 1998a; Tyler y Nathanson, 2001) a través de las glicoproteínas virales gB y gC (Li y col., 1996). Luego de esta unión inicial, gB y gD se unen con alta afinidad a sus receptores putativos en la membrana celular (Li y col., 1995). Estudios para identificar estos receptores de alta afinidad, demostraron que la gD de BoHV1 puede unirse débilmente con el receptor 1 de nectina (HveC) o con el

receptor humano para el poliovirus (PVR o CD155) expresados en células de humano o de hámster (Geraghty y col., 1998; Connolly y col., 2001). Esta unión débil, indica que la entrada del BoHV1 en el hospedador bovino puede estar mediada por la interacción de la gD con receptores diferentes a los homólogos bovinos del HveC o PVR (Geraghty y col., 1998; Connolly y col., 2001). Luego de la adsorción, la envoltura viral se fusiona con la membrana plasmática de la célula, la nucleocápside entra en el citoplasma, el complejo ADN-proteína es entonces liberado de la nucleocápside e ingresa al núcleo, interfiriendo rápidamente con la síntesis de macromoléculas de la célula hospedadora e iniciando la fase de eclipse durante la cual el virus infeccioso no puede ser detectado dentro de la célula (Gustafson, 1973)(Figura 1.4).

Figura 1.4: Ciclo de replicación de HSV. (1) Unión: gB (HSV1 y HSV2) más gC (HSV1) participan en la unión del virus a la superficie de las células, seguido de la unión de gD a uno de sus receptores. (2) Entrada: después de la fusión de membranas, la cápside viral y las proteínas del tegumento se internalizan en el citoplasma. (3) Transporte de la cápside al núcleo: una vez en el citoplasma, la cápside viral se acumula en el núcleo ya sea por difusión simple o mediada por estructuras del citoesqueleto, como los microtúbulos. (4) Transcripción: los genes de HSV se transcriben secuencialmente como genes α , β y γ . (5) Traducción: los ARNm virales se traducen secuencialmente (proteínas α , β y γ). (6) Replicación: la replicación del genoma viral ocurre como un ciclo continuo. (7) Ensamblaje de la cápside: las cápsidas de HSV se ensamblan dentro del núcleo de las células infectadas. (8) Glicosilación: las glicoproteínas se traducen y glicosilan en el retículo endoplásmico (ER). (9) Exportación de glicoproteínas a la superficie celular: las glicoproteínas se procesan en la red trans-Golgi (TGN) y los cuerpos multivesiculares (MVB). Luego, se exportan a la membrana plasmática. (10) Endocitosis de la membrana plasmática que contiene glicoproteínas. (11) Envoltura: las glicoproteínas dentro de los endosomas tempranos (EE) se fusionan con las cápsides en el citoplasma. (12) Liberación del virus. (Imagen extraída de Ibañez y col. 2018)

En el interior del núcleo se desencadena el mecanismo de cascada de la expresión génica viral. Tres clases de ARNm (α , β y γ) son transcritos secuencialmente por la ARN polimerasa II celular (Figura 1.5). De este modo, los ARN α (ARN inmediatos tempranos, IE [*Immediate Early*]) cuando son procesados adecuadamente a ARNm, se traducen a proteínas α (proteínas inmediatas tempranas), las cuales inician la transcripción de los ARNm β (ARNm tempranos, E [*Early*]), cuyos productos traducidos (las proteínas β o proteínas tempranas) suprimen la transcripción de nuevos ARNm α . Luego comienza la replicación del ADN viral utilizando algunas de las proteínas α y β así como proteínas de la célula hospedadora. A continuación, el programa de transcripción se activa nuevamente y los ARNm γ (ARNm tardíos, L [*Late*]), los cuales son transcritos a partir de secuencias situadas a lo largo de todo el genoma, se traducen a proteínas γ (proteínas tardías). Más de 70 proteínas codificadas por el virus son sintetizadas durante el ciclo viral, siendo muchas de las proteínas α y β enzimas y proteínas de unión al ADN, mientras que la mayoría de las proteínas γ son estructurales (Fenner y col., 2011).

Figura 1.5: Diagrama representando la transcripción, traducción y replicación de un herpesvirus típico. La transcripción y el procesamiento post-transcripcional ocurren en el núcleo y la traducción en el citoplasma; *vhs* es una proteína del tegumento codificada por el gen UL41 e inhibe la síntesis proteica de la célula hospedadora; VP16, codificada por el gen UL48, es otra proteína del tegumento la cual es un factor de transcripción que entra al núcleo y activa los genes inmediatos tempranos. Figura extraída de Fauquet y col. (2005).

La expresión de los genes IE es estimulada por una proteína del tegumento, bTIF, la cual interactúa con factores de transcripción celulares y se une a los promotores IE para activar la transcripción (Wirth y col., 1991, 1992; Gillete y col., 2002). La transcripción de los genes IE se organiza en dos unidades de transcripción: IEtu1, que codifica dos proteínas (bICP0 y bICP4) (Wirth y col., 1991, 1992) e IEtu2 que codifica bICP22 (Schwyzer y col., 1994).

Luego del ensamblaje, los viriones abandonan el núcleo y se dirigen hacia la membrana citoplasmática externa por procesos de gemación a partir de membranas intracitoplasmáticas, adquiriendo su envoltura y tegumento. Luego son transportados dentro de vesículas intracelulares a la membrana citoplasmática para su posterior liberación de la célula (Hunter, 2001). Las partículas virales maduras son liberadas lentamente por fusión con la membrana celular y posterior exocitosis, o por citólisis (Fenner y col., 2011). Durante el proceso de replicación y la formación de nuevos viriones se generan cambios nucleares, los cuales son evidentes en secciones histológicas de tejido o cultivos celulares. Estos cambios pueden ser reconocidos por la formación de inclusiones en el núcleo celular conocidas como Cowdry tipo A (Martin, 1976).

La cinética de replicación viral es muy rápida luego de la adsorción y entrada a la célula. La replicación del genoma del BoHV comienza dentro de las dos horas siguientes a la infección (Meurens y col., 2004). La expresión de antígenos sobre la superficie celular ocurre a las 3-4 h post-infección (pi) y el ensamblaje viral se completa a las 6-7 hpi, produciéndose la diseminación y liberación extracelular del virus en 30 minutos a 1 h post-ensamblaje (Babiuk y col., 1996).

1.6. EPIDEMIOLOGIA

Hasta el momento no existen estudios sobre los factores que influyen en la transmisión o la incidencia de las infecciones por BoHV5. El bovino es el hospedador natural de este virus y en los animales jóvenes, desde el nacimiento hasta aproximadamente los 18 meses de edad, el curso de la enfermedad es rápido y letal (Salvador y col., 1998). En general, los animales adultos son menos susceptibles a la infección por BoHV5, dependiendo de las características de la cepa viral implicada y del hospedador. Las infecciones por BoHV5 tienen una tasa de mortalidad menor al 10%, mientras que la tasa de letalidad puede llegar al 100% (siendo en general siempre superior al 90%) en animales menores de 6 meses (Carrillo y col., 1983a; Schudel y col., 1986; Meyer y col., 2001). Sin embargo, los animales adultos pueden desarrollar signos leves o bien, una infección subclínica (Ashbaugh y col., 1997; Cascio y col., 1999; Vogel y col., 2003).

El BoHV1, cuyo hospedador natural también es el bovino, tiene un alto impacto económico en la ganadería mundial. Este virus está implicado principalmente en infecciones respiratorias, conjuntivitis, enfermedades genitales y abortos (Kahrs, 2001). Esporádicamente, BoHV1 es neuroinvasivo y puede causar encefalitis (Roels y col., 2000; Silva y col., 2007). Por otro lado, aunque

BoHV5 es el agente etiológico primario de la meningoencefalitis bovina, también ha sido aislado ocasionalmente a partir de los tractos respiratorio y genital (Schudel y col., 1986; Kirkland y col., 2009) y de un feto bovino abortado espontáneamente (Schudel y col., 1986). Debido a que históricamente a BoHV1 se lo asocia con enfermedad respiratoria y genital, la mayoría de estos cuadros clínicos se atribuyen a este agente viral y, del mismo modo, los casos de infección neurológica en el ganado se atribuyen generalmente a BoHV5. Sin embargo, es necesario re-evaluar la patogenia de estos herpesvirus y de las pruebas que rutinariamente se utilizan para su diagnóstico, lo cual permitirá una mejor comprensión de la presentación clínica de ambos virus en el bovino.

Los brotes de BoHV5 son esporádicos y presentan una distribución geográfica limitada, detectándose principalmente en el hemisferio sur (D'Arce y col., 2002). Aunque las infecciones ocasionadas por el BoHV1 presentan una distribución mundial (Schudel, 1983), por causas aún no establecidas, los cuadros nerviosos son particularmente severos y frecuentes en Brasil y Argentina. Las razones de esta distribución particular son aún indeterminadas. Solo algunos casos de encefalitis asociada a BoHV5 han sido reportados en Australia (French,

1962; Johnston y col., 1962), América del Norte (Reed y col., 1973; D'Offay y col., 1993) y Europa (Bartha y col., 1969; Moretti y col., 1964).

En los últimos 25 años sólo se describieron casos de meningoencefalitis asociada a BoHV5 en Brasil y Argentina. En Brasil se han presentado casos en las regiones Norte (Riet-Correa y col., 2006), Centro-Oeste (Salvador y col., 1998; Colodel y col., 2002), Sud-Este (Salvador y col., 1998; Gomes y col., 2002) y Sur (Halfen y col., 2000; Elias y col., 2004; Rissi y col., 2006). Con respecto a Argentina, durante la década del '80 fueron descriptos más de 50 brotes de encefalitis no supurativa con aislamiento de BoHV. La casuística del Grupo de Sanidad Animal de INTA Balcarce indica que durante el período 1990 – 1995, más del 40% de las infecciones asociadas a BoHV correspondieron a la forma encefálica (Odeón, 1998). Otro estudio acerca de la casuística neuropatológica realizado en nuestro país a partir de casos clínicos remitidos al programa de vigilancia epidemiológica de Encefalopatía Espongiforme Bovina entre 1994 y 1996, demostró que sobre un total de 67 cerebros analizados, las lesiones microscópicas principales correspondieron a encefalitis, o meningoencefalitis no supurativa y encefalitis no supurativa con malacia, siendo el BoHV el agente etiológico más frecuentemente aislado (Blanco Viera y col., 1998). Asimismo, entre las enfermedades con signos

neurrológicos de etiología infecciosa diagnosticadas durante el año 2001 (Odriozola y col., 2002) y los años 2008, 2009 y parte del 2010 (Margineda y col., 2010), el BoHV fue uno de los agentes más frecuentemente identificados. Debido a la amplia difusión de las cepas encefálicas en el país y su potencial de producir brotes fatales de encefalitis, la determinación de las condiciones bajo las cuales el BoHV5 es capaz de inducir enfermedad resulta esencial.

La seroprevalencia real de BoHV5 es desconocida tanto en Brasil como Argentina, principalmente como consecuencia de la alta prevalencia de anticuerpos específicos contra BoHV1 inducidos por la vacunación y/o infección y la ausencia de métodos serológicos que permitan la diferenciación de ambos virus. Por otro lado, si bien existen vacunas contra el BoHV1, e incluso algunos inmunógenos comerciales incluyen una cepa de BoHV5, éstas resultan poco eficaces. En base a este contexto, es esencial comprender los mecanismos patogénicos de ambos virus para poder elaborar vacunas eficaces que confieran protección adecuada y desarrollar pruebas diagnósticas diferenciales. Las medidas tendientes a prevenir y controlar estas enfermedades redundarán en beneficios económicos para el sector ganadero nacional e internacional, principalmente en el

ámbito del continente sudamericano donde, a diferencia del resto del mundo, los brotes neurológicos asociados con BoHV5 son altamente frecuentes.

1.7. PATOGENIA

1.7.1. ENTRADA Y DISEMINACIÓN VIRAL

Existen escasos datos sobre la transmisión del BoHV5, aunque se asume que utilizaría vías de transmisión similares a las del BoHV1. El BoHV1 se transmite por contacto directo con animales infectados (contacto de nariz a nariz o contacto genital en el apareamiento), o por aerosol, y la transmisión indirecta puede ocurrir a través de alimentos contaminados, agua o fomites y por semen, incluida la inseminación artificial (Muylkens y col., 2007). El ADN viral y el virus infeccioso se han detectado en el semen de toros con infección subclínica (Gomes y col., 2003). El BoHV5 infecta inicialmente las células epiteliales en el sitio de entrada, es decir, la replicación ocurre en la mucosa nasal o vaginal, dependiendo de la ruta de la infección (Bagust, 1972; Bagust y Clark, 1972). La replicación viral de BoHV5 en el sistema respiratorio conduce a una alta producción de virus, la progenie se elimina en las secreciones nasales y constituye una fuente muy eficiente de transmisión durante la infección aguda.

Se demostró que las inoculaciones experimentales intravaginales, epidurales e intracerebrales conducen a enfermedad neurológica y muerte (French, 1962; Bagust, 1972; Bagust y Clark, 1972). Los bovinos inoculados por vía conjuntival desarrollan hipertermia, con replicación nasal del virus, pero no muestran signos nerviosos (Bagust, 1972). De todos modos, la inoculación intranasal es la vía más utilizada para la reproducción experimental dado que representaría una de las rutas más comunes de infección natural. Además, se ha demostrado que por esta vía es posible establecer los tres estadios del ciclo infeccioso (Pérez y col., 2002). Después de la replicación inicial, la propagación del virus probablemente se produce por tres vías, como se describió anteriormente para el BoHV1: diseminación local, diseminación sistémica por viremia y diseminación neuronal (Pastoret y col., 1982; Engels y Ackermann, 1996). La diseminación sistémica por viremia ha sido demostrada, indirectamente, por medio del aislamiento del virus a partir del hígado, riñón y leucocitos luego de la inoculación intranasal e intravenosa (Bagust y Clark, 1972; Belknap y col., 1994; Meyer y col., 2001). Además, Favier y col. (2014) demostraron que tanto BoHV1 como BoHV5 infectan los leucocitos de sangre periférica (PBLs) luego de la inoculación intranasal de bovinos. No obstante, la detección es intermitente lo

cual sugiere que la carga viral es baja y se desconoce si esta vía es significativa en la patogénesis de BoHV5.

Al igual que en el caso del BoHV1, la diseminación local en la mucosa infectada puede ocurrir por dos mecanismos diferentes: (1) las partículas virales liberadas en el medio extracelular pueden infectar células susceptibles; y (2) la propagación directa de célula a célula, es decir, la transmisión viral de una célula infectada a las células cercanas no infectadas.

Después de una alta tasa de replicación viral primaria en el epitelio nasal, el BoHV5 invade el sistema nervioso mediante la vía olfatoria y el nervio trigémino, tanto en bovinos (Furuoka y col., 1995; Pérez y col., 2002) como en el modelo en conejo (Lee y col., 1999; Beltrao y col., 2000). Durante la replicación inicial en el sitio de entrada, los herpesvirus pueden entrar en los axones de las células nerviosas locales. El ingreso directo a los axones, sin replicación previa, también puede ocurrir si la dosis infectiva viral es suficientemente alta (Rock, 1993).

La presencia de virus en el nervio trigémino y los cambios microscópicos en el ganglio trigémino (GT) aparecen a los 5-7 días de la infección (Bagust, 1972; Bagust y Clark, 1972; Pérez y col., 2002). El desarrollo simultáneo de lesiones en la corteza cerebral anterior, la médula, la protuberancia y el GT sugiere que el

BoHV5 también llega al cerebro mediante el transporte axonal desde las neuronas bipolares de los nervios olfatorios a los bulbos olfatorios (Pérez y col., 2002).

Una vez que el virus alcanza el Sistema Nervioso Central (SNC) en el ganado bovino, se produce una meningoencefalitis fatal a los 8-10 días post-infección (Belknap y col., 1994; Meyer y col., 2001; Pérez y col., 2002). Sin embargo, algunos casos de infección subclínica (Ashbaugh y col., 1997; Cascio y col., 1999; Vogel y col., 2003; Isernhagen y col., 2011), o de enfermedad moderada (Del Médico Zajac y col., 2006) han sido reportados en el ganado adulto. En el caso de una infección subclínica, o cuando los animales sobreviven a un cuadro neurológico, se establece una infección latente en los ganglios nerviosos. Esta forma de latencia se establece de por vida (Cascio y col., 1999; Meyer y col., 2001; Pérez y col., 2002) y, bajo ciertas condiciones, puede ocurrir la reactivación del virus, la reinfección del tejido periférico y la excreción viral.

1.7.2. INFECCIÓN PRIMARIA, LATENCIA Y REACTIVACIÓN VIRAL

Las infecciones ocasionadas por BoHV1 y BoHV5 atraviesan tres fases: 1) **Infección primaria o aguda.** En el transcurso de estos ciclos cortos de infección, el animal infectado disemina el virus entre los animales susceptibles, los cuales se infectan y continúan excretando virus entre 2 a 16 días después de la infección.

Cuando casi todos los animales del rodeo se infectaron y desarrollaron inmunidad, los ciclos cortos de infección terminan (Wentink y col., 1993) y en el caso de que el bovino sobreviva a la infección aguda puede establecerse 2) **Latencia**, etapa en la que el genoma viral persiste de por vida en el individuo infectado y no se detecta virus infeccioso y 3) **Reactivación viral**, caracterizada por episodios esporádicos de excreción viral ocasionados por distintos factores estresantes o la administración de corticoesteroides sintéticos.

La fase aguda de las infecciones causadas por el BoHV se caracteriza por la presencia de signos clínicos evidentes, abundante excreción de altos títulos de virus infeccioso y franca diseminación a los animales susceptibles. Durante este período, tiene lugar una extensa replicación viral a nivel de las membranas mucosas (Hossain y col., 1995; Schang y Jones, 1997; Osorio, 1998; Flores y col., 1998).

El BoHV, al igual que la gran mayoría de miembros de la subfamilia *Alfaherpesvirinae*, establece latencia durante toda la vida del hospedador en neuronas ganglionares del sistema nervioso periférico (SNP). Luego de la replicación inicial en el epitelio mucoso, la nucleocápside del virus es direccionada por transporte axonal retrógrado hasta el cuerpo de la neurona sensorial dentro

del GT. Allí el ADN se localiza en forma episómica en el núcleo de la neurona, entrando en un estado de transcripción restringida, el cual le permite evadir la respuesta inmune del hospedador.

Durante eventos de estrés, inmunosupresión o uso de corticoides, el virus puede reactivarse, produciendo partículas virales que migran en forma centrífuga (Figura 1.6) usando el transporte axonal anterógrado de la misma neurona por la cual ascendieron, alcanzando el sitio inicial de replicación, para poder así dispersarse a otros animales susceptibles (Sheffy y Davies, 1972; Rock y col., 1992).

Figura 1.6: Etapas de la infección por el herpes simplex virus: a) La infección de las células epiteliales en la superficie de la mucosa da lugar a una replicación productiva, lo que resulta en la producción de viriones, que pueden propagarse para infectar células epiteliales adicionales. El virus ingresa a las neuronas sensoriales, y las nucleocápsides se transportan al cuerpo celular neuronal. El ADN viral se libera en el núcleo neuronal y se circulariza, persiste en el núcleo de la célula neuronal y se expresa el gen relacionado a la latencia. b) Tras la reactivación, se inicia la expresión de los genes líticos virales y las cápsidas recién formadas se transportan a los extremos axonales. El axón libera virus infeccioso que infecta las células epiteliales, lo que resulta en una infección recurrente y la eliminación del virus. Figura extraída de Knipe y Cliffe 2008.

El sitio primario de establecimiento de latencia tanto de BoHV1 como de BoHV5 son las neuronas sensoriales del GT (Rock y col., 1992; Meyer y col., 2001); sin embargo, existen otros sitios adicionales de latencia. Por ejemplo, se demostró la persistencia y reactivación de BoHV1 en los centros germinales de las tonsilas

faríngeas, teniendo este sitio un papel importante, tanto en la patogénesis como en la transmisión del virus a nuevos hospedadores (Winkler y col., 2000; Pérez y col., 2005). En el caso de BoHV5 también se demostró que puede establecer latencia en tonsilas y que puede ser reactivado a partir de estos sitios, contribuyendo a la transmisión viral (Favier y col., 2014). Así mismo, se ha evidenciado infección latente por BoHV1 (Fuchs y col., 1999; Favier y col., 2014) y BoHV5 (Favier y col., 2014) en células mononucleares de sangre periférica, en nódulos linfoides y tejidos esplénicos, aún en ausencia de infección productiva (Mweene y col., 1996). Vogel y col. (2004) demostraron la presencia de virus latente en la raíz dorsal de los ganglios nerviosos sacros, en el plexo simpático pélvico y en los nódulos linfoides locales luego de la inoculación intraprepucial de toros con una cepa de campo del subtipo BoHV1.2. Con respecto al BoHV5, el genoma viral también ha sido detectado en varias áreas del SNC en bovinos latentemente infectados (principalmente en la corteza olfatoria, el cerebelo, el tálamo, mesencéfalo y protuberancia) (Meyer y col., 2001; Pérez y col., 2002; Vogel y col., 2003). Las mucosas nasal y traqueal también han sido sugeridas como posibles sitios de latencia de BoHV5 (Meyer y col., 2001) y tanto el ADN del BoHV1

como del BoHV5 han sido consistentemente detectados en ganglios mediastínicos durante este período (Marin y col., 2016).

El establecimiento del estado de latencia involucra la entrada de la cápside viral en una neurona sensorial, el posterior acceso del genoma al núcleo y el desarrollo de una infección productiva en esta localización; luego, la expresión de genes virales cesa o disminuye drásticamente, y en lugar de los 70-80 genes virales que se expresan durante la infección lítica, en la fase latente sólo se detecta la expresión de dos transcritos virales: un transcrito relacionado a la latencia (Latency-Related gene, LR) y el ORF-E, que son abundantemente expresados en GT (Bratanich y Jones, 1992; Inman y col., 2004; Jones y col., 2006; Pérez y col., 2008). A diferencia de BoHV1, el genoma de BoHV5 no codifica para el ORF-E (Delhon y col., 2003).

El mantenimiento de la latencia es un suceso que puede durar toda la vida del hospedador; técnicamente, se define como un período durante el cual no es posible detectar virus infeccioso mediante los procedimientos estándares de aislamiento viral, y, en general, tampoco se expresan los genes virales necesarios para el establecimiento de una infección productiva (genes de ciclo lítico). Los mensajeros del gen LR son los únicos transcritos virales que se expresan

abundantemente durante esta fase, y la evidencia demuestra que la abundante expresión de ARN del gen LR en las neuronas sensoriales inhibe la expresión de bICP0, el principal gen IE, bloqueando así la infección productiva y promoviendo el establecimiento y mantenimiento de la latencia (Geiser y col., 2002). Además, se conoce que parte del gen LR está poliadenilado, puede sufrir empalmes alternativos y tiene el potencial de originar varias proteínas (Hossain y col., 1995; Devireddy y Jones, 1999). El gen LR contiene dos marcos de lectura abiertos (ORF), ORF1 y ORF2, y dos marcos de lectura sin una metionina iniciadora (Kutish y col., 1990). Los genes LR de BoHV1 y BoHV5 son sustancialmente diferentes. En el caso de BoHV5, el ORF2 está interrumpido cuatro veces con solo un marco de lectura que tiene una metionina iniciadora (Silvestro y Bratanich, 2016). Además, el gen LR del BoHV1 es capaz de detener el ciclo celular en la fase G1, inhibe la apoptosis neuronal e inhibe el reconocimiento inmune en GT. Todas las funciones del gen LR favorecerían la supervivencia neuronal favoreciendo el establecimiento y mantenimiento de la latencia (Jones y col., 2011). Sin embargo, no todas las funciones del gen LR parecen estar mediadas por las proteínas codificadas por el gen. Por ejemplo, la inducción de la expresión de IFN β 3 parece estar mediada por el ARN del gen LR (Pérez y col., 2008).

La reactivación del estado de latencia es iniciada principalmente por estímulos estresantes externos naturales (liberación de glucocorticoides endógenos) como el transporte, el parto, el hacinamiento, etc., o por el tratamiento con glucocorticoides (Meyer y col., 2001; Pérez y col., 2002; Vogel y col., 2003) los cuales favorecen la expresión de genes IE; por lo tanto, después de la reactivación es posible evidenciar la expresión de genes virales en neuronas sensoriales infectadas y aislar virus infeccioso de GT y secreciones nasales y/u oculares (Jones, 2003). De este modo, la replicación viral puede llevar a la re-infección del tejido periférico y re-excreción viral favoreciendo la propagación del virus entre los animales susceptibles.

Se han descrito diversos mecanismos por los cuales los glucocorticoides sintéticos, particularmente Dexametasona (DXM), inducirían la reactivación viral. La DXM imita los efectos del estrés, estimula la infección productiva (Kook y col., 2015) e inicia la reactivación de la latencia (Jones 1998; Shimeld y col., 1990).

Estudios realizados con HSV1, permitieron determinar que la reactivación del estado de latencia inducida por el tratamiento con DXM se debería a un mecanismo indirecto de inmunosupresión, llevando a la re-expresión de los genes virales de ciclo lítico (Schwyzer y Ackerman, 1996). Además, los corticosteroides se

unen y activan el receptor de glucocorticoides (GR, por sus siglas en inglés) y el receptor de mineralocorticoides (MR, por sus siglas en inglés) (Oakley y col., 2013), lo que sugiere que estos receptores de hormonas nucleares median aspectos claves de la reactivación de la latencia (El-Mayet y col., 2017).

El dímero MR o GR unido a una molécula de corticosteroide ingresa al núcleo y en minutos estimula la remodelación de la cromatina y la transcripción mediante la unión a los Elementos de Respuesta de Glucocorticoides (GRE, por sus siglas en inglés). Los corticosteroides también tienen efectos antiinflamatorios e inmunosupresores, en parte al inactivar los factores de transcripción (AP-1 y NF- κ B) que estimulan la expresión de citoquinas inflamatorias (Kook y col., 2015). En general, el estrés aumenta los niveles de corticosteroides y activa el GR, lo cual puede iniciar constanentemente el escape de la latencia (ver Figura 1.7, esquema de los eventos necesarios para la reactivación de la latencia). Luego de 5 minutos de tratamiento con glucocorticoides, los GR entran al núcleo, se unen a los GRE e inducen cambios rápidos en la conformación de la cromatina y la actividad transcripcional. Durante el escape de la latencia, ocurren varios eventos clave que resultan en la expresión génica viral del ciclo lítico. Primero, los factores específicos de transcripción celular inducidos por la DXM estimulan ciertos

promotores virales y la infección productiva (Workman y col., 2012; Kook y col., 2015). Segundo, la expresión génica viral del ciclo lítico, incluyendo la de los genes bICP0 y VP16, también puede ser estimulada directamente por un GR activado. En tercer lugar, la DXM reprime la expresión del gen LR (Rock y col., 1992; Jaber y col., 2010; Sinani y col., 2013), lo cual es de suma importancia ya que ciertos productos del gen LR pueden inhibir la infección productiva (Geiser y col., 2002; Jaber y col., 2010; Workman y col., 2011). Finalmente, después del tratamiento con DXM de los animales con infección latente, ocurre la apoptosis de las células T que persisten en el GT durante la latencia (Winkler y col., 2002), lo que puede aumentar la incidencia de reactivación ya que se propone que las células T CD8⁺ mantienen la latencia (Khanna y col., 2003; Liu y col., 2000; Frizzo da Silva y col., 2013).

Figura 1.7: Etapas potenciales que ocurren durante el escape de latencia inducido por DXM (modificado de Frizzo da Silva y col. 2013).

Los factores solubles producidos por las células T que infiltran el GT (Decman y col., 2005; Knickelbein y col., 2008) y/o las células dendríticas (Matundan y col., 2014; Mott y col., 2014) interfieren con la reactivación del estado latente. Kook y col. (2015) demostraron que el tratamiento con DXM en terneros con infección latente conduce a la expresión de genes virales antes de la apoptosis de los linfocitos infiltrantes en GT. Estas observaciones sugieren que las funciones inmuno-inhibitorias de los corticosteroides no son críticas cuando se inicia la expresión génica viral después de un estímulo de reactivación. Sin

embargo, es probable que sean importantes para restringir la propagación del virus (El-Mayet y col., 2017).

Muchos de los genes en la región UL no son afectados por la DXM, lo que sugiere que existen GRE específicos que mediarían este proceso durante la infección productiva. Es difícil predecir dónde se encuentran estos GRE dentro de la región UL ya que se sabe que aunque un GRE se ubique lejos de un promotor puede, de todos modos, estimular su actividad (Polman y col., 2012). También es importante señalar que los genomas de HSV1 y BoHV1 existen como cromatina "silenciosa" durante la latencia (Knipe y Cliffe, 2008). Sin embargo, el ADN de HSV1 se asocia con cromatina inestable durante la infección productiva (Lacasse y Schang 2010, 2012). Por lo tanto, puede asumirse que la asociación del genoma de BoHV1 con la cromatina puede afectar las interacciones del GR con el genoma viral y la activación de determinados genes virales ante un estímulo de estrés (Zhu y col, 2017).

Además, usando la técnica de microarreglos, se demostró un aumento de la expresión de genes tales como el receptor de la prostaglandina E2, la ciclina D2, el factor de transcripción proteína activadora 1 (AP-1) y la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) en GT de ratones infectados por el HSV1 y tratados con

DXM; postulando así, un papel importante de estos genes en la reactivación viral inducida por corticoides (Higaki y col., 2002).

En terneros latentemente infectados con BoHV5, la administración de DXM también induce la reactivación viral (Pérez y col., 2002; Vogel y col., 2003). En esta etapa el ADN del BoHV5 se detectó con mayor frecuencia en la corteza cerebral, tálamo, cerebro medio, puente, médula y cerebelo y se encontró con menos frecuencia en el bulbo olfatorio. Los cerebros de terneros que recibieron tratamiento con DXM mostraron una distribución más amplia del ADN viral que los cerebros de los terneros latentemente infectados sin tratar con DXM (Vogel y col., 2003). El examen histopatológico de diferentes áreas del SNC de terneros sometidos al tratamiento con DXM sugiere que la diseminación de BoHV5 a la corteza cerebral luego de la reactivación viral se produciría a través del nervio trigémino.

El BoHV5 puede reactivarse y volver a excretarse sin manifestación de signos clínicos (Belknap y col., 1994; Cascio y col., 1999) o bien, a diferencia de lo que ocurre durante la reactivación de BoHV1, el animal puede desarrollar manifestaciones clínicas de encefalitis similares a las observadas durante la infección aguda (Pérez y col., 2002; Vogel y col., 2003). La reactivación en ausencia

de signos clínicos es de particular interés dado que los animales con infección latente, que actúan como reservorios naturales del virus, representan una fuente de diseminación potencialmente silenciosa bajo las condiciones de re-excreción viral. Debido a la posible reactivación de la infección latente, cualquier animal con anticuerpos humorales detectables debería considerarse como una potencial fuente de infección. Las reactivaciones pueden causar un incremento en el título de anticuerpos, lo cual explicaría parcialmente la persistencia de los anticuerpos humorales (Kahrs, 1977). Sin embargo, ciertos portadores latentes pueden no tener anticuerpos detectables por los métodos de diagnóstico serológico usuales (Lemaire y col., 1995).

1.7.3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LOS CUADROS NEUROLÓGICOS

Los trastornos neurológicos se presentan en animales jóvenes de hasta 2 años de edad con un curso rápido que lleva a la muerte después de 5 a 8 días de presentación de los síntomas nerviosos (McKercher y col., 1970). A campo, la encefalitis fatal se presenta típicamente en animales mayores a los 6 meses de edad (Cascio y col., 1999). En un estudio de 37 brotes se observó que el 43% de los casos correspondía a bovinos entre 6 y 10 meses de edad, un 24% se presentó

entre los 10 y 18 meses y el 16% restante en animales de 4 a 6 meses de edad (Giraud, 1989).

Los animales afectados por estos cuadros neurológicos presentan depresión, anorexia, ptialismo, rechinar de dientes, amaurosis, ataxia, marcha en círculos, postración y muerte (Carrillo, 1982). Se han registrado casos de curso afebril así como animales con temperaturas superiores a los 41,7°C (McKercher y col., 1970).

La lesión macroscópica más relevante consiste en la pérdida de consistencia en las áreas frontales y/o parietales de los hemisferios cerebrales, mientras las lesiones microscópicas se caracterizan por la presencia de manguitos perivasculares, infiltración de células mononucleares, gliosis focal o difusa, satelitosis y neuronofagia. En las áreas de malacia se observa un número importante de células de Gitter (Blanco Viera y col., 1998).

La tasa de mortalidad de esta infección viral puede alcanzar el 10%, mientras que la tasa de letalidad frecuentemente supera el 90% (Giraud, 1989).

1.8. INMUNIDAD INNATA - ROL DE LOS RECEPTORES TIPO TOLL EN LA RESPUESTA A LA INFECCION POR ALFAHERPESVIRUS

En muchas infecciones virales, una respuesta inmune inadecuada o exacerbada puede ser responsable de alteraciones patológicas. Pocos minutos luego de la invasión del hospedador por un microorganismo patógeno, el sistema inmune innato es activado y coordina la defensa durante las primeras horas y días luego de iniciada la infección. Aunque el sistema inmune innato es muy eficaz para controlar a la mayoría de los patógenos invasores, no es un sistema específico y selectivo; la especificidad sería conferida únicamente por la activación secundaria de la inmunidad adquirida mediada por los linfocitos T y B. Entre los componentes del sistema inmune innato más recientemente estudiados se encuentran los receptores tipo toll (TLR). Los TLR han demostrado ser cruciales en el reconocimiento de los microbios por el sistema inmune innato y en el nexo entre las respuestas inmunes innata y adquirida (Rosenthal, 2006). En el caso de los alfaherpesvirus, se desconoce si la respuesta inmune desempeña algún rol en el desarrollo de la meningoencefalitis y si la misma puede asociarse con las diferencias en la patogenia del BoHV1 y BoHV5.

Los TLR permiten el reconocimiento de los patógenos la inmunidad innata,

estableciendo el papel clave que desempeña la respuesta inmune inicial en la defensa del hospedador contra la infección (Kawai y Akira, 2005; Akira y col., 2006; Seth y col., 2006). Los TLR son proteínas de señalización de transmembrana que median el reconocimiento de “patrones moleculares asociados a los patógenos” (PAMPs). Actualmente, también se conoce que los TLR pueden ser activados por “patrones moleculares asociados al peligro” (DAMPs), los cuales derivan del hospedador y se originan mayormente a partir de la injuria tisular (Lee y col., 2013). Los TLR son expresados por células del sistema inmune o por aquellas células que son blanco primario de los agentes infecciosos (Zarembek y Godowski, 2002). Se ha descrito también que en ciertos casos la respuesta inflamatoria mediada por los TLR durante una infección viral puede resultar en daño tisular (Carty y col., 2014). La proteína Toll fue reconocida primero por su papel en la determinación del patrón dorso-ventral en embriones de la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster* (Hashimoto y col., 1988). Estudios posteriores encontraron que la proteína Toll juega un papel esencial para establecer una respuesta inmune efectiva contra infecciones bacterianas y micóticas (Lemaitre y col., 1996). Estos estudios condujeron consecutivamente a la búsqueda e identificación de los homólogos de estas proteínas en humanos y ratones y se los

denominó TLR (Medzhitov y col., 1997). Hasta la fecha, se han identificado 10 TLR en los seres humanos y 13 en ratones, con los TLR 1-9 común a ambos. Los TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR6 se encuentran en la membrana plasmática celular, mientras que los TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 se ubican en las membranas de los compartimentos intracelulares, principalmente en los endosomas (Figura 1.8). Todos estos receptores comparten una arquitectura común conformada por un dominio extracelular conteniendo repeticiones ricas en leucina, el cual media el reconocimiento del PAMP, un dominio de transmembrana y un dominio citoplasmático llamado dominio TIR (receptor Toll/IL-1), similar al receptor de IL-1 y responsable del inicio de la señalización intracelular (Botos y col., 2011).

Figura 1.8: Ubicación y vías de señalización de los receptores tipo Toll. Algunos TLR se expresan en la superficie celular para el reconocimiento de ligandos extracelulares (PAMPs), estos incluyen a los TLR 1, 2, 4, 5, 6, 11, 12 y 13. Otros TLR se expresan en compartimentos intracelulares como endosomas, liposomas o retículo endoplasmático para el reconocimiento de PAMPs bacterianos y virales. Entre ellos se encuentran los TLR 3, 7, 8 y 9 (Imagen de Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA).

Los TLR3, 7, 8 y 9 están involucrados en la inmunidad contra las infecciones virales, y los mismos reconocen patrones moleculares basados en oligonucleótidos de ARN o ADN (Wang y col., 2006; Cargill y Womack, 2007). Estos receptores se encuentran ubicados en las membranas de los compartimientos endosómicos (Latz y col., 2004). El TLR3 reconoce ARN de doble cadena, el TLR7 y el TLR8 son activados por ARN de cadena simple rico en GU, mientras que el TLR9 puede ser activado por una secuencia de ADN de cadena doble rica en CpG no metilada (Borrow y col., 2010). Luego de la estimulación de los TLR, el desencadenamiento de eventos a partir de distintas vías de

señalización conduce a la producción de citoquinas pro-inflamatorias e interferón (IFN) y finalmente, a la estimulación de la respuesta inmune adaptativa (Smith y col., 2005; Rosenthal, 2006).

En cuanto a la respuesta adaptativa en las infecciones por herpesvirus, se ha prestado particular atención a la respuesta citotóxica mediada por los linfocitos T a nivel del GT dada la importancia de estos ganglios nerviosos en el ciclo infeccioso. Feldman y col. (2002) demostraron que, ocasionalmente, algunas neuronas sensoriales en GTs latentemente infectados pueden expresar proteínas virales, las cuales actuarían como un estímulo antigénico capaz de mantener un infiltrado crónico de células $CD8^+$ durante la latencia. Derfuss y col. (2007) determinaron que además del LR, algunos genes IE, tales como ICP0 y ICP4 son expresados en GTs de seres humanos infectados por HSV1. En un modelo murino, se observó que, en coincidencia con una disminución en la expresión antigénica hacia el final de la fase aguda de la infección por HSV1, se producía un incremento en el número de macrófagos, células NK y linfocitos $CD8^+$ que infiltraban el GT, indicando que ciertos factores inmunológicos estarían involucrados en la represión de la infección (Jones, 2003). En GT, las células $CD8^+$ superarían en número a los linfocitos $CD4^+$ y controlarían la infección mediante mecanismos no

citolíticos, a través de la liberación de citoquinas (Carr y Tomanek, 2005). Una vez que los linfocitos citotóxicos se unen a la célula blanco también se produce la liberación de proteínas como perforina y granzimas. La perforina forma poros en la membrana celular y permite el paso de las granzimas al citosol. Las granzimas se caracterizan por su especificidad de sustrato, además activan vías apoptóticas, regulan los procesos inflamatorios e interfieren en las infecciones intracelulares como las ocasionadas por virus al mediar la muerte celular y privarlos de los procesos celulares que son necesarios para su supervivencia y replicación (Voskoboinik y col., 2015). Estos linfocitos $CD8^{+}$ se encuentran en estrecha aposición a las neuronas infectadas y tendrían un fenotipo activado (CD69 y granzima B) (Van Lint y col., 2005; Sheridan y col., 2006) demostrando que están expuestas continuamente a un estímulo antigénico. Algunos autores sostienen que la presencia de células $CD8^{+}$ sería necesaria para prevenir la reactivación viral y mantener la fase de latencia (Liu y col., 2001; Decman y col., 2005). La respuesta inmune local en GT ha sido extensamente estudiada en la infección por HSV1 en los seres humanos. Sin embargo, la caracterización de la respuesta inmunitaria ha sido parcialmente descripta para el BoHV1 y se carece de información con respecto al BoHV5. Debido a las diferencias clínicas observadas en la reactivación

del BoHV5 y el BoHV1 es interesante investigar si dichas diferencias están relacionadas a los mecanismos inmunes que tienen lugar en GT durante la latencia.

1.9. ROL DE LOS COMPONENTES DEL CICLO CELULAR EN LAS INFECCIONES POR ALFAHERPESVIRUS

El ciclo celular se puede dividir en cuatro fases: G1, S (síntesis de ADN), G2 y M (mitosis). La regulación de estas fases se basa en la formación de complejos entre ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (cdk) que catalizan la progresión del ciclo celular (Schafer, 1998) activando o inactivando proteínas diana. Hay puntos de control de calidad que aseguran la fidelidad de la división celular al controlar que cada paso del ciclo se complete antes de que ocurra el siguiente (Abreu Velez y Howard, 2015). Las células entran en la fase S influenciadas por la ciclina E y más tarde por la ciclina A2. La actividad máxima de ambas ciclinas ocurre durante esta fase. La actividad de ciclina A continúa en G2 y la acumulación de ciclina B1 controla la entrada y salida de la célula desde la fase M (Hardwick y col., 2015). En neuronas diferenciadas, el ciclo celular debe mantenerse en control constante, ya que el reinicio del ciclo conduce a la muerte neuronal (Hernández Ortega y col., 2007).

Como característica de su mecanismo patógeno, muchos virus facilitan su propia replicación al interactuar con factores del hospedador que regulan la progresión del ciclo celular (Wang y col., 2017). Se pueden describir ejemplos en virus de ADN, retrovirus y virus de ARN. Los virus de ADN, que se replican en el núcleo, se han investigado exhaustivamente con respecto al control del ciclo celular de las células hospedadoras. Algunos virus de ADN pequeños, como por ejemplo el Virus de Simio 40 (De Caprio y col., 1988), el adenovirus (Howe y col., 1990; Eckner y col., 1994), y el papilomavirus humano (Werness y col., 1990), que carecen de sus propias polimerasas, usan la polimerasa de la célula huésped para promover la entrada en la fase S desde la fase G0/G1. Otros virus de ADN grandes, por ejemplo, los herpesvirus pueden inducir el detenimiento del ciclo celular en G0/G1 para evitar competir por los recursos de replicación del ADN celular (Flemington, 2001).

Los estudios sobre la infección por BoHV1 dilucidaron algunas estrategias del virus para subvertir el control del ciclo celular para su propio propósito (Schang y col., 1996; Winkler y col., 2000). Por otro lado, no hay información sobre las interacciones de BoHV5 con los componentes del ciclo celular. El gen LR de BoHV1 participa en la modulación del ciclo celular (Schang y col., 1996; Jiang y

col., 1998). Como se describió previamente, el gen LR de BoHV1 y BoHV5 son sustancialmente diferentes (Delhon y col., 2003), por lo tanto, es posible que difieran en la modulación de moléculas reguladoras clave involucradas en la progresión del ciclo celular y esto podría ser importante para la neuropatogénesis de BoHV.

1.10. LA APOPTOSIS EN LAS INFECCIONES POR ALFAHERPESVIRUS

La muerte celular programada o apoptosis es un mecanismo fisiológico implicado, en algunos casos, en la eliminación de infecciones virales (Hay y Kannourakis 2002; Griffin y col., 2010). En contraste, los virus pueden manipular señales antiapoptóticas dirigidas a controlar/inhibir la muerte celular y, en consecuencia, permitir que la replicación del virus continúe (Ohta y Nishiyama 2011). La apoptosis se puede activar a través de dos vías: intrínseca y extrínseca (Hay y Kannourakis 2002). La vía apoptótica extrínseca se puede activar mediante una variedad de estímulos externos, conocidos como citoquinas, toxinas o modulación de receptores de la superficie celular clasificados como receptores de muerte: factor de necrosis tumoral (TNF), ligando de Fas (FasL) y ligando de inducción a apoptosis relacionada con TNF (Elmore 2007; Griffin y col., 2010; Dashzeveg y Yoshida 2015; Probert 2015). La vía de apoptosis intrínseca se

desencadena por el estrés celular, como la presencia de proteínas virales, daño en el ADN o estrés oxidativo, lo que lleva a la activación de moléculas en la membrana mitocondrial (El-Bacha y Da Poian, 2013; Zhou y col., 2017).

Las mitocondrias desempeñan un papel dominante en la vía apoptótica intrínseca. Las mismas participan en las principales respuestas inmunitarias antivirales tempranas a través de cambios en su metabolismo (Ohata y Nishiyama, 2011; West y col., 2011; Jin y col., 2017).

Las caspasas son proteasas de cisteína que son extremadamente importantes para las vías apoptóticas intracelulares. La caspasa-9 y la caspasa-8 están implicadas en las vías apoptóticas intrínsecas y extrínsecas, respectivamente (Vanden y col., 2010; Riley y col., 2015). La vía extrínseca se inicia mediante la unión de ligandos de muerte a receptores interrelacionados; la unión de los ligandos de muerte (TNFR1, TNFR2, Fas, DR3, DR4 y DR5) y sus receptores reclutarán TRADD, FADD y pro-caspasa-8 para formar el complejo DISC y de esta manera activar la caspasa-8. Posteriormente, se activa la caspasa-3, y la caspasa-3 activada puede escindir la Poli ADP Ribosa Polimerasa (PARP) para iniciar la apoptosis celular (Mocarski y col., 2011; Riley y col., 2015; Tummers y col., 2017). Por otro lado, la vía apoptótica mitocondrial está controlada principalmente por la

familia de proteínas Bcl-2. Una serie de miembros de la familia de proteínas Bcl-2, incluidos Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1, Bid y Bim, pueden alterar el potencial de membrana mitocondrial (MMP). Esto conduce a la liberación de citocromo c (Cyt-c) de las mitocondrias hacia el citoplasma y se combina con pro-caspasa-9 y Apaf-1 para formar un complejo para activar la caspasa-9 y continuar con la posterior activación de la caspasa-3 (Figura 1.9) (Logue y col., 2013; Zheng y col., 2016). La infección de células MDBK por BoHV1 puede inducir la apoptosis e inhibir la replicación del virus (Hanon y col., 1998; Yazici y col., 2004; Geiser y col., 2008; Xu y col., 2012;). Sin embargo, los alfa herpesvirus codifican varias proteínas para suprimir o retrasar la progresión de la infección. Los alfa herpesvirus pueden controlar esta relación sutil entre la apoptosis y la infección viral, promoviendo la supervivencia a largo plazo. Los mecanismos de apoptosis inducidos por los alfa herpesvirus son complicados y pueden involucrar la vía intrínseca y extrínseca.

Figura 1.9: Vías de señalización de la apoptosis. La apoptosis se inicia a través de dos vías diferentes: la vía mitocondrial y la vía del receptor de muerte. La ruta mitocondrial está regulada principalmente por los miembros de la familia de proteínas BCL-2. Las proteínas pro apoptóticas y anti-apoptóticas conducen a una disminución del potencial de membrana mitocondrial y la liberación posterior de citocromo c de las mitocondrias. El citocromo c liberado puede activar posteriormente la caspasa 9, que a su vez activa la caspasa-3. Las señales extrínsecas son iniciadas por los ligandos de muerte celular (FasL, TNF y otros) y activan FADD, que posteriormente escinde la pro-caspasa-8. La escisión de la pro-caspasa-8 inicia el activación de caspasa-8, que luego puede activar directamente caspasas efectoras, incluyendo las caspasa-3 y caspasa-7 (Figura extraída de Zhao y col., 2018).

La infección de células MDBK por BoHV1 puede reducir el MMP y promover la apoptosis; después de que el MMP disminuye, se libera Cyt-c que activa la caspasa-9 (Xu y col., 2012). La familia de proteínas Bcl-2 es importante en la modulación de la integridad de la membrana mitocondrial externa (Zheng y col., 2016). BoHV1 reduce el MMP al disminuir el nivel de la proteína Bcl-2 anti-

apoptótica y al aumentar el nivel de la proteína pro-apoptótica Bax (Xu y col., 2012). Se ha demostrado que el BoHV5 puede inducir diferentes niveles de apoptosis según el tipo celular (Brenner y col., 2012; Garcia y col., 2013; Silva-Frade y col., 2014; Cardoso y col., 2015, 2016). Por ejemplo, en células neuronales, la inducción de apoptosis es evidente (Cardoso y col., 2015). Conocer los mecanismos y los niveles de inducción/inhibición de apoptosis por BoHV1 y BoHV5 es fundamental para entender cómo estos virus modulan su potencial neuropatogénico.

HIPÓTESIS

La encefalitis y la recrudescencia de la reactivación viral en los bovinos infectados por BoHV5 se asocian con la distribución del ADN viral en el sistema nervioso, con los factores inmunológicos locales, los componentes del ciclo celular y con el desencadenamiento de apoptosis neuronal. Estas variables condicionan las diferencias que se observan con respecto a la patogenia de la infección por BoHV1.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el rol que desempeñan la distribución del ácido nucleico viral en el sistema nervioso bovino, los mecanismos de defensa locales, la apoptosis neuronal y los componentes del ciclo celular en la patogenia del alfa herpesvirus bovino 5 para identificar los factores que condicionan la presentación de meningoencefalitis no supurativa y que determinan una reactivación viral sintomática, que permitan establecer las diferencias que existen con la patogenia del alfa herpesvirus bovino 1. Esto permitirá contribuir al desarrollo de nuevas propuestas para la prevención y control de la enfermedad en los rodeos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cuantificar y determinar la distribución del ADN viral en sistema nervioso durante la infección aguda, latencia y reactivación de bovinos experimentalmente infectados con BoHV5 y BoHV1.

2. Determinar la expresión de genes virales en los distintos estadios de la infección por BoHV5 y BoHV1 en diferentes sectores del tejido nervioso para correlacionar la expresión génica viral con los hallazgos inmunológicos y de apoptosis neuronal.

3. Caracterizar la expresión de los TLR y los componentes del ciclo celular en el sistema nervioso de bovinos infectados experimentalmente con BoHV5 durante los distintos estadios de la infección y comparar con los hallazgos en animales no infectados e infectados experimentalmente con BoHV1.

4. Determinación de la presencia de infiltrados de células T citotóxicas en ganglio trigémino y sistema nervioso central bovino durante las distintas etapas de la infección por BoHV5 y BoHV1.

5. Determinar y caracterizar tanto *in vitro* como *in vivo* los efectos de la infección por BoHV5 sobre el desarrollo de apoptosis.

6. Determinar y comparar si la distribución y cantidad de ADN viral, la expresión de los genes virales, los componentes inmunológicos y celulares y la apoptosis en el sistema nervioso bovino se correlacionan con los hallazgos clínicos, virológicos, histopatológicos y moleculares de la infección experimental por BoHV1 y BoHV5 realizadas en este estudio.

2-MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO EXPERIMENTAL

Como se describió previamente, la severidad de los cuadros neurológicos producidos por BoHV5 se debería a una distribución amplia del virus en el SNC y este mismo hecho podría ser el responsable de la sintomatología clínica observada durante la reactivación. Otros factores que podrían determinar o influenciar el potencial neuropatogénico del BoHV5 son el sistema inmunitario local, los mecanismos de apoptosis de las neuronas durante la infección y las alteraciones en los componentes del ciclo celular. Por lo tanto, para analizar el rol de dichos factores en la neuropatogénesis de BoHV5 y establecer comparaciones con BoHV1, se utilizaron muestras adecuadamente conservadas obtenidas en un estudio previo.

PROCEDIMIENTOS GENERALES

2.1. CULTIVOS CELULARES

Para la obtención de los stock virales se utilizaron células Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) crecidas en Minimun Essential Medium (MEM, Gibco BRL) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) libre de virus y anticuerpos (Internegocios, Mercedes, Buenos Aires, Argentina), L-glutamina (10 µl/ml),

penicilina-estreptomicina (10 µl/ml) y anfotericina B (20 µl/ml). Para los estudios de apoptosis se utilizaron células de origen bovino (MDBK y BoTur [células de turbinados bovinos]) y como sustrato de otro origen se seleccionó la línea celular HeLa (células de carcinoma cervical humano) que es susceptible a la infección por BoHV aunque los títulos virales no son elevados. Los cultivos celulares se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂.

2.2. VIRUS

Para todos los estudios se utilizó la cepa de referencia Cooper de BoHV1 y la cepa 97/613 de BoHV5 que se aisló a partir de una muestra de cerebro correspondiente a una hembra Brangus de 2 años de edad, proveniente de un brote de enfermedad a campo, la cual ha sido previamente caracterizada (Pérez y col., 2002). Para los estudios de apoptosis también se incluyó la cepa A663, previamente considerada como una cepa del subtipo *b* de BoHV5 y actualmente re-clasificada como un recombinante natural entre BoHV1 y BoHV5 (Maidana y col., 2017). El título infectivo del stock de virus se determinó por la prueba de microtitulación en placa en células MDBK (Miller y col., 1991) mediante diluciones seriadas en base 10. Las diluciones fueron realizadas en MEM adicionado con 10% de SFB y se inocularon alícuotas de 50 µl/pocillo en placas de 96 pocillos sobre

monocapas de células MDBK. El título del stock viral se determinó a las 72 h de incubación, mediante el método de Reed y Muench (1938) y fue expresado como $\log_{10}$ DICC₅₀/ml.

2.3. PREPARACIÓN DE LOS INÓCULOS VIRALES

Los inóculos virales constaron de 10 ml de BoHV5 o BoHV1 conteniendo 1×10^3 DICC₅₀/ml y $1 \times 10^{6,3}$ DICC₅₀/ml, para los inóculos de baja o alta dosis viral, respectivamente, en medio de mantenimiento para cultivos celulares. Estudios previos indican que inóculos con estas características son capaces de causar la infección aguda y latente en terneros (Narita y col., 1976; Pérez y col., 2002). Los terneros controles fueron inoculados con 10 ml de medio de mantenimiento para cultivos celulares (MEM suplementado con 2% SFB).

2.4. INOCULACIÓN EXPERIMENTAL DE TERNEROS CON BoHV1 Y BoHV5

Para el manejo de los animales se respetaron las normas éticas y los delineamientos y protocolos generales para los ensayos que involucran el uso de los animales de acuerdo a las normas de bienestar animal presentes en el “Acta sobre Bienestar Animal” aprobada por resolución 087/02 por el Consejo

Académico de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNCPBA, y considerando las recomendaciones de la Directiva 2007/43 del Consejo Europeo.

Se utilizaron terneros de 12 meses de edad, provenientes de un rodeo de INTA Balcarce, serológicamente negativos a BoHV1 y BoHV5 de acuerdo a la técnica de seroneutralización en microplaca. Los animales se mantuvieron aislados hasta el momento de las inoculaciones, las cuales se realizaron en los corrales de la ex-Sección Chacra de la UNCPBA. Los terneros fueron asignados al azar a cada grupo y se mantuvieron separados durante toda la etapa experimental. El número de animales utilizados se redujo al mínimo posible que permita obtener resultados válidos y que permita cumplir con los objetivos propuestos en este estudio.

Grupo 1 (Infección aguda): constituido por dos grupos de 2 terneros cada uno, inoculados por aerosolización, con una suspensión viral de título $10^{6,3}$ DICC₅₀/ml de la cepa 97/613 de BoHV5 para un grupo y de la cepa Cooper de BoHV1 para el otro. La eutanasia de estos animales se realizó a los 6 días post-infección (dpi).

Grupo 2 (Latencia): constituido por dos grupos de 2 terneros cada uno, inoculados por aerosolización, con una dosis de 10^3 DICC₅₀/ml de la cepa 97/613

de BoHV5 para un grupo y de la cepa Cooper de BoHV1 para el otro. La eutanasia de estos animales se realizó a los 24 dpi.

Grupo 3 (Reactivación): constituido por dos grupos de 2 terneros cada uno, inoculados por aerosolización con una dosis de 10^3 DICC₅₀/ml de la cepa 97/613 de BoHV5 para un grupo y de la cepa Cooper de BoHV1 para el otro, y fueron sometidos a un estímulo inmunosupresor a partir de los 21 dpi mediante una inyección intravenosa de DXM (0,1 mg/kg PV) y de dos dosis intramusculares a intervalos de 24 y 48 horas de la primera dosis (Inman y col., 2002). La eutanasia de estos animales se realizó a los 2 días de finalizado el tratamiento con DXM.

Grupo 4 (control no infectado): integrado por un grupo de 2 animales el cual constituyó el grupo control para los Grupos 1, 2 y 3. Los terneros se inocularon intranasalmente con medio de mantenimiento para cultivos celulares a modo de placebo. A los 21 dpi, un animal recibió un estímulo inmunosupresor con DXM (0,1 mg/kg PV), como se describió para el Grupo 3. El otro animal se utilizó como control para los Grupos 1 y 2. La eutanasia de estos animales se realizó de acuerdo al esquema planteado para los grupos inoculados con virus.

Para todos los grupos el inóculo viral o el placebo se distribuyeron equitativamente en cada fosa nasal. Al momento de la eutanasia ninguno de los animales presentó sintomatología clínica.

Luego de las inoculaciones experimentales se realizó el seguimiento clínico de los terneros (presencia de secreciones u otro signo clínico y temperatura rectal) y se recolectaron muestras de sangre para determinación de anticuerpos neutralizantes y de secreciones nasales y oculares para aislamiento viral. Todas las muestras se acondicionaron y conservaron apropiadamente para cada uno de los estudios que se realizaron en este trabajo.

2.5. RECOLECCION DE MUESTRAS Y AISLAMIENTO VIRAL A PARTIR DE SECRECIONES NASALES Y OCULARES

Se realizó el aislamiento viral a partir de muestras de secreciones nasales y conjuntivales de los distintos grupos experimentales. Para la recolección de las muestras se utilizaron hisopos de dacrón estériles. Las muestras oculares se obtuvieron por rotación de un hisopo pre-humedecido en solución Hank's 1X, en el saco conjuntival inferior. Las muestras nasales fueron obtenidas siguiendo el mismo procedimiento, a partir de ambas fosas nasales para cada animal con un

mismo hisopo. Para los animales del Grupo 1 se tomaron muestras de secreciones nasales y oculares diariamente hasta el momento de la eutanasia. Para los animales de los grupos 2 y 3 las muestras se tomaron diariamente hasta los 6 dpi y luego cada 3 días. Además, para los animales del Grupo 3, luego de la administración de DXM, las muestras se tomaron diariamente hasta el momento de la eutanasia. Las muestras de secreciones nasales y oculares se conservaron a -80°C hasta el momento de su procesamiento. Para el aislamiento viral las muestras se inocularon por triplicado en células MDBK en placas de 96 pocillos y fueron monitoreadas diariamente para determinar la presencia de efecto citopático (ECP). La identificación de los aislamientos se realizó mediante inmunofluorescencia directa (IFD) como se detalla posteriormente. Para aquellas muestras en las que fue posible aislar el virus, se determinó el título viral según el método de Reed y Muench (1938).

2.6. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO NERVIOSO

Al momento de la necropsia se obtuvieron muestras correspondientes a distintos sectores del tejido nervioso. Para la toma de muestras, el tejido nervioso se cortó transversalmente en 8 secciones de 1-2 cm de espesor para obtener

submuestras representativas de las distintas áreas. Las submuestras (Figura 2.1) corresponden a los siguientes bloques de tejido nervioso:

- A.** Bloque de Corteza Anterior: incluye el tracto olfatorio, corteza frontal y parte anterior de la corteza piriforme.
- B.** Bloque de corteza posterior: incluye la corteza temporal, parietal, occipital y entorrinal, parte posterior de la corteza piriforme, la amígdala y el hipocampo.
- C.** Cerebelo
- D.** Bloque de Médula y Puente: médula espinal cervical; pirámide; puente.
- E.** Bloque del cerebro medio y diencefalo: área talámica.

Además, se recolectaron ambos GTs de cada animal.

Figura 2.1: Secciones y bloques del SNC (Adaptado de Chowdhury y col. 1995).

Las submuestras, conservadas a -80°C , se destinaron al aislamiento viral y extracción de ácidos nucleicos. Submuestras similares se acondicionaron para inmunohistoquímica e histología. Para los estudios que se realizaron en este trabajo se seleccionaron submuestras representativas de tracto olfatorio, corteza frontal y posterior, médula cervical y GT (Figura 2.2).

Figura 2.2: Localización de las submuestras del SNC.

2.7. AISLAMIENTO VIRAL A PARTIR DE MUESTRAS DE TEJIDO

Todas las muestras se prepararon en una solución al 10% en medio para preparación de muestras [MEM, penicilina-estreptomicina ($20\ \mu\text{l/ml}$) y anfotericina B ($20\ \mu\text{l/ml}$)] y fueron disgregadas con homogeneizador tisular. Luego

fueron clarificadas por centrifugación a 1000 xg durante 15 min. Alícuotas de 30 µl del sobrenadante se inocularon por triplicado en células MDBK en placas de 96 pocillos y se incubaron a 37°C y 5% CO₂. Se realizaron un máximo de 4 pasajes en cultivos celulares, de 3 días cada uno. La infección viral fue monitoreada diariamente para determinar la presencia de ECP. Todas las muestras fueron evaluadas por IFD. Para aquellas secciones de tejidos en las que fue posible aislar el virus, se determinó el título infectivo según el método de Reed y Muench (1938) y se expresó como DICC₅₀/g de tejido.

2.8. IDENTIFICACIÓN VIRAL MEDIANTE IFD

Las monocapas celulares inoculadas con las muestras fueron tripsinizadas y resuspendidas en MEM suplementado con 5% SFB. La suspensión celular fue transferida a portaobjetos para IFD y se incubaron en cámara húmeda, en estufa a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente al crecimiento en monocapa, se fijaron en acetona a -20°C durante 20 min, se lavaron 3 veces en PBS 1X y se incubaron en cámara húmeda a 37°C y 5% CO₂ durante 1 h con un conjugado comercial de anticuerpo-fluoresceína bovino para BoHV (210-69 - BHV1, VMRD). Las muestras fueron lavadas 3 veces en PBS 1X, contrateñidas con Azul de Evans, lavadas nuevamente,

montadas con cubreobjetos y examinadas en microscopio de epifluorescencia (OLYMPUS BHB, Japón).

2.9. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

El ADN total se extrajo a partir de homogeneizados de las muestras de tejido nervioso (aproximadamente 100 mg) correspondientes a los distintos sectores descritos en “Procesamiento de las muestras de tejido nervioso”, mediante columnas comerciales adecuadas para la extracción a partir de muestras de tejidos (Dneasy Blood and Tissue Kit, Qiagen Inc., Valencia, CA, USA), según lo recomendado por el fabricante. Para evaluar la eficiencia de la extracción de ADN o la presencia de inhibidores en la reacción de PCR en aquellas muestras en las que no se amplificó BoHV1 o BoHV5 se evaluó la detección de citocromo B, un gen de expresión constitutiva en tejidos bovinos, usando los cebadores descritos por Santaclara y col. (2007) que se detallan en la tabla 2.1. Además, la integridad del ADN obtenido fue corroborada mediante electroforesis en gel de agarosa 1,8%. La cantidad de ADN total en la muestra se determinó según la absorbancia a 260 nm y se obtuvo también el coeficiente 260/280 utilizando un espectrofotómetro para microplacas Epoch (BioTeK, Winooski, VT, USA).

2.10. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ARN

El ARN total se extrajo mediante el empleo de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), según las recomendaciones del fabricante. Se colocaron aproximadamente 100 mg de tejido en un tubo de 1,5 ml libre de nucleasas, se adicionaron 700 μ l de Trizol (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) y se homogeneizó el tejido para facilitar la lisis. Posteriormente, se incubó la solución homogeneizada durante 5 min a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas. Se añadió a cada tubo 0,2 volúmenes de cloroformo, se mezcló vigorosamente durante 15 seg y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó la mezcla a 12.000 xg a 4°C durante 15 min. Esta centrifugación permitió la separación de la solución en distintas fases; una fase orgánica inferior rosada, una interfase y una fase acuosa incolora superior donde se encuentra el ARN total. Para la precipitación del ARN, se transfirió cuidadosamente la fase acuosa a un tubo nuevo de 1,5 ml libre de nucleasas, se agregaron 500 μ l de isopropanol y 2 μ l de glicógeno (Ambion, Applied Biosystems, USA) y se mantuvieron las muestras toda la noche a -20°C para facilitar su precipitación. Luego, se centrifugó a 12.000 xg a 4°C durante 15 min y se procedió al lavado del pellet de ARN. Para esto se

descartó el sobrenadante, se adicionó 1 ml de etanol 75% y se mezcló con vortex. Las muestras fueron centrifugadas a 4°C durante 5 min a 7500 xg, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet de ARN a temperatura ambiente de 10 a 20 min, sin permitir que se secase totalmente. Por último, se resuspendió el ARN en 50 µl de agua libre de nucleasas y se incubó por 10 min a 55°C. El ARN total se cuantificó por absorbancia a 260 nm y se obtuvo también el coeficiente 260/280 utilizando un espectrofotómetro para microplacas Epoch (BioTeK, Winooski, VT, USA).

2.11. TRATAMIENTO DEL ARN CON DNAsa I

El tratamiento con la enzima DNAsa I elimina cualquier traza de ADN que pueda contaminar la muestra de ARN. La digestión con dicha enzima se llevó a cabo en un volumen de 18 µl, conteniendo 1,5 µg de RNA, 1X buffer de reacción de DNAsa I, RNAsin y 0,5 U DNAsa (DNase I Amplification Grade, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Las muestras se incubaron durante 30 min a 37°C y luego se detuvo la reacción mediante el agregado de 2 µl de EDTA 25 mM (pH 8) (volumen final de reacción: 20 µl). Posteriormente, se inactivó la DNAsa I incubando a 65°C por 10 min.

2.12. RETROTRANSCRIPCIÓN

La síntesis de ADNc se realizó mediante el uso de la retrotranscriptasa MMLV (Promega, Madison, WI, USA) a partir de 675 ng del ARN tratado con DNAsa I en un volumen final de 20 μ l. Se incubó el ARN junto a 240 ng de hexámeros al azar (Promega, Madison, WI, USA) a 70°C durante 10 min y se dejó la mezcla a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente se agregaron el buffer de la enzima M-MLVRT (1X), 2 mM dNTPs, 20 U RNAsin y 200 U M-MLVRT (Promega, Madison, WI, USA) y se incubó 1 h a 37°C. El ADNc obtenido se almacenó a -20°C hasta su utilización. En todas las reacciones de retrotranscripción se incluyó un control sin ARN y un control negativo de retrotranscripción sin la enzima retrotranscriptasa.

2.13. HISTOLOGÍA

Submuestras de los mismos tejidos descriptos anteriormente se fijaron en formalina bufferada al 10% y se remitieron para el posterior procesamiento mediante deshidratación e inclusión en parafina, corte a 5 μ m y tinción con hematoxilina-eosina (Luna, 1968).

2.14. INMUNOHISTOQUÍMICA

Para los estudios inmunohistoquímicos se utilizaron submuestras representativas de cada sector del SNC y GT como se describió previamente, incluidas en parafina. Al momento del procesamiento, las secciones fueron desparafinadas a 65°C por 20 min. Luego las secciones de tejido se colocaron en xileno (2 veces X 10 min) y se hidrataron en series de etanol de la siguiente manera: etanol 100% (2 veces X 5 min), etanol 90% (1 vez X 5 min) etanol 70% (1 vez X 5 min) y posteriormente se lavaron en agua destilada (2 veces X 5 min) seguido de inmersión en TBS 1X/Triton 0,025% (3 veces X 5 min). Luego, las secciones se incubaron en una solución de peróxido de hidrógeno (Sigma, H1009) al 0,03% en PBS a temperatura ambiente para bloquear la peroxidasa endógena, seguida de lavados en TBS 1X (3 veces X 5 min). Como método de recuperación antigénica se utilizó proteinasa K diluida en Tris 5 mM pH 7,6 durante 15 min a 37°C. Luego de dicha incubación las secciones de tejido se lavaron en TBS 1X/Triton 0,025% (3 veces X 5 min). Para el bloqueo se utilizó leche descremada al 5% preparada en TBS y se incubó durante 45 min a temperatura ambiente. Las secciones se lavaron en TBS 1X/Triton 0,025% (3 veces X 5 min) y se incubaron toda la noche en cámara húmeda a 4 °C con el anticuerpo primario

correspondiente. Luego de la incubación se realizaron los lavados en TBS 1X/Triton 0,025% (3 veces X 5 min) y se agregó el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de acuerdo al antígeno a detectar, durante 1 h a temperatura ambiente. Finalizada la incubación se adicionó el sustrato para el revelado (DAB substrate kit for peroxidase, Vector SK-400), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Las secciones de tejido se mantuvieron a temperatura ambiente, en la oscuridad, se observaron hasta el desarrollo de la coloración y se lavaron en agua destilada por 5 min. La contratinción se realizó con hematoxilina o verde de metilo. Una vez secos, los portaobjetos se montaron para su visualización en microscopio óptico y se procedió al registro fotográfico.

2.15. ESTUDIOS ESPECÍFICOS

A partir del acondicionamiento de las submuestras de tejido nervioso de acuerdo a lo descrito en “PROCEDIMIENTOS GENERALES” se llevaron a cabo los siguientes estudios específicos:

2.15.1. PCR EN TIEMPO REAL CON HIGH RESOLUTION MELTING (HRM) PARA EL ANÁLISIS DE DISTRIBUCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN VIRAL EN TEJIDO NERVIOSO BOVINO.

Para la detección del genoma viral se realizaron reacciones de PCR en Tiempo Real con “High Resolution Melting” para detectar simultáneamente y diferenciar el ADN de BoHV1 y BoHV5 utilizando cebadores que amplifican un fragmento de 189 pb del gen de la ADN polimerasa de BoHV1 y BoHV5 (Diallo y col., 2011; Marin y col., 2014a). Los ensayos de PCR en Tiempo Real se realizaron en un termociclador Rotor Gene Q, en un volumen final de 20 µl utilizando EvaGreen como marcación fluorescente intercalante (KAPA HRM FAST Master Mix, Biosystems, Woburn, USA). El programa de ciclado consistió en una desnaturalización inicial de 3 min a 95°C y 50 ciclos de 15 seg a 95°C, 15 seg a 58°C y 2 seg a 72°C. Después de la amplificación, se realizó un análisis de la curva HRM. En el módulo de genotipificación del programa se estableció un valor de corte de confianza del genotipo de un 93 %. Las temperaturas de fusión de BoHV1 y BoHV5 fueron 89,7°C y 91,1°C, respectivamente.

2.15.2. RT-PCR EN TIEMPO REAL PARA EL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS TLR EN EL SISTEMA NERVIOSO BOVINO

Las reacciones de RT-PCR en Tiempo Real para los genes bovinos TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 se llevaron a cabo en pocillos separados utilizando cebadores y sondas descritos por Marin y col. (2014b). Se utilizó como control la expresión de del gen endógeno, Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa (GAPDH) (McGuire y col., 2004) (Tabla 2.1).

Tabla 2.1: Cebadores y sondas utilizados para la detección del ARNm de los TLR mediante Real Time RT-PCR.

CEBADOR	SENTIDO DEL CEBADOR	TAMAÑO DEL AMPLICON (pb)	SECUENCIAS 5' - 3'
GAPDH	F	112	TTCTGGCAAAGTGGACATCGT
	R		CTTGACTGTGCCGTTGAACTTG
	SONDA		ACATGGTCTACATGTTCCAGTATGATTCCACCC
TLR3	F	143	CAGGTCAACAGTCCCGAA
	R		GCAGCACATTCCCCACAT
	SONDA		ACAGTAAGTGAAGGCAAAACCATGAGCAGA
TLR7	F	144	TAAAACTCTGCCCTGTGATG
	R		CCTGCTATGTGGTTAATGGT
	SONDA		ATTCCTGCCAATGCCACCAAC
TLR8	F	117	TTATTGCAGAATGTAATGGTCG
	R		GAAAGGATTCATTGTTACCC
	SONDA		ACCCCAAACAGTGGACAAAGATGTGACG
TLR9	F	113	AACCTGCCCCGCCAGACCT
	R		GCCAGGGCCACTGCCAGTG
	SONDA		ATTCCCTGTCATGGGCCCTACTGTGCCCC
CITOCROMO B	VAC1	131	ATTAAGGACATCTTAGGGGCCCTCT
	VAC2		GGGTTTGATGTGAGGGGGTGTGTTG

F: cebador "sentido"; R: cebador "antisentido"

Las determinaciones se realizaron por duplicado utilizando una mezcla preformada y optimizada de todos los componentes de la reacción exceptuando cebadores, sonda, molde y agua (AmpliAq Gold DNA polimerasa [Thermo Fisher Scientific, Argentina], enzima Amp Erase UNG [Thermo Fisher Scientific, Argentina], dNTPs con dUTP, referencia pasiva y buffer optimizado de PCR), en un volumen final de 25 µl. Las reacciones de PCR contuvieron 800 nM de los

cebadores sentido y anti-sentido específicos, 200 nM de la sonda específica, 1X PCR Mastermix (TaqMan Universal PCR Mastermix, Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA) y 1,5 µl de la muestra de ADNc. La detección del producto amplificado se monitoreó en un equipo Applied Biosystems 7500 que mide el aumento de la fluorescencia en cada ciclo de PCR causado por la unión de la sonda al ADN de doble cadena y su posterior degradación por la polimerasa. El programa de ciclado consistió en un paso inicial de 2 min a 50°C, el cual es requerido para la actividad óptima de la enzima Amp Erase UNG, desnaturalización inicial y activación de la AmpliTaq Gold DNA polimerasa de 10 min a 95°C y 45 ciclos de 20 seg a 95°C y 1 min a 60°C. Se incluyeron en todos los casos controles negativos de la síntesis de ADNc (reacción de retrotranscripción en la cual se omitió la M-MLVRT) y de los procedimientos de PCR (conteniendo todos los reactivos de la reacción y sustituyendo el molde de ADNc por agua). Para la determinación de los niveles relativos de expresión de cada receptor se aplicó el método de cuantificación relativa. Los resultados se expresan como el valor medio en la variación (aumento o disminución) de los niveles de ARNm de los TLR en las muestras de tejido nervioso pertenecientes a los animales infectados con respecto

a los correspondientes a los animales no infectados, los cuales sirvieron como grupo control.

2.15.3. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES VIRALES EN MUESTRAS DE GANGLIO TRIGÉMINO Y SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

La expresión de genes virales representativos de la cinética inmediata temprana (bICP4), temprana (TK) y tardía (gD, gB) se analizó mediante RT-PCR utilizando los cebadores que se describen en la Tabla 2.2. La síntesis de ADNc se realizó como se describió previamente en “PROCEDIMIENTOS GENERALES”. Reacciones sin transcriptasa reversa se utilizaron como control de contaminación con ADN. Se incluyeron además controles negativos (cDNA de los animales no infectados y cDNA de células MDBK sin infectar) y controles positivos (cDNA de células MDBK infectadas con BoHV1 Cooper y BoHV5 97/613).

Tabla 2.2: Cebadores utilizados para la detección del ARNm de los genes virales de cinética inmediata temprana, temprana y tardía en tejido nervioso de bovinos infectados con BoHV1 y BoHV5 mediante RT-PCR.

CEBADOR	SENTIDO	TAMAÑO DEL AMPLICÓN (pb)	SECUENCIA 5' - 3'
GAPDH	F	112	TTCTGGCAAAGTGGACATCGT
	R		CTTGACTGTGCCGTTGAACTTG
BoHV5-bICP4	F	442	CTGAAGCTGAAGCCGAAGC
	R		CCCAGTCCCTAAATCCAGT
BoHV1-bICP4	F	151	GCGCGTGGTGCTCTCCTC
	R		CCCTCCCTCCCTTCCCGCG
BoHV5-TK	F	285	GCGCACGATGTTCCCTAC
	R		GTCAAACACGAGGGTCACG
BoHV1-TK	F	197	GCCTGTGTAGTTGGTGCTGCGGC
	R		GCCGAGTCCCGTAAGGCGAT
BoHV5-gB	F1	444	CCAGTCCAGGCAACCGTCAC
	R1		CTCGAAAGCCGAGTAGCTGCG
	F2	273	GTGGTGGCCTTTGACCGCGAC
BoHV1-gD	R2		GCTCCGGCGAGTAGCTGGTGTG
	F1	468	GCTGTGGGAAGCGGTACG
	R1		GTCGACTATGGGCCTTTGTGC
	F2	325	ACGGTCATATGGTACAAGTCGAGAGCG
	R2		CCAAAGGTGTACCCGCCGCGAGCC

F: cebador sentido; R: cebador anti-sentido. 1 y 2 indican primera y segunda ronda de amplificación en las reacciones de PCR anidada.

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 25 μ l y para los ciclados se utilizó un termociclador Verity (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Las reacciones de PCR para bICP4 de BoHV1 y TK de BoHV1 y BoHV5 contuvieron buffer 1X, $MgCl_2$ 5 mM, dNTPs 0,4 mM, cebadores 10 picomolar (pm), 0,5 U Taq polimerasa, DMSO 8% y agua. Las condiciones de ciclado fueron de 1

ciclo a 95°C por 5 min seguido de 42 ciclos a 94°C 1 min, 62°C 1 min y 72°C 2 min. La extensión final fue a 72°C durante 7 min. Los cebadores para la amplificación de bICP4 y TK de BoHV1 fueron descritos previamente por Schang y Jones (1997).

Para la amplificación de bICP4 de BoHV5 la mezcla de PCR contuvo buffer 1X, MgCl₂ 3 mM, dNTPs 0,4 mM, cebadores 10 pm, 0,5 U Taq polimerasa, DMSO 10% y agua y las condiciones de ciclado fueron de 1 ciclo a 94°C por 5 min seguido de 42 ciclos a 94°C 1 min, 56°C 1 min y 72°C 1 min. La extensión final fue a 72°C durante 7 min.

Para determinación de la expresión de genes tardíos se utilizaron cebadores que amplifican el gen de la glicoproteína D (gD) de BoHV1, de acuerdo a la PCR anidada descrita por Wang y col. (2001), y a la PCR anidada para gB de BoHV5 (Mayer y col., 2006). Para la amplificación de la gD de BoHV1, la reacción de PCR consistió en buffer 1X, MgCl₂ 2,5 mM, dNTPs 0,4 mM, cebadores 10 pm, 0,5 U Taq polimerasa, DMSO 8% y agua. Las condiciones de ciclado para la primera amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo a 95°C por 5 min seguido de 22 ciclos a 94°C 1 min, 59°C 1 min y 72°C 1:30 min. La extensión final se realizó a 72°C for 7 min. Para la segunda amplificación se utilizaron 2 µl del producto de la primera

ronda y las condiciones para la segunda amplificación fueron similares aunque la temperatura de annealing se estableció en 62°C.

Para detección del gen gB de BoHV5 la mezcla de PCR consistió en buffer 1X, MgCl₂ 1 mM, dNTPs 0,4 mM, cebadores 10 pm, 0,5 U Taq polimerasa, DMSO 10% y agua. Las condiciones de ciclado para la primera amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo a 94°C por 10 min seguido de 35 ciclos a 94°C 1 min, 56°C 40 seg y 72°C 40 seg. La extensión final se realizó a 72°C por 7 min. Para la segunda amplificación se utilizaron 2 µl del producto de la primera ronda y las condiciones fueron similares aunque se realizaron 20 ciclos de amplificación.

2.15.4. DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE LINFOCITOS T CD8⁺ EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y GANGLIO TRIGÉMINO

El análisis inmunohistoquímico para la detección de linfocitos T citotóxicos se realizó en cortes de tejidos seccionados a 5 µm. El procedimiento general para la inmunohistoquímica se describió previamente en “PROCEDIMIENTOS GENERALES”. Para este caso se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-CD8 (anti-CD8 BAQ 111A, Monoclonal Antibody Center, USA) y un anticuerpo anti-ratón marcado con peroxidasa (Invitrogen, USA, cat. 62-6620).

2.15.5. EXPRESIÓN DE LOS COMPONENTES DEL CICLO CELULAR DURANTE LA INFECCIÓN POR BoHV1 y BoHV5

Las reacciones de RT-PCR en tiempo real para ciclinas A2, B1 y E1 se realizaron utilizando 800 nM de los cebadores específicos (Tabla 2.3), 1X PCR Master Mix (FastStart Universal SYBR Green Master Rox, Roche, Mannheim, Alemania) y 1 µl de ADNc en un volumen final de 20 µl. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un ciclador Applied Biosystems 7500. Se utilizó como control de expresión al gen endógeno GAPDH (McGuire y col., 2004). Las muestras se analizaron por duplicado y se incluyeron controles negativos para la síntesis de ADNc y para los procedimientos de PCR, como se describió en “PROCEDIMIENTOS GENERALES”. Luego de la amplificación, se realizó el análisis de la curva de fusión, que resultó en una curva específica del producto. La eficacia de la amplificación se determinó para cada gen utilizando diluciones seriadas en base 10 del ADNc. Los resultados se presentan como la variación promedio de los niveles de transcripción de las ciclinas en los tejidos de animales infectados sobre los niveles detectados en terneros no infectados. El análisis de la expresión relativa se realizó utilizando la herramienta de software de expresión relativa REST (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA).

Tabla 2.3: Cebadores utilizados para determinar la cuantificación relativa de ARNm de las ciclinas A2, B1 y E2 en tejido nervioso de bovinos infectados con BoHV1 y BoHV5 mediante Real time RT-PCR.

CEBADOR	SENTIDO	TAMAÑO DEL AMPLICON (pb)	SECUENCIAS 5' - 3'
GAPDH	F	112	TTCTGGCAAAGTGGACATCGT
	R		CTTGACTGTGCCGTTGAACTTG
CICLINA A2	F	585	GTACCAGACTACCATGAGGAC
	R		TCCTGTGACTGTGTAGAGTGC
CICLINA B1	F	370	AATCGGTGACTTTGCCTTTG
	R		GACCACATTCTTTGCCAGGT
CICLINA E1	F	248	TTCCTGCTGAAGATGCACAC
	R		GCAGTCGACAGGAGAGAACC

F: cebador "sentido"; R: cebador "anti-sentido".

2.15.6. EXPRESIÓN DE PERFORINA Y ENZIMAS CITOLÍTICAS (GRANZIMAS A Y B)

Se determinó que en las lesiones producidas por HSV en humanos se encuentran linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ con actividad citolítica (Dobbs y col., 2005). Sin embargo, el rol de los mecanismos inmunológicos citolíticos y no citolíticos no se ha analizado en las infecciones por BoHV.

En este estudio se determinó la expresión de enzimas citolíticas en los tejidos infectados con BoHV1, BoHV5 y no infectados mediante RT-PCR con cebadores específicos para perforina y granzimas A y B (Tabla 2.4). Como control de la expresión de estos genes la RT-PCR se realizó con ARN extraído de leucocitos sanguíneos no estimulados.

Tabla 2.4: Cebadores utilizados para determinar la expresión de granzimas A y B y perforina en tejido nervioso de bovinos infectados con BoHV1 y BoHV5 mediante RT-PCR.

CEBADOR	SENTIDO	TAMAÑO DEL AMPLICON (pb)	SECUENCIA 5´-3´
GAPDH	F	112	TTCTGGCAAAGTGGACATCGT
	R		CTTGACTGTGCCGTTGAAGCTG
GRANZIMA A	F	113	TGGCCCCTCACACAAGACGC
	R		GCCCTTCAGGTCACAATGAGCGG
GRANZIMA B	F	226	CTCACTGCCTGGGAAGCTCAATC
	R		GGCTTCACCTCCGCCAAGCTC
PERFORINA	F	127	GTCCGTGTGACAGTGGCGGG
	R		GCACCAGGTGAAACTGTAAAAGC

F: cebador sentido; R: cebador anti-sentido.

La RT-PCR se realizó como se describió previamente en “PROCEDIMIENTOS GENERALES”. Las reacciones de PCR para las granzimas y perforina consistieron en buffer 1X, MgCl₂ 4 mM, dNTPs 0,4 mM, cebadores 10 pm, 0,5 U Taq polimerasa, DMSO 10% y agua. Las condiciones de ciclado fueron de 1 ciclo a 95°C por 5 min seguido de 35 ciclos a 94°C 1 min, 58°C 1 min y 72°C 1:20 min. La extensión final fue a 72°C durante 7 min.

2.15.7. EVALUACIÓN DE LA APOPTOSIS *IN VITRO*

2.15.7.1. CULTIVOS CELULARES

Para los estudios de apoptosis, se utilizaron dos líneas celulares de origen bovino, MDBK y BoTur y una línea celular humana (HeLa). Como se indicó previamente, estas líneas celulares se seleccionaron para comparar sustratos de

uso rutinario para la replicación de los herpesvirus bovinos (MDBK y BoTur), con otras células que son susceptibles a la infección pero que no mantienen niveles altos de replicación del BoHV, como las células HeLa. Los cultivos celulares se mantuvieron como se indicó en “PROCEDIMIENTOS GENERALES”.

2.15.7.2. INOCULACIÓN DE LOS CULTIVOS CELULARES.

Las líneas celulares se cultivaron en placas de 24 pocillos (NEST Scientific, China) a una densidad de 0.5×10^5 células/pocillo, sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro para la adhesión celular. Las células se infectaron con las cepas de BoHV1 o BoHV5 a una multiplicidad de infección (moi) = 0,1. Las células también fueron tratadas con deoxinivalenol (DON, Sigma-Aldrich) (2,8 µg/ml en MEM), luz ultravioleta durante 3 min y dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) al 5 %, como controles para la inducción de la apoptosis. DON es una micotoxina capaz de inducir apoptosis en células intestinales e inmunitarias (Awad y col., 2004) y en varias líneas de cultivo celular (Pérez Gaudio y col., 2016). La apoptosis inducida por el tratamiento con DMSO también se ha descrito previamente (Guo y col., 2009).

De acuerdo a los distintos ensayos, las evaluaciones de apoptosis se realizaron a las 6 o 24 h después de la inoculación (hpi). La evaluación a las 6 horas

se eligió como punto de partida para determinar las alteraciones iniciales en la morfología nuclear después de la infección o el tratamiento químico. Las cepas virales, el DMSO y el DON se agregaron a la monocapa de células preformadas y se incubaron durante 1 h a 37 °C. Luego, las células se lavaron con PBS 1X y se añadió medio de cultivo suplementado con 2% SFB durante el tiempo de incubación restante.

2.15.7.3. DETERMINACIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN

El patrón de fragmentación del ADN en una célula apoptótica se puede detectar mediante la extracción de ADN y posterior separación mediante electroforesis en gel de agarosa. En dichos geles deben observarse bandas de 180 a 200 pares de bases (Elmore, 2007) que constituyen una característica distintiva de la muerte celular por apoptosis. La presencia de fragmentos oligonucleosomales de ADN indicativos de apoptosis celular se determinó en células infectadas, tratadas y sin infectar de acuerdo a lo descrito previamente.

Para este análisis, se colectaron las células y sobrenadante, se centrifugaron y se utilizaron los pellets de células, las cuales fueron lisadas en 0,5 ml de buffer de lisis (10 mM Tris -pH 7.4), 5 mM EDTA, 0,2% Triton) en tubos de 1,5 ml que se agitaron vigorosamente durante 30 seg y se incubaron en hielo durante 30 min.

Luego se centrifugaron a 27.000 xg durante 30 min. Al sobrenadante se le agregaron 50 µl de NaCl 5 M frío y se agitó durante 20 seg. Para la precipitación del ADN se agregaron 600 µl de etanol y 150 µl de acetato sodio 3 M pH 5,2. Se incubó durante 1 h a -80°C y se centrifugó a 20.000 xg durante 20 min. Los pellets se re-disolvieron en 400 µl de buffer de extracción (Tris 10 mM y EDTA 5 mM), se le adicionaron 2 µl de DNasa-libre de RNasa (10 mg/ml) y se incubaron durante 5 h a 37°C. Luego se agregaron 25 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y 40 µl de buffer (Tris 100 mM pH=8,0, EDTA 100 mM, NaCl 250 mM) y se incubó toda la noche a 65°C. Se extrajo el ADN con fenol/cloroformo/isoamil alcohol (25:24:1) y se precipitó con etanol. Los pellets fueron resuspendidos en 20 µl Tris-acetato – EDTA suplementados con 2 µl de buffer de corrida (azul de bromofenol 0,25%, glicerol 30%). Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1,5%, se tiñeron con SyBR Safe (0,1 mg/ml) y se observaron en transiluminador. El tamaño de los fragmentos fue determinado mediante comparación de la movilidad con un marcador de 100 pares de bases.

2.15.8. DETECCIÓN DE APOPTOSIS IN SITU EN CÉLULAS Y TEJIDO NERVIOSO

2.15.8.1. DETERMINACIÓN DE LA MORFOLOGÍA NUCLEAR MEDIANTE TINCIÓN CON 4',6-DIAMINO-2-FENILINDOL (DAPI). IDENTIFICACIÓN DE CAMBIOS NUCLEARES EN CULTIVOS CELULARES.

Los cambios morfológicos nucleares (condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y presencia de cuerpos apoptóticos) se evaluaron mediante tinción con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) después de fijar las células con paraformaldehído al 4%. Los experimentos se realizaron por triplicado y se contaron las células con alteraciones nucleares en seis campos microscópicos por muestra. Se determinaron los porcentajes de células con morfología nuclear alterada.

2.15.8.2. DETERMINACIÓN DE CÉLULAS APOPTÓTICAS MEDIANTE TUNEL (TERMINAL DEOXYNUCLEOTIDYL TRANSFERASE dUTP NICK END LABELING)

Para la detección de células con ADN fragmentado, se realizó el ensayo de TUNEL (DeadEndColorimetric TUNEL System, Promega, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los cambios morfológicos nucleares y la

fragmentación del ADN no siempre ocurren como un evento paralelo. Se considera que la digestión del ADN es un proceso tardío durante la apoptosis (Maruyama y col., 2000) y la confirmación de este evento requiere usualmente de la utilización de más de una técnica. Mediante la técnica de TUNEL, la enzima Deoxinucleotidil Transferasa Terminal (DTT) incorpora nucleótidos biotinilados en el 3'-OH de los extremos de los fragmentos del ADN. Para este estudio se utilizaron células MDBK, las cuales se sembraron en cubreobjetos en placas de 24 pocillos. A las 24 hpi las células se fijaron con paraformaldehído al 1 %. Los experimentos se realizaron por duplicado y se contaron las células TUNEL positivas en seis campos microscópicos.

2.15.8.3. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA LA DETECCIÓN DE LA CASPASA 3 ESCINDIDA EN MUESTRAS DE TEJIDO NERVIOSO

La caspasa 3 está presente en las células como una pro-caspasa inactiva que es activada mediante escisión proteolítica. Dicha caspasa es un ejecutor clave en la apoptosis (Chang y Yang, 2000). Las secciones de tejido se desparafinaron y se rehidrataron en series de distinto grado de etanol como se describió en “PROCEDIMIENTOS GENERALES”. Como anticuerpo primario se utilizó un anticuerpo policlonal anti-caspasa 3 escindida (Cell Signaling, cat. 9661) y como

anticuerpo secundario un anticuerpo anti-conejo marcado con peroxidasa (LETH, ARGENTINA).

2.16. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el estudio de cambios morfológicos nucleares mediante tinción con DAPI se evaluaron las diferencias en los porcentajes de células con cambios nucleares para cada virus o tratamiento dentro de una línea celular y entre las diferentes líneas celulares. Los títulos para las diferentes cepas de alfa herpesvirus bovino también se evaluaron en las diferentes líneas celulares. Los porcentajes de células con cambios nucleares y títulos virales se analizaron por ANOVA seguido de la prueba de Tukey. Un valor de $p \leq 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

3-RESULTADOS

Como se describió en Materiales y Métodos, las muestras de sistema nervioso analizadas en este trabajo se obtuvieron durante la necropsia de animales infectados experimentalmente para un estudio previo. A continuación se describen brevemente los hallazgos clínicos, serológicos y de aislamiento viral en secreciones nasales y oculares de los terneros inoculados.

3.1. MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y AISLAMIENTO VIRAL EN SECRECIONES NASALES Y OCULARES EN LOS TERNEROS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON BoHV1 Y BoHV5

En la etapa de infección aguda se observaron secreciones nasales en los terneros inoculados con BoHV1 desde el día 1 al 5 pi y hasta los 6 dpi en el caso de la infección por BoHV5 (Figura 3.1.A). Tanto BoHV1 como BoHV5 se aislaron en secreciones nasales desde el día 1 pi hasta los 6 dpi, momento en que se llevó a cabo la eutanasia. Los títulos virales variaron de $10^{4,8}$ a $10^{6,8}$ DICC50/ml para ambos virus. La presencia de secreciones oculares fue evidente a los 2 y 3 dpi en los terneros infectados con BoHV1 y al tercer día de la inoculación con BoHV5. Sin embargo, en estas secreciones ambos virus se aislaron a los 5 y 6 dpi con títulos que variaron entre $10^{4,8}$ a $10^{5,9}$ DICC50/ml (Figura 3.2.A).

Figura 3.1.A: Presentación de secreciones nasales y oculares entre el día 1 post-infección y los 6 dpi en animales inoculados con una dosis alta ($10^{6,3}$ DICC₅₀/ml) de BoHV1 y BoHV5 (Infección aguda).

Los terneros inoculados con el inóculo de dosis baja (Grupo 2) no presentaron secreciones abundantes. En el caso de los animales inoculados con BoHV1, se observaron secreciones nasales de forma intermitentemente, particularmente entre los 11 y 16 dpi y en los inoculados con BoHV5, las secreciones nasales estuvieron presentes hasta el día 20 pi (Figura 3.1.B). Como era esperado, estos animales no excretaron virus una vez establecida la latencia (11 dpi para BoHV1 y 18 dpi para BoHV5) (Figura 3.2.B). Los terneros del Grupo 3 inoculados con BoHV1 y BoHV5 que recibieron un tratamiento con DXM para inducir la reactivación a los 21 dpi, presentaron secreciones nasales a los 23 y 24 dpi y no se observaron secreciones oculares (Figura 3.1.C). Los animales de este

grupo excretaron BoHV5 o BoHV1 entre los 23 y 24 dpi, con títulos de 10^5 DICC₅₀/ml para BoHV5 y de $10^{1,7}$ a $10^{1,9}$ DICC₅₀/ml para BoHV1 (Figura 3.2.C).

Figura 3.1.B: Presentación de secreciones nasales y oculares entre los 8 y 20 dpi en animales inoculados con una dosis baja (10^3 DICC₅₀/ml) de BoHV1 y BoHV5 (Infección latente).

Figura 3.1.C: Presentación de secreciones nasales y oculares en animales inoculados con una dosis baja (10^3 DICC₅₀/ml) de BoHV1 y BoHV5 y tratados con DXM para inducir la reactivación a partir del día 21 post infección.

Ninguno de los animales inoculados ni los animales del Grupo 4 (controles no infectados) manifestó signos respiratorios o neurológicos. No hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) en las temperaturas rectales durante la infección aguda.

Entre los 9 y 16 dpi, los animales infectados con BoHV5 tuvieron temperaturas significativamente más elevadas ($p < 0,05$) que los animales sin infectar. Para los terneros inoculados con BoHV1 estas diferencias fueron evidentes a los 9 y 13 dpi. Los animales inoculados con BoHV1 y BoHV5 presentaron temperaturas rectales más elevadas ($p < 0,05$) que el ternero control a los 22 y 23 dpi.

Figura 3.2.A: Títulos de BoHV1 y BoHV5 en secreciones nasales y oculares de los animales inoculados con una dosis viral alta ($10^{6,3}$ DICC₅₀/ml). Aquellas muestras en las que no se aisló el virus se representan con un valor de 0,2 para mostrar las barras. SN: Secreción Nasal; SO: Secreción Ocular.

Figura 3.2.B: Títulos de de BoHV1 y BoHV5 en secreciones nasales y oculares de los animales inoculados con una dosis viral baja (10^3 DICC₅₀/ml). Aquellas muestras en las que no se aisló el virus se representan con un valor de 0,2 para mostrar las barras. SN: Secreción Nasal; SO: Secreción Ocular.

Figura 3.2.C: Títulos de de BoHV1 y BoHV5 en secreciones nasales y oculares de los animales inoculados con una dosis viral baja (10^3 DICC₅₀/ml) y tratados con DXM para inducir la reactivación. Aquellas muestras en las que no se aisló el virus se representan con un valor de 0,2 para mostrar las barras. SN: Secreción Nasal; SO: Secreción Ocular.

3.2. ANÁLISIS SEROLÓGICO DE LOS ANIMALES INOCULADOS

Todos los animales eran serológicamente negativos a BoHV1 y BoHV5 al momento de la inoculación. Se observó seroconversión a los 6 dpi (título 1:32) en uno de los animales del Grupo 1 (infección aguda) inoculado con BoHV5, mientras que no se detectó seroconversión en los animales inoculados con BoHV1 (título 1:8) (Tabla 3.1). Del mismo modo, los animales inoculados con una dosis baja de BoHV5 (Grupo 2, latencia) seroconvirtieron a los 6 dpi (1:32), alcanzando títulos de 1:256 a los 24 dpi. En el caso de BoHV1, en este estadio de la infección, el título máximo alcanzado fue de 1:128, detectándose seroconversión a los 24 dpi. En el Grupo 3 (reactivación), el título máximo de anticuerpos neutralizantes alcanzado en los animales inoculados con BoHV5 fue de 1:32 a los 25 dpi y habían seroconvertido a los 22 dpi. Los animales de este grupo inoculados con BoHV1 alcanzaron un título de 1:64 a los 22 dpi, momento en el que se observó seroconversión (Tabla 3.1). Los animales control (Grupo 4) se mantuvieron seronegativos durante todo el período experimental.

Tabla 3.1: Rango en el título de anticuerpos neutralizantes en las distintas etapas de la infección de terneros inoculados con BoHV1 y BoHV5 y sin infectar.

ETAPA DE INFECCIÓN	VIRUS	DÍAS POST INFECCIÓN					
		0	6	13	22	24	25
AGUDA	BoHV5	S/Ac	8-32	-	-	-	-
	BoHV1	S/Ac	8	-	-	-	-
LATENCIA	BoHV5	S/Ac	4-8	8-16	32-256	128-256	-
	BoHV1	S/Ac	8	16	16-64	16-128	-
REACTIVACION	BoHV5	S/Ac	4	8	16-32	-	32
	BoHV1	S/Ac	4-8	8-16	64	-	16
	CONTROL	S/Ac	S/Ac	-	-	-	-
	CONTROL+DXM	S/Ac	S/Ac	-	-	-	-

S/Ac: Sin anticuerpos.

3.3. PRESENCIA DE LESIONES MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS EN TERNEROS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON BoHV1 Y BoHV5.

No se observaron lesiones en el grupo control inoculado con placebo (Figura 3.3.A) ni lesiones severas en ninguno de los animales inoculados. En los terneros inoculados con BoHV5 a una dosis alta (infección aguda) se observaron hemorragias en la duramadre, congestión de los vasos cerebrales y coloración oscura en lóbulo frontal (Figura 3.3.B). Además se observaron hemorragias en linfonódulo retrofaríngeo y petequias en las tonsilas, mientras que los terneros inoculados con BoHV1 presentaron congestión en el lóbulo frontal, presencia de secreciones amarillentas en cornetes nasales y congestión en tráquea y mucosa

nasal. En los animales del Grupo 2 (latencia) no se observaron lesiones macroscópicas (Figura 3.3.C) y en los terneros del Grupo 3 (reactivación) sólo se observaron petequias en el lóbulo frontal de uno de los animales inoculados con BoHV5 (Figura 3.3.D).

Figura 3.3.A: Observación macroscópica de cerebros de los animales del grupo control (Grupo 4, control sin infectar). En los mismos no se observan lesiones macroscópicas.

Figura 3.3.B: Observación macroscópica de los cerebros de los animales inoculados con dosis altas ($10^{6.3}$ DICC₅₀/ml) de BoHV1 y BoHV5 (Grupo 1, Infección aguda, 6 dpi).

Figura 3.3.C: Observación macroscópica de los cerebros de animales inoculados con dosis bajas (10^3 DICC₅₀/ml) de BoHV1 y BoHV5 (Grupo 2, Latencia, 24 dpi).

Figura 3.3.D: Observación macroscópica de los cerebros de animales inoculados con dosis bajas (10^3 DICC₅₀/ml) de BoHV1 y BoHV5 y que recibieron DXM a los 21 dpi para inducir la reactivación (Grupo 3, Reactivación, 25 dpi).

Las lesiones microscópicas durante la etapa de infección aguda de los terneros infectados con BoHV1 y BoHV5 consistieron en hemorragias corticales y submeníngeas en la corteza cerebral frontal, con edema y congestión en la parte posterior de la corteza. En la etapa de latencia se observaron pequeños focos de neuronofagia y satelitosis leve, con escaso infiltrado mononuclear en GT de los terneros infectados con BoHV5. Además, estos animales presentaron infiltrados mononucleares, gliosis difusa y satelitosis en el área de bulbos olfatorios, en médula cervical y puente. En los animales latentemente infectados con BoHV1 se observaron pequeños focos de gliosis y satelitosis en corteza frontal, mientras que en GT se observó neuronofagia, focos de gliosis, satelitosis y abundante infiltrado mononuclear. Durante la reactivación se observaron hemorragias multifocales leves en la corteza cerebral anterior de terneros infectados con BoHV1 y BoHV5. En esta etapa se presentaron pequeñas áreas de gliosis y satelitosis en la médula cervical de los terneros infectados con BoHV1 (Figura 3.4).

Figura 3.4: Lesiones microscópicas en tejido neural de terneros infectados con BoHV1 y BoHV5. (A). Edema submeníngeo en la corteza posterior de un ternero infectado con BoHV5 (6dpi) (20x), (B) Hemorragias submeníngeas en la corteza posterior de un ternero infectado con BoHV1 (6dpi) (20x), (C) Áreas de gliosis y satellitosis en la médula cervical de un ternero infectado con BoHV1 después de la reactivación inducida por DXM (40x), (D) Corteza cerebral posterior de un ternero no infectado (20x).

3.4. AISLAMIENTO VIRAL A PARTIR DE MUESTRAS DE SISTEMA NERVIOSO

No se aisló BoHV5 de ninguna de las muestras de tejido nervioso analizadas en la etapa de infección aguda. Sin embargo, en este estadio BoHV1 se aisló de todas las submuestras de SNC y GT (Fig. 3.5.A y Tabla 3.2). Los títulos de BoHV1 variaron entre $10^{5,07}$ y $10^{8,97}$ DICC₅₀/g de tejido. Los títulos más bajos se detectaron

en GT, mientras que los títulos más elevados se alcanzaron en médula cervical ($10^{8,97}$), corteza posterior ($10^{8,5}$) y en la zona de la protuberancia anular ($10^{8,22}$).

Figura 3.5.A: Títulos de BoHV1 y BoHV5 en el cerebro y el GT de terneros inoculados experimentalmente con un inóculo de dosis alta (infección primaria aguda). Aquellas muestras en las que no se aisló el virus se representan con un valor de 0,2 para mostrar las barras. Se evaluaron las siguientes áreas: 1: corteza olfatoria; 2-3: corteza frontal; 4: corteza dorso-lateral; 5: surco marginal de la corteza posterior; 6: surco ectomarginal de la corteza posterior; 7: cerebelo; 8: médula cervical; 9: médula cervical, 10: protuberancia y 11: diencéfalo. GT: ganglio trigémino.

Como era esperado, durante la latencia, BoHV1 y BoHV5 no se aislaron de ninguna de las muestras (Fig. 3.5.B y Tabla 3.2). Durante la reactivación, solo fue posible aislar al BoHV5. El virus se aisló de la corteza olfatoria, frontal y posterior,

con títulos que variaron de $10^{6,73}$ a $10^{8,07}$ DICC₅₀/g de tejido (Fig. 3.5.C y Tabla 3.2).

Como se esperaba, todas las muestras de tejido de los terneros inoculados con el placebo resultaron negativas.

Figura 3.5.B: Ausencia de virus infeccioso en el cerebro y el ganglio trigémino de terneros inoculados experimentalmente con un inóculo de dosis baja de BoHV1 y BoHV5 (latencia). Aquellas muestras en las que no se aisló el virus se representan con un valor de 0,2 para mostrar las barras. Se evaluaron las siguientes áreas: 1: corteza olfatoria; 2-3: corteza frontal; 4: corteza dorso-lateral; 5: surco marginal de la corteza posterior; 6: surco ectomarginal de la corteza posterior; 7: cerebelo; 8: médula cervical; 9: médula cervical, 10: protuberancia y 11: diencefalo. GT: ganglio trigémino.

Figura 3.5.C: Títulos de BoHV1 y BoHV5 en el cerebro y el GT de terneros inoculados experimentalmente con un inóculo de dosis baja (latencia) y a los que se les administró DXM a los 21 dpi. Aquellas muestras en las que no se aisló el virus se representan con un valor de 0,2 para mostrar las barras. Se evaluaron las siguientes áreas: 1: corteza olfatoria; 2-3: corteza frontal; 4: corteza dorso-lateral; 5: surco marginal de la corteza posterior; 6: surco ectomarginal de la corteza posterior; 7: cerebelo; 8: médula cervical; 9: médula cervical, 10: protuberancia y 11: diencéfalo. GT: ganglio trigémino.

3.5. DISTRIBUCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ADN DE BoHV1 Y BoHV5 EN TEJIDO NERVIOSO POR PCR EN TIEMPO REAL-HRM

Mediante el análisis por PCR en tiempo real-HRM, se demostró que durante la infección aguda por BoHV5, el genoma viral estaba presente en la corteza olfatoria (2/2), corteza frontal (1/2), en la médula cervical (2/2) y en GT (1/2). En la misma etapa de infección, el genoma de BoHV1 se detectó consistentemente en la corteza olfatoria (1/2), corteza frontal (2/2), corteza posterior (2/2), médula

cervical (2/2) y GT (2/2). En los terneros latentemente infectados con BoHV5 se detectó la presencia del ADN viral en corteza olfatoria (2/2), corteza frontal (2/2), corteza posterior (1/2), médula cervical (1/2) y GT (2/2). El genoma de BoHV1 no se detectó en SNC durante esta etapa aunque fue posible identificarlo en GT (1/2).

A las 48 h de inducida la reactivación con DXM se detectó ADN de BoHV5 en la corteza olfatoria (2/2), corteza frontal (2/2), corteza posterior (1/2) y médula cervical (1/2). En esta etapa de la infección, el genoma de BoHV1 se detectó en corteza posterior (1/2), médula cervical (1/2) y GT (1/2) (Tabla 3.2).

En las muestras en las que no se detectó BoHV1 o BoHV5, se amplificó citocromo B, el cual se expresa constitutivamente en tejidos bovinos, demostrando que la extracción de ADN fue adecuada y que no existen inhibidores en la reacción de PCR.

Tabla 3.2: Aislamiento viral y análisis por PCR en Tiempo Real-HRM en muestras de tejido nervioso de bovinos en los distintos estadios de la infección por BoHV1 y BoHV5.

INFECCIÓN	VIRUS	SECCION DEL SISTEMA NERVIOSO									
		CO		CF		CP		MC		GT	
		I	HRM	I	HRM	I	HRM	I	HRM	I	HRM
AGUDA	BoHV5 #2	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
	BoHV5 #3	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
	BoHV1 #4	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	BoHV1 #5	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
LATENCIA	BoHV5 #7	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
	BoHV5 #10	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
	BoHV1 #12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	BoHV1 #13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
REACTIVACION	BoHV5 #8	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	BoHV5 #9	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
	BoHV1 #11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	BoHV1 #14	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
CONTROL	Ternero #1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NEGATIVO	Ternero #6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

I: Aislamiento viral, HRM: Análisis por PCR en Tiempo Real-HRM. CO: Corteza Olfatoria, CF: Corteza Frontal, CP: Corteza Posterior, MC: Médula Cervical, GT: Ganglio Trigémico.

3.6. EXPRESIÓN DE GENES VIRALES EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y GANGLIO TRIGÉMINO

Se evaluó las expresión de genes virales representativos de la cinética inmediata temprana (bICP4), temprana (TK) y tardía (gD, gB) por RT-PCR utilizando

submuestras de cerebro, GT y médula cervical de animales con infección aguda, latentemente infectados y en animales donde se indujo la reactivación con DXM.

No se detectó la expresión de genes IE (bICP4) de BoHV1 ni de BoHV5 en las submuestras evaluadas en ninguna etapa de la infección (Tabla 3.3).

Tabla 3.3: Análisis por RT-PCR de la expresión de genes virales representativos de la cinética inmediata temprana en diferentes sectores del sistema nervioso y en los distintos estadios de la infección.

EXPRESIÓN DE GENES INMEDIATOS TEMPRANOS (bICP4)						
ETAPA DE INFECCION	VIRUS	SECTOR DEL SISTEMA NERVIOSO				
		CO	CF	CP	MC	GT
AGUDA	BoHV5	-	-	-	-	-
	BoHV1	-	-	-	-	-
LATENCIA	BoHV5	-	-	-	-	-
	BoHV1	-	-	-	-	-
REACTIVACION	BoHV5	-	-	-	-	-
	BoHV1	-	-	-	-	-
	CONTROL	-	-	-	-	-
	CONTROL + DXM	-	-	-	-	-

CO: Corteza Olfatoria, **CF:** Corteza Frontal, **CP:** Corteza Posterior, **MC:** Médula Cervical, **GT:** Ganglio Trigémico. **+**: se detecta expresión del gen en la muestra de tejido nervioso analizada. **-**: no se detecta expresión del gen en la muestra de tejido nervioso analizada.

La expresión de genes tempranos (TK) de BoHV1 tampoco fue evidente en los distintos estadios de infección. En tanto, en el caso de BoHV5 se detectó la expresión de TK durante la latencia en la corteza olfatoria, corteza frontal, corteza posterior y médula cervical. Sin embargo, no se detectó la expresión génica de TK

durante la latencia en GT (Tabla 3.4). No se observó expresión de TK de BoHV5 durante la infección aguda (ANEXO – Figura 6.1) ni durante la reactivación.

Tabla 3.4: Análisis por RT-PCR de la expresión de genes virales representativos de la cinética temprana en diferentes sectores del sistema nervioso y en los distintos estadios de la infección.

EXPRESIÓN DE GENES TEMPRANOS (TK)						
ETAPA DE INFECCION	VIRUS	SECTOR DEL SISTEMA NERVIOSO				
		CO	CF	CP	MC	GT
AGUDA	BoHV5	-	-	-	-	-
	BoHV1	-	-	-	-	-
LATENCIA	BoHV5	+	+	+	+	-
	BoHV1	-	-	-	-	-
REACTIVACION	BoHV5	-	-	-	-	-
	BoHV1	-	-	-	-	-
	CONTROL	-	-	-	-	-
	CONTROL + DXM	-	-	-	-	-

CO: Corteza Olfatoria, **CF:** Corteza Frontal, **CP:** Corteza Posterior, **MC:** Médula Cervical, **GT:** Ganglio Trigémico. **+**: se detecta expresión del gen en la muestra de tejido nervioso analizada. **-**: no se detecta expresión del gen en la muestra de tejido nervioso analizada.

La expresión de genes tardíos fue evidente en tejidos infectados con BoHV1 o BoHV5. Para BoHV1 se analizó la expresión de gD, la cual solo se detectó en la corteza olfatoria durante la reactivación, no pudiéndose detectar en otras secciones del tejido nervioso o estadio de infección. Para BoHV5 se examinó la expresión de gB, pudiéndose detectar durante la latencia en la corteza olfatoria, corteza frontal y corteza posterior. Además se detectó expresión de gB durante la reactivación en la corteza posterior y la médula cervical (Tabla 3.5)(ANEXO – Figura 6.2 y 6.3).

Tabla 3.5: Análisis por RT-PCR de la expresión de genes virales representativos de la cinética tardía en diferentes sectores del sistema nervioso y en los distintos estadios de la infección.

EXPRESIÓN DE GENES TARDÍOS *						
ETAPA DE INFECCION	VIRUS	SECTOR DEL SISTEMA NERVIOSO				
		CO	CF	CP	MC	GT
AGUDA	BoHV5	-	-	-	-	-
	BoHV1	-	-	-	-	-
LATENCIA	BoHV5	+	+	+	-	-
	BoHV1	-	-	-	-	+
REACTIVACIÓN	BoHV5	-	-	+	+	-
	BoHV1	+	-	-	-	-
	CONTROL	-	-	-	-	-
	CONTROL + DXM	-	-	-	-	-

*Expresión de gB de BoHV5 y gD de BoHV1. CO: Corteza Olfatoria, CF: Corteza Frontal, CP: Corteza Posterior, MC: Médula Cervical, GT: Ganglio Trigémino. +: se detecta expresión del gen en la muestra de tejido nervioso analizada. -: no se detecta expresión del gen en la muestra de tejido nervioso analizada.

3.7. EXPRESIÓN DE TLR EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE TERNEROS DURANTE LA INFECCIÓN AGUDA POR BoHV1 Y BoHV5

Los niveles de ARNm de los TLR endosomales (TLR3, 7, 8 y 9) se evaluaron en secciones cerebrales y en médula cervical de bovinos infectados intranasalmente con BoHV1 y BoHV5 y se compararon con los niveles de expresión de los TLR en tejido neural de terneros no infectados. Luego, los datos se normalizaron y se comparó la expresión de TLR entre los animales inoculados con BoHV1 y BoHV5. Los niveles de expresión de GAPDH permanecieron constantes en las muestras de los terneros de los distintos grupos experimentales

y cuando se evaluó la eficiencia de amplificación de cada gen se demostró una relación lineal entre la cantidad de templado y los valores de Ct.

A los 6 dpi, los niveles de TLR3 aumentaron significativamente ($p \leq 0,05$) en la corteza frontal y posterior y en la médula cervical de los terneros infectados de forma aguda con BoHV1 y BoHV5 en comparación con las muestras de terneros no infectados. En el caso de BoHV1, también se observó un aumento significativo de este TLR en la corteza olfatoria ($p \leq 0,05$). Curiosamente, el mayor aumento en la expresión de TLR3 se detectó en la médula cervical de ambos grupos de animales infectados (incremento de 4,6 veces para BoHV5 y de 8,8 veces para BoHV1 con respecto a los terneros no infectados). Para el TLR7, se detectaron aumentos significativos ($p \leq 0,05$) en los niveles de ARNm en todas las secciones del cerebro y la médula cervical de terneros infectados con BoHV5. Estos hallazgos fueron similares a los detectados para la expresión de TLR7 en terneros con infección aguda por BoHV1, con la excepción de la corteza posterior, en la cual los niveles del receptor no difirieron ($p > 0,05$) de los niveles detectados en el ternero control no infectado. La expresión de TLR8 aumentó ($p \leq 0,05$) en la corteza posterior y la médula cervical durante la infección aguda por BoHV5 y en la corteza olfatoria y médula cervical de los animales infectados con BoHV1. Por otro lado, el nivel de

ARNm de TLR9 disminuyó en la corteza frontal de los terneros infectados con BoHV1. Sin embargo, no se observaron alteraciones significativas ($p > 0,05$) en los niveles de expresión de TLR9 en ninguna otra área del SNC durante la infección por BoHV1 o BoHV5 (Tabla 3.6).

Tabla 3.6: Niveles de expresión del ARNm de los TLR 3, 7, 8 y 9 en secciones de tejido nervioso bovino durante la infección aguda por BoHV1 y BoHV5 y animales no infectados (C).

SECCION DE TEJIDO NEURAL												
TLR	CORTEZA OLFATORIA			CORTEZA FRONTAL			CORTEZA POSTERIOR			MÉDULA CERVICAL		
	BoHV1	BoHV5	C	BoHV1	BoHV5	C	BoHV1	BoHV5	C	BoHV1	BoHV5	C
3	3,85*	1,36	1	3,08*	1,28*	1	3,14*	2,70*	1	9,85*	5,63*	1
7	4,66	3,50*	1	2,82	2,30*	1	1,65	2,56*	1	2,21	2,58*	1
8	3,24*	1,60	1	3,14	2,59	1	1,48	2,44*	1	3,09*	3,89*	1
9	1,88	2,89	1	0,74*	2,63	1	0,61	1,77	1	1,19	1,79	1

* Indica diferencia significativa con respecto al mismo tejido control sin infectar ($p \leq 0,05$).

En este estudio también se establecieron comparaciones entre la expresión de ARNm de los TLR en animales infectados con BoHV1 y BoHV5. Como se muestra en la Figura 3.6, luego de 6 dpi, solo la expresión de TLR3 fue significativamente mayor ($p \leq 0,05$) en la corteza olfatoria de terneros infectados con BoHV1 en comparación con la infección por BoHV5. No se registraron diferencias en los niveles de expresión de los otros TLR ($p > 0,05$).

Figura 3.6: Expresión relativa de ARNm de TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 en tejido nervioso de bovinos infectados de forma aguda con BoHV1 y BoHV5. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos infectados se indican con diferentes letras ($p \leq 0,05$).

3.8. EXPRESIÓN DE TLR EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE TERNEROS DURANTE LA LATENCIA Y POSTERIOR REACTIVACION DE BoHV1 Y BoHV5

Se evaluó la expresión del ARNm de los TLR en el cerebro y médula cervical de terneros infectados con una dosis baja de inóculo viral (latencia) y 48 h después de la administración de DXM para inducir la reactivación de BoHV1 y BoHV5.

Se observó una supresión general en la expresión de los TLR evaluados en la corteza cerebral anterior (olfatoria y frontal) durante la latencia de BoHV1, mientras que en los animales latentemente infectados con BoHV5 la modulación del TLR7 en corteza frontal y de los TLR7-9 en médula cervical fue positiva ($p \leq$

0,05) (Tabla 3.7). Sin embargo, a pesar de la regulación opuesta observada durante el estado latente de ambos virus en el SNC con respecto a tejidos control sin infectar, las diferencias en la expresión de estos receptores entre los tejidos provenientes de animales infectados con BoHV1 y BoHV5 no fueron significativas ($p > 0,05$).

Tabla 3.7: Niveles de expresión de ARNm de los TLR en secciones de tejido nervioso de bovinos latentemente infectados con BoHV1 y BoHV5 y animales control (C).

SECCION DE TEJIDO NEURAL									
	CORTEZA OLFATORIA			CORTEZA FRONTAL			MÉDULA CERVICAL		
TLR	BoHV1	BoHV5	C	BoHV1	BoHV5	C	BoHV1	BoHV5	C
3	0,40*	1,17	1	0,36*	1,51	1	0,92	122,69	1
7	0,58*	1,51	1	0,81	3,23*	1	1,42	3,83*	1
8	0,25*	1,81	1	0,22*	3,1	1	1,03	6,83*	1
9	0,17*	0,37	1	0,12*	0,73	1	0,20	1,91*	1

* Indica diferencia significativa con respecto al mismo tejido control sin infectar ($p \leq 0,05$).

Luego de la reactivación de ambos virus, se detectó una disminución significativa ($p \leq 0,05$) de los niveles de ARNm de TLR3 y TLR8 en la corteza frontal en comparación con las muestras de animales no infectados. Además, en terneros infectados con BoHV5, los niveles de TLR3 disminuyeron ($p \leq 0,05$) en la médula cervical. En el caso de BoHV1, los niveles de TLR3 disminuyeron significativamente en la corteza olfatoria a las 48 h después de la administración de DXM ($p \leq 0,05$).

Los niveles de expresión de los otros TLR no variaron significativamente ($p > 0,05$) durante la reactivación de BoHV1 o BoHV5 (Tabla 3.8).

Tabla 3.8: Niveles de expresión relativa de ARNm de los TLR en secciones de tejido neural de animales latentemente infectados con BoHV1 y BoHV5 y en animales control (C) luego de la reactivación inducida por DXM.

SECCION DE TEJIDO NEURAL									
TLR	CORTEZA OLFATORIA			CORTEZA FRONTAL			MÉDULA CERVICAL		
	BoHV1	BoHV5	C	BoHV1	BoHV5	C	BoHV1	BoHV5	C
3	0,60*	1,22	1	0,49	0,76*	1	0,88	1,17*	1
7	0,78	1,73	1	0,77	1,08	1	1,13	0,79	1
8	0,42	1,33	1	0,26*	0,66*	1	0,83	0,44	1
9	0,87	0,46	1	0,52	0,46	1	1,06	0,42	1

* Indica diferencia significativa con respecto al mismo tejido control sin infectar ($p \leq 0,05$).

Posteriormente a la determinación de las variaciones en los niveles de expresión de los TLR luego de la infección con respecto a los animales control, fue importante establecer si se registraron variaciones entre los terneros infectados con BoHV1 y BoHV5 una vez que el virus se reactiva de la latencia. Como se muestra en la Figura 3.7, luego de la reactivación inducida por DXM, se detectó una disminución significativa ($p \leq 0,05$) en la expresión de TLR3 en la corteza frontal en terneros infectados con BoHV1 en comparación con los terneros infectados con BoHV5. Se observó una disminución similar ($p \leq 0,05$) en la expresión de TLR8 en el mismo sector de corteza cerebral durante la reactivación

de BoHV1. No se registraron diferencias en los niveles de expresión de otros TLR y en las demás secciones de tejido evaluadas ($p > 0,05$).

Figura 3.7: Expresión relativa de ARNm de TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 en tejido nervioso de bovinos infectados con BoHV1 y BoHV5 luego de 48 h de inducir la reactivación con DXM. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos infectados se indican con diferentes letras ($p \leq 0,05$).

3.9. EVALUACION DE LA APOPTOSIS EN CULTIVOS CELULARES Y TEJIDO NERVIOSO INFECTADOS CON BoHV1 Y BoHV5

Como se describió en Materiales y Métodos, para los estudios de apoptosis se utilizaron las líneas celulares MDBK, BoTuR y HeLa. Además de evaluar la cepa 97/613 de BoHV5 y la cepa de referencia Cooper de BoHV1, a este análisis se incorporó la cepa A663, recombinante natural entre BoHV1 y BoHV5 (BoHV5 nrecA663), cuyos sitios de recombinación se localizan en el gen UL27 (gB) (Maidana y col., 2017).

3.9.1. CAMBIOS MORFOLÓGICOS NUCLEARES EN CULTIVOS CELULARES INFECTADOS CON BoHV1 Y BoHV5

Para identificar cambios compatibles con el fenómeno de apoptosis, en primer lugar se evaluó la morfología nuclear mediante tinción con DAPI. Mediante esta técnica se observaron alteraciones consistentes con condensación y fragmentación de la cromatina y presencia de cuerpos apoptóticos, que son porciones de cromatina unidas a la membrana (Guo y col., 2009). Los núcleos marginados y la condensación de la cromatina se visualizaron fácilmente en células infectadas o tratadas con deoxinivalenol (DON), particularmente después de 24 hpi. En este tiempo post-infección también se observaron cuerpos

apoptóticos, los cuales fueron particularmente evidentes luego de la infección con la cepa BoHV5 nrecA663 (Figura 3.8). Por el contrario, los núcleos en células del grupo control permanecieron uniformemente teñidos (Figura 3.8).

Figura 3.8: Imágenes representativas de cambios nucleares en células MDBK teñidas con DAPI a las 24 h después de la infección o el tratamiento. A) BoHV5 97/613, B) BoHV1 Cooper, C) BoHV5 nrecA663, D) DMSO, E) DON, F) Control negativo. Magnificación: 200 ×.

Como se esperaba, los porcentajes de células con cambios morfológicos nucleares observados a las 6 hpi fueron más bajos en comparación con los porcentajes detectados a las 24 hpi (Figura 3.9).

A las 6 hpi, solo se detectaron cambios significativos ($p \leq 0,05$) en las células BoTuR infectadas con la cepa BoHV5 nrecA663. En el grupo control de células BoTur, la tinción con DAPI también reveló un número significativamente mayor de células con cambios nucleares con respecto a los controles sin infectar correspondientes a las otras líneas celulares ($p \leq 0,05$) (Figura 3.9). No se detectaron diferencias en el número de células con cambios morfológicos nucleares luego de la infección con cualquiera de las cepas virales o del tratamiento con DON en las otras líneas celulares ($p > 0,05$). A las 24 hpi se detectaron bajos porcentajes de células HeLa con cambios nucleares (Figura 3.9).

Figura 3.9: Porcentaje de células con cambios nucleares después de 6 (A) o 24 (B) horas de infección con BoHV1 y BoHV5 o tratamiento químico de diferentes líneas celulares. Los experimentos se realizaron por triplicado. Diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre cultivos celulares para cada cepa viral o tratamiento.

Luego, como se muestra en la Tabla 3.9, se evaluó la magnitud de los cambios nucleares inducidos por cada cepa viral en cada línea celular en particular y a los mismos tiempos evaluados anteriormente. En las células MDBK, a las 6 hpi, los porcentajes de cambios nucleares apoptóticos fueron significativamente mayores ($p \leq 0,05$) después de la infección con cualquiera de las cepas virales o luego del tratamiento con DON/DMSO con respecto a las células del grupo control. Sin embargo, no se detectaron diferencias entre tratamientos o cepas virales ($p > 0,05$). Los porcentajes de cambios nucleares detectados en células BoTur infectadas con BoHV1 Cooper y BoHV5 nrecA663 a las 6 hpi fueron significativamente mayores ($p \leq 0,05$) que en las células control. Además, en esta línea celular, los porcentajes de células con cambios morfológicos nucleares observados luego de la infección con BoHV5 nrecA663 fueron significativamente más altos ($p \leq 0,05$) que los detectados en las células tratadas con DON. No se registraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre células HeLa sin infectar y células infectadas o tratadas.

Tabla 3.9: Porcentaje de células con cambios morfológicos nucleares a las 6 y 24 horas después de la inoculación viral o del tratamiento.

CEPA VIRAL Y TRATAMIENTO CELULAR						
CULTIVO CELULAR	BoHV5 97/613	nrecA663	BoHV1 Cooper	DON	DMSO	CONTROL
6 hpi						
MDBK	6,8 ± 0,8 ^b	6,2 ± 0,8 ^b	7,9 ± 0,7 ^b	6,3 ± 1,4 ^b	6,7 ± 2,5 ^b	1,10 ± 0,3 ^a
BoTur	5,4 ± 1,3 ^a	9,1 ± 1,1 ^b	7,6 ± 0,9 ^b	4,4 ± 1,5 ^a	4,7 ± 0,6 ^a	2,40 ± 0,3 ^a
HeLa	6,5 ± 3 ^a	5,6 ± 0,7 ^a	9,1 ± 5,7 ^a	5,4 ± 1,0 ^a	6,1 ± 3,9 ^a	1,4 ± 0,6 ^a
24 hpi						
MDBK	12,9 ± 2,6 ^b	9,6 ± 2,5 ^b	13,4 ± 3,3 ^b	14 ± 3,7 ^b	11 ± 2,6 ^b	4,3 ± 1,5 ^a
BoTur	9,6 ± 4,1 ^a	9,2 ± 6,4 ^b	17,6 ± 2,8 ^b	4,8 ± 1,5 ^a	9,7 ± 3 ^a	2,3 ± 2,5 ^a
HeLa	3,7 ± 1,8 ^a	6,6 ± 2,6 ^b	6,1 ± 1,8 ^b	3,9 ± 1,7 ^a	5,1 ± 1,8 ^b	1,0 ± 0,9 ^a

Se muestran las medias ± el desvío estándar de tres experimentos independientes. Diferentes superíndices en la misma línea indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) para las cepas o tratamientos químicos en comparación con células no infectadas y sin tratar para cada línea celular.

A las 24 hpi, el porcentaje de cambios nucleares en las células MDBK fue significativamente mayor ($p \leq 0,05$) en las células infectadas con cualquiera de los virus en comparación con las células no infectadas. Sin embargo, no se detectaron diferencias entre las cepas ($p > 0,05$). El porcentaje de cambios apoptóticos detectado en las células MDBK tratadas con DON fue solo significativamente mayor ($p \leq 0,05$) que el observado en la infección por BoHV5 nrecA663 (Figura 3.9). La cepa BoHV1 Cooper mostró el mayor porcentaje de cambios apoptóticos en las células BoTur ($p \leq 0,05$) con respecto a las otras cepas virales o tratamientos. Además, el porcentaje de células con morfología nuclear alterada en

células BoTuR infectadas con BoHV1 Cooper fue significativamente mayor ($p \leq 0,05$) que el porcentaje registrado después de la infección por BoHV5 97/613 o BoHV5 nrecA663. Por otra parte, se registraron porcentajes de células con alteraciones nucleares significativamente más altos para BoHV1 Cooper ($p \leq 0,05$) con respecto a las células BoTuR sin infectar o tratadas con DMSO. Como se describió anteriormente, a las 24 hpi, el porcentaje más bajo de cambios apoptóticos se detectó en las células HeLa, independientemente de la cepa viral o el tratamiento. Sin embargo, los cambios apoptóticos nucleares detectados en las células infectadas con BoHV1 Cooper, BoHV5 nrecA663 o DMSO fueron significativamente mayores ($p \leq 0,05$) en comparación con las células no infectadas o no tratadas.

3.9.2. REPLICACIÓN DE LAS DISTINTAS CEPAS DE ALFAHERPESVIRUS BOVINO EN LAS LÍNEAS CELULARES UTILIZADAS PARA EVALUAR APOPTOSIS

Para determinar si los niveles de apoptosis pueden correlacionarse con los niveles de replicación de cada cepa viral, se evaluó la replicación de los alfaherpesvirus bovinos en los diferentes tipos de células utilizados en este estudio. A las 6 hpi, no se registraron diferencias significativas en los títulos

alcanzados por las distintas cepas en un cultivo celular en particular ($p > 0,05$). Sin embargo, a las 24 hpi, se detectaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en los niveles de replicación viral en las células MDBK y BoTuR. En ambos tipos celulares, el título de la cepa BoHV1 Cooper fue significativamente superior ($p \leq 0,05$) con respecto a los títulos alcanzados por las cepas de BoHV5. El nivel de replicación viral en las células HeLa, las cuales son de origen humano, fue menor que en las células de origen bovino, como se esperaba (Tabla 3.10).

Tabla 3.10: Porcentajes de células con cambios nucleares y títulos de las cepas de BoHV1 y BoHV5 en diferentes cultivos celulares a las 6 y 24 horas después de la inoculación.

Cepa viral	MDBK		BoTur		HeLa	
	% cambio nuclear	Título viral	% cambio nuclear	Título viral	% cambio nuclear	Título viral
6 hpi						
BoHV1 Cooper	7.9 ± 0.7 ^a	3.95 ± 0.2 ^a	7.6 ± 0.9 ^a	5.00 ± 0.9 ^a	9.1 ± 5.7 ^a	0.0 ± 0.0 ^a
BoHV5 nrecA663	6.2 ± 0.8 ^a	3.80 ± 0.9 ^a	9.1 ± 1.1 ^a	3.60 ± 0.7 ^a	5.6 ± 0.7 ^a	1.5 ± 2.1 ^a
BoHV5 97/613	6.8 ± 0.8 ^a	3.60 ± 0.4 ^a	5.4 ± 1.3 ^b	2.57 ± 1.7 ^a	6.5 ± 3 ^a	1.9 ± 2.7 ^a
24 hpi						
BoHV1 Cooper	13.4 ± 3.3 ^a	7.5 ± 1.1 ^a	17.6 ± 2.8 ^a	6.77 ± 1.7 ^a	6.1 ± 1.8 ^a	3.90 ± 0.8 ^a
BoHV5 nrecA663	9.6 ± 2.5 ^a	6.3 ± 0.0 ^b	9.2 ± 6.4 ^{ab}	2.67 ± 0.0 ^b	6.6 ± 2.6 ^a	4.57 ± 0.1 ^a
BoHV5 97/613	12.9 ± 2.6 ^a	6.8 ± 0.1 ^b	9.6 ± 4.1 ^{ac}	3.10 ± 2.2 ^c	3.7 ± 1.8 ^a	5.37 ± 1.0 ^a

Se muestran las medias ± los desvíos estándar de tres experimentos independientes. Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$). Los títulos virales se expresan como DICC₅₀ /ml.

3.9.3. DETECCIÓN DE CÉLULAS APOPTÓTICAS MEDIANTE ENSAYO TUNEL

Los cambios en la morfología nuclear son una manifestación temprana luego de la exposición a un estímulo apoptótico. Por otro lado, la tinción con TUNEL es un indicador de apoptosis tardía. En este estudio, el porcentaje de células TUNEL positivas solo se determinó a las 24 hpi en células MDBK, el sustrato estándar para el aislamiento y la propagación de los alfa herpesvirus bovinos (Figura 3.10). A las 24 hpi, el nivel de células TUNEL positivas fue notablemente más alto después de la infección con la cepa BoHV1 Cooper (48,9%) en comparación con las células no infectadas (1,6%), tratadas con DON (22,1%) e infectadas con BoHV5 (97/613: 6,25%, BoHV5 nrecA663: 3,9%).

Figura 3.10: Imágenes representativas de células MDBK TUNEL positivas luego de la infección con BoHV5 97/613 (A), BoHV5 nrecA663 (B), BoHV1 Cooper (C), células MDBK no infectadas (D) y células MDBK tratadas con DON (E) a las 24 h post-inoculación o tratamiento. Los experimentos se realizaron por duplicado. Magnificación: 200 ×.

3.9.4. DETERMINACIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Para este estudio se extrajo ADN de células MDBK, BoTuR y Hela infectadas con las cepas virales durante 24 h. Como control negativo se utilizó ADN de células no infectadas y como control positivo se intentó la inducción de apoptosis con luz ultravioleta a distintos tiempos de exposición. Si bien en algunos ensayos preliminares se observaron bandas correspondientes con fragmentos oligonucleosomales, no fue posible obtener un adecuado control positivo en todos los ensayos (poca repetibilidad entre pruebas). De todos modos, la presencia de fragmentos indicativos de apoptosis en las células infectadas tampoco fue claramente evidente, excepto en células MDBK infectadas con las cepas Cooper y LA de BoHV1 donde se observaron algunas bandas leves de 200pb (Figura 3.11).

Figura 3.11: Fragmentación del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. (A) Células MDBK; calle 1) PM: marcador de peso molecular; 2) Células infectadas con BoHV1 Cooper; 3) Células infectadas con BoHV1 LA; 3) Células infectadas con BoHV5 97/613; 4) Células infectadas con BoHV5 A663; 5) Control positivo; 6) Control negativo. (B) Células HeLa; calle 1) PM; 2) Células infectadas con BoHV1 Cooper; 3) Células infectadas con BoHV1 LA; 3) Células infectadas con BoHV5 97/613; 4) Células infectadas con BoHV5 A663; 5) Control positivo; 6) Control negativo. (C) Células BoTur; calle 1) PM; 2) Células infectadas con BoHV1 Cooper; 3) Células infectadas con BoHV1 LA; 3) Células infectadas con BoHV5 97/613; 4) Células infectadas con BoHV5 A663; 5) Control positivo; 6) Control negativo.

3.9.5. APOPTOSIS NEURONAL EN EL GANGLIO TRIGEMINO Y SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE TERNEROS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON BoHV1 Y BoHV5

La caspasa 3 es un ejecutor clave de la apoptosis. En las células, la caspasa 3 está presente como una procaspasa inactiva que se activa por escisión proteolítica (Chang y col., 2000).

En el GT de los terneros infectados con BoHV1 la mayoría de las neuronas observadas por campo microscópico mostraron una clara tinción nuclear de caspasa 3 escindida (Figura 3.12). Los GT de los terneros infectados con BoHV5 también mostraron neuronas teñidas positivamente. Sin embargo, la presencia de células apoptóticas no fue tan evidente como en bovinos infectados con BoHV1. En animales infectados con BoHV5, algunas neuronas mostraron una tinción perinuclear granular (Figura 3.13). No se detectaron neuronas apoptóticas en el GT de los terneros no infectados (Figura 3.12). Por otro lado, la tinción positiva de neuronas en tejido cerebral no fue claramente evidente, excepto en la corteza frontal de un animal infectado con BoHV1 (Figura 3.13).

Figura 3.12: Detección de caspasa 3 escindida en GT de bovinos infectados experimentalmente con BoHV1 Cooper (A y B), BoHV5 97/613 (C y D) y Control negativo (E). Magnificación: 400 × (A – C), 200 × (D y E).

Figura 3.13: Detección de caspasa 3 escindida en cerebro de bovinos infectados experimentalmente con BoHV5, corteza olfatoria – infección aguda (A); BoHV1, Corteza Frontal – infección aguda (B); BoHV5, Corteza Frontal – Latencia (C); y Control negativo (D). Magnificación: 20X

3.10. EXPRESIÓN DE CICLINAS EN TEJIDO NERVIOSO DE BOVINOS INFECTADOS

CON BoHV1 Y BoHV5

Se observaron marcadas diferencias en los niveles de expresión de ARNm de las ciclinas A2, B1 y E1 entre los tejidos de bovinos infectados y no infectados

(Tabla 3.11). Estas diferencias fueron particularmente evidentes en GT en todas las etapas del ciclo infeccioso. La ciclina B1 no se detectó en GT de terneros no infectados. Durante la infección aguda, los niveles de ARNm de las ciclinas A2 y E1, fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) en GT infectados con BoHV1 y BoHV5 en comparación con GT no infectados. La ciclina B1 no se detectó en GT durante la infección aguda. Además, en esta etapa se detectó una disminución en los niveles de ARNm de las ciclinas A2 y E1 en la corteza olfatoria ($p < 0,05$). En esta etapa del ciclo infeccioso, también se observó una reducción en la expresión génica de las ciclinas E1 y B1 en la médula cervical de terneros infectados con BoHV5 ($p < 0,05$) (Tabla 3.11). Curiosamente, en los GT infectados con BoHV1, los niveles de ARNm de ciclina A2 y E1 fueron 23.7 y 2.6 veces más altos, respectivamente, que los niveles detectados en los GT infectados con BoHV5 (Figura 3.14). Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$).

Figura 3.14: Expresión relativa de ciclinas A2, E1 y B1 en GT de terneros infectados con BoHV1 y BoHV5. Los resultados representan la media de la magnitud de variación de los niveles de expresión de las ciclinas A2, B1 y E1 en el GT de terneros infectados con BoHV1 y BoHV5 sobre los niveles detectados en el mismo tejido de terneros no infectados (grupo de control). *: diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

Durante la infección latente con BoHV1 y BoHV5, se observó una disminución significativa ($p \leq 0,05$) en la expresión de ciclina A2 y E1 en la corteza olfatoria y la médula cervical, detectándose un leve, aunque significativo aumento ($p \leq 0,05$) en la expresión de las ciclinas A2 y B1 en la corteza frontal y de las ciclinas A2 y E1 en la corteza posterior. La expresión de ciclina B1 fue significativamente mayor ($p \leq 0,05$) en la médula cervical de terneros infectados con BoHV5 (Tabla 3.11). Por el contrario, en esta etapa, se detectó un marcado aumento en los niveles de ARNm de ciclinas A2 y E1 en GT de bovinos infectados con BoHV5. Los niveles de ciclina A2 y ciclina E1 fueron 114 y 85,7 veces más altos, respectivamente, en el GT infectado con BoHV5 en comparación con el GT

infectado con BoHV1 ($p \leq 0,05$). A diferencia de la infección aguda, se detectó la expresión de ARNm de ciclina B1 durante la latencia de BoHV1 y BoHV5 (Tabla 3.11).

Incluso durante la reactivación, aunque no se pudo cuantificar, se observó un incremento en los niveles de ARNm de ciclinas A2, B1 y E1 en comparación con la ausencia de expresión en GT de terneros no infectados (Figura 3.14). Además, durante la reactivación, se detectó una disminución significativa ($p \leq 0,05$) en la expresión del ARNm de ciclina A2 en la médula cervical y la corteza posterior de animales infectados con BoHV1 y BoHV5. Durante esta etapa también se registró un ligero aumento ($p \leq 0,05$) en los niveles de ciclina E1 y ciclina B1 en la corteza frontal y médula cervical, respectivamente, de terneros infectados con BoHV5 (Tabla 3.11).

Tabla 3.11: Expresión relativa de las ciclinas bovinas A2, E1 y B1 en el SNC de bovinos infectados con BoHV1 y BoHV5.

	TEJIDO	INFECCION AGUDA			LATENCIA			REACTIVACION		
		Control	BoHV1	BoHV5	Control	BoHV1	BoHV5	Control	BoHV1	BoHV5
CICLINA A2	CO	1	0,01*	0,02	1	0,00*	0,00*	1	0,88	1,62
	CF	1	0,59	2,00	1	2,19	2,66	1	0,46	0,59
	CP	1	0,90	1,38*	1	2,80*	8,30	1	0,08*	0,03*
	MC	1	6,68	0,26*	1	0,20	0,07	1	0,06*	0,23
CICLINA E1	CO	1	0,00*	0,02*	1	0,00*	0,00*	1	0,84	1,98
	CF	1	0,58	1,53	1	1,97*	3,98	1	2,13	3,98*
	CP	1	1,08	1,63	1	3,80*	26,05	1	1,08	0,71
	MC	1	3,22	0,13*	1	0,03*	0,02*	1	0,11*	0,37
CICLINA B1	CO	1	0,97	1,22	1	5,58*	3,89	1	1,25	0,64
	CF	1	1,19	2,68	1	4,52*	4,55	-	+	+
	CP	1	1,08	1,03	1	3,40	3,98	-	+	+
	MC	1	7,32	0,69*	1	4,40	11,8*	1	0,11*	2,35*

Los resultados representan la media de los cambios en los niveles de transcripción en las áreas del sistema nervioso central de bovinos infectados, sobre los niveles detectados en secciones de tejido de bovinos no infectados, los cuales sirvieron como grupo control. CO: corteza olfatoria; CF: corteza frontal; CP: corteza posterior; MC: medula cervical. (+): se detecta el gen en la muestra de tejido nervioso analizado; (-): no se detecta el gen en la muestra de tejido nervioso analizado; (*): diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al control no infectado para esa muestra de tejido.

3.11. DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE LINFOCITOS T CD8⁺ EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y GANGLIO TRIGEMINO

Ocasionalmente, algunas neuronas sensoriales en los GTs latentemente infectados pueden expresar proteínas virales, las cuales actuarían como un estímulo antigénico capaz de mantener un infiltrado crónico de células CD8⁺ durante la latencia (Feldman y col., 2002). En este estudio se analizó la presencia de linfocitos T CD8⁺ en tejido nervioso de terneros infectados experimentalmente con BoHV1 y BoHV5, detectándose algunos linfocitos T CD8⁺ durante la infección aguda, particularmente en proximidad de las neuronas del GT de terneros infectados con BoHV1. Sin embargo, esto no fue claramente evidente en la infección por BoHV5. Tampoco se detectó la presencia de células citotóxicas en tejido cerebral durante ningún estadio de la infección por ambos virus (Figura 3.15).

Figura 3.15: Imágenes representativas de la detección inmunohistoquímica de linfocitos $CD8^{+}$ en tejido nervioso de terneros infectados experimentalmente con BoHV1 y BoHV5. (A) GT, infección aguda por BoHV1, (B) GT, infección aguda por BoHV5, (C) GT, ternero no infectado, (D) Corteza Posterior, infección aguda por BoHV1 (E) Corteza Olfatoria, infección aguda por BoHV5, (F) Corteza Posterior, ternero no infectado. Las flechas indican linfocitos $CD8^{+}$ en proximidad de las neuronas. Magnificación 20x

3.12. EXPRESIÓN DE PERFORINA Y ENZIMAS CITOLÍTICAS (GRANZIMAS A Y B) EN TEJIDO NERVIOSO DURANTE LA INFECCIÓN POR BoHV1 Y BoHV5

Las principales proteínas granulares de los linfocitos CD8⁺ citotóxicos y de las células NK son la perforina, una proteína disruptora de membranas y las granzimas, una familia de serín proteasas estructuralmente relacionadas con diversas especificidades de sustrato. La perforina es claramente un facilitador esencial de la apoptosis mediada por granzimas. Las granzimas desencadenan distintas vías apoptóticas en las células diana ya sea dependientes o no de las caspasas (Trapani y Smyth 2002; Smyth y col., 2005).

Durante la infección aguda ocasionada por BoHV1 y BoHV5 no se detectó la expresión de perforinas en las muestras de tejido analizadas, mientras que durante la latencia se detectó expresión de perforina en la corteza posterior de animales infectados con BoHV1 pero no en animales infectados con BoHV5 (ANEXO – Figura 6.4). En el periodo de reactivación la expresión de perforina fue evidente en la corteza olfatoria y el GT de animales infectados con BoHV5, aunque no se detectó en ningún sector del tejido nervioso de los animales infectados con BoHV1. En los animales no infectados no se detectó la expresión de perforina (Tabla 3.12).

Tabla 3.12: Expresión de ARNm de perforina en tejido nervioso bovino durante la infección aguda, latencia y reactivación del BoHV1 y BoHV5.

		PERFORINA				
		CO	CF	CP	MC	GT
INFECCIÓN AGUDA	BoHV1	-	-	-	-	-
	BoHV5	-	-	-	-	-
LATENCIA	BoHV1	-	-	+	-	-
	BoHV5	-	-	-	-	-
REACTIVACIÓN	BoHV1	-	-	-	-	-
	BoHV5	+	-	-	-	+
CONTROL	Control	-	-	-	-	-
	Control + DXM	-	-	-	-	-

CO: Corteza Olfatoria, **CF:** Corteza Frontal, **CP:** Corteza Posterior, **MC:** Médula cervical, **GT:** Ganglio Trigémico. **+**: se detecta expresión del gen en la muestra de tejido nervioso analizado. **-**: no se detecta expresión del gen en la muestra de tejido nervioso analizado.

No se detectó expresión de granzima A en tejido nervioso durante ninguna etapa de la infección por BoHV1 o BoHV5 ni en tejido nervioso de bovinos no infectados (Tabla 3.13)(ANEXO – Figura 6.5).

Tabla 3.13: Expresión de granzima A en tejido nervioso bovino durante la infección aguda, latencia y reactivación del BoHV1 y BoHV5.

		GRANZIMA A				
		CO	CF	CP	MC	GT
INFECCIÓN AGUDA	BoHV1	-	-	-	-	-
	BoHV5	-	-	-	-	-
LATENCIA	BoHV1	-	-	-	-	-
	BoHV5	-	-	-	-	-
REACTIVACIÓN	BoHV1	-	-	-	-	-
	BoHV5	-	-	-	-	-
CONTROL	Control	-	-	-	-	-
	Control + DXM	-	-	-	-	-

CO: Corteza Olfatoria, **CF:** Corteza Frontal, **CP:** Corteza Posterior, **MC:** Médula cervical, **GT:** Ganglio Trigémino. +: se detecta expresión del gen en la muestra de tejido nervioso analizado. -: no se detecta expresión del gen en la muestra de tejido nervioso analizado.

La expresión de granzima B durante la infección aguda con BoHV1 o BoHV5 no fue evidente en los sectores de tejido nervioso analizados. Sin embargo, durante la latencia se detectó la expresión de granzima B en muestras de tejido de corteza olfatoria, corteza posterior y médula cervical de animales infectados con BoHV5, en tanto que durante la reactivación de BoHV1 y BoHV5 se observó la expresión de granzima B en las muestras de corteza olfatoria, corteza frontal y corteza posterior y en el caso de BoHV5 además se detectó expresión en la médula cervical. No se detectó la expresión de granzima B en tejido nervioso de los terneros no infectados (Tabla 3.14).

Tabla 3.14: Expresión de granzima B en tejido nervioso bovino durante la infección aguda, latencia y reactivación del BoHV1 y BoHV5.

		GRANZIMA B				
		CO	CF	CP	MC	GT
INFECCIÓN AGUDA	BoHV1	-	-	-	-	-
	BoHV5	-	-	-	-	-
LATENCIA	BoHV1	-	-	-	-	-
	BoHV5	+	-	+	+	-
REACTIVACIÓN	BoHV1	+	+	+	-	-
	BoHV5	+	+	+	+	-
CONTROL	Control	-	-	-	-	-
	Control + DXM	-	-	-	-	-

CO: Corteza Olfatoria, **CF:** Corteza Frontal, **CP:** Corteza Posterior, **MC:** Médula cervical, **GT:** Ganglio Trigémico. +: se detecta expresión del gen en la muestra de tejido nervioso analizado. -: no se detecta expresión del gen en la muestra de tejido nervioso analizado.

4-DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El BoHV1 y el BoHV5 son alfa herpesvirus que afectan al ganado bovino. Al BoHV1 se lo asocia tradicionalmente con trastornos respiratorios, genitales y abortos, aunque también ocasionalmente puede causar cuadros neurológicos. Por otro lado, el BoHV5 es el agente viral más comúnmente asociado con meningoencefalitis en terneros. Sin embargo, cuando se producen alteraciones neurológicas ocasionadas por BoHV1, los cuadros clínicos son indistinguibles y solo los métodos de diagnóstico basados en técnicas moleculares permiten la diferenciación del agente causal. Actualmente se desconoce por qué estos alfa herpesvirus que están estrechamente relacionados difieren en su neuroinvasividad y en su potencial neuropatogénico. Es probable que la infección producida por cada uno de estos virus desencadene distintos mecanismos moleculares en el hospedador y que esto sea, al menos en parte, responsable por las diferencias en patogenicidad. En el caso del BoHV5 estos aspectos moleculares no han sido tan extensivamente estudiados como en el caso de BoHV1. En este trabajo se analizan algunos mecanismos y procesos biológicos clave que permitirían comprender por qué estos alfa herpesvirus que son genéticamente y antigénicamente tan similares difieren en su neuropatogenicidad. Esto resulta relevante desde el punto de vista diagnóstico y para el establecimiento de

medidas de control y erradicación, particularmente en aquellas regiones donde ambos virus co-existen.

En este estudio se utilizaron muestras de tejido nervioso provenientes de un estudio previo en el que se utilizaron terneros inoculados experimentalmente mediante aerosolización intranasal con BoHV1 y BoHV5 utilizando inóculos virales que permiten reproducir los distintos estadios de la infección. Los resultados del aislamiento viral en secreciones nasales y oculares y los datos serológicos confirman que fue posible reproducir las etapas de infección primaria aguda, latencia y reactivación luego de la administración de DXM y han sido previamente publicados (Favier y col., 2014; Burucúa y col., 2019).

Las lesiones macroscópicas y microscópicas observadas durante la infección aguda fueron leves tanto en los animales inoculados con BoHV1 como BoHV5. Aunque es frecuente el hallazgo de lesiones cerebrales severas, como malacia, particularmente en la infección por BoHV5, también existen reportes de cuadros neurológicos naturales (Hill y col., 1984; Salvador y col., 1998; Rissi y col., 2008) y experimentales (Narita y col., 1976; Belknap y col., 1994) en los que no se observan alteraciones significativas. Rissi y col. (2008) identificaron al BoHV1 como responsable de 4/11 casos de meningoencefalitis en bovinos del sudeste de

Brasil. Al igual que para BoHV5, los autores describen en algunos animales la presencia de signos neurológicos en ausencia de lesiones histológicas, lo cual también es consistente con los hallazgos de Cagnini y col. (2015) en una inoculación experimental de terneros por vía intranasal con un inóculo de características similares al utilizado en este trabajo. Del mismo modo, en una inoculación experimental de terneros con las cepas Cooper y Los Ángeles de BoHV1, Marin y col. (2016b) demostraron que ambas cepas se replicaron en el sistema nervioso alcanzando títulos más elevados que los descritos para BoHV5. Además, la diseminación viral ocasionó lesiones microscópicas aunque no se observaron signos clínicos. Ambas cepas de BoHV1 se aislaron de las muestras de tejido nervioso obtenidas a la necropsia. En este estudio los hallazgos histopatológicos en el SNC de terneros infectados con BoHV1 o BoHV5 fueron leves aunque resultaron más evidentes en la infección por BoHV5, con lesiones compatibles con meningoencefalitis no supurativa. Sin embargo, en GT la presencia de lesiones microscópicas, particularmente la presencia de infiltrado mononuclear fue más evidente en terneros con infección aguda por BoHV1. La ausencia de lesiones importantes en GT durante la infección por BoHV5 también ha sido previamente reportada (Rissi y col., 2008; Cagnini y col., 2015)

Los herpesvirus tienen ciclos de replicación cortos produciendo un efecto citopático característico en cultivos celulares (Kahrs y col., 1977). En esta etapa aguda de infección BoHV1 y BoHV5 se aislaron en secreciones nasales y oculares. Además, algunos animales seroconvirtieron, aunque la eutanasia a los 6 dpi resulta un período muy corto para determinar seroconversión en todos los animales inoculados. En este estudio, el BoHV1 se aisló de todas las muestras de tejido nervioso de los animales en etapa de infección aguda. Sin embargo, no fue posible aislar al BoHV5 del SNC de ninguno de los animales inoculados. En coincidencia con estos resultados, existen numerosos reportes que señalan las dificultades para el aislamiento de BoHV5 tanto en bovinos (Carrillo, 1982; Cascio y col., 1999; Pérez y col., 2002, 2003) como en el modelo en conejos (Flores y col., 2009). Esto se debería particularmente a los bajos títulos virales alcanzados en los distintos sectores del sistema nervioso (Belknap y col., 1994; Ashbaugh y col., 1997). Del mismo modo, Meyer y col. (2001) señalan que no siempre los casos clínicos de meningoencefalitis se correlacionan con títulos virales elevados en SNC.

En los animales que recibieron una dosis viral baja para inducir latencia, BoHV1 se aisló en secreciones nasales hasta los 11 dpi, mientras que la excreción

de BoHV5 se detectó hasta los 18 dpi. Estudios previos también demostraron que la excreción de BoHV5 ocurre por períodos más prolongados (17-21 días) que en el caso de BoHV1 (12-14 días) (Pérez y col., 2002; Vogel y col., 2003; Flores y col., 2009), por lo cual la transición entre la infección aguda y el establecimiento de latencia ocurre más tardíamente para BoHV5. Como era esperado, una vez establecida la latencia el virus no se recuperó de ningún tipo de secreciones ni de tejidos obtenidos a la necropsia y tampoco se observaron signos clínicos, aunque se detectaron lesiones microscópicas leves en SNC y GT. Se observó seroconversión en los animales del grupo latentemente infectado, demostrando que se logró establecer la infección con el inóculo viral de dosis baja utilizado.

Por otro lado, en los animales latentemente infectados que recibieron DXM para inducir la reactivación viral, tanto BoHV1 como BoHV5 se aislaron en secreciones nasales y oculares, aunque los títulos de BoHV1 fueron 2,5 a 3 veces inferiores que en el caso de BoHV5. Estos resultados estarían en concordancia con la reactivación más eficiente descrita para BoHV5 (Pérez y col., 2002; Vogel y col., 2003), la cual a diferencia de BoHV1, suele ocurrir en presencia de signos clínicos leves tanto en bovinos (Pérez y col., 2002) como en conejos (Caron y col., 2002). Se ha señalado que la reactivación y el aislamiento viral a partir de secreciones

dependen de la duración de la replicación inicial en el sitio de entrada al organismo (Whetstone y col., 1992), lo cual es coincidente con la detección de BoHV5 en secreciones durante un período de tiempo más prolongado que BoHV1. Las lesiones macroscópicas y microscópicas observadas fueron leves para ambos grupos infectados que recibieron DXM. Al igual que en el grupo asignado al estudio de latencia, los animales inoculados a los cuales se les administró DXM también seroconvirtieron.

En resumen, estos resultados demuestran que se logró reproducir los distintos estadios de infección de BoHV1 y BoHV5 en los terneros inoculados. Las muestras obtenidas a la necropsia de dichos grupos y de los animales no infectados se procesaron para las determinaciones que se detallan en esta tesis.

Debido a las dificultades en la detección de BoHV5 mediante aislamiento viral se determinó la distribución del genoma de ambos virus en sistema nervioso mediante PCR en Tiempo Real-HRM, lo cual permitió determinar la presencia de BoHV5 en corteza frontal, médula cervical y GT durante la etapa de infección aguda. Sin embargo, al igual que lo observado con los resultados de aislamiento viral, el genoma de BoHV1 tuvo una distribución más amplia en el tejido nervioso. Por el contrario, durante la infección latente sólo el genoma de BoHV5 se detectó

en SNC mientras que el ADN de BoHV1 sólo fue detectable en GT. Hallazgos similares fueron descritos por Flores y col. (2009) en conejos latentemente infectados. Por lo tanto, este estudio también contribuye a reafirmar que el BoHV5 establece infección latente en diversos sectores del SNC además del GT.

En los animales que recibieron DXM para inducir la reactivación, la distribución del genoma del BoHV5 alcanzó todo el SNC, a diferencia de los animales inoculados con BoHV1 en los cuales la distribución del genoma estuvo restringida a determinados sectores, aunque en ambos casos esto no fue consistente entre los animales infectados en cada grupo. Cagnini y col. (2015) obtuvieron resultados similares en la etapa de infección aguda, donde no fue posible establecer un patrón específico de la distribución del ADN de BoHV5 en SNC. Por el contrario, Vogel y col. (2003) describen un patrón en la distribución del genoma viral, siendo la corteza dorso-lateral y posterior frecuentemente negativas a la PCR durante la infección aguda y PCR positivas durante la reactivación, junto con la corteza frontal y médula.

En cuanto a los sectores del SNC que contienen genoma del BoHV5, Vogel y col. (2003) también observaron una mayor distribución del ADN viral en el tejido

nervioso de terneros experimentalmente infectados que recibieron DXM con respecto a la infección aguda.

Durante la infección productiva, los genes de los alfa herpesvirus se expresan en una cascada altamente regulada. Los genes inmediatos tempranos (IE) son estimulados por una proteína del tegumento viral (bTIF), que interactúa con factores de transcripción celular y se une a los promotores de los genes IE para activar la transcripción (Wirth y col., 1992). Los genes IE más importantes son bICP0, bICP4 y bICP22. Luego se activan los genes tempranos (E) que participan fundamentalmente en la replicación del ADN viral y posteriormente los genes tardíos (L) dan origen a las proteínas estructurales del virión.

Si bien se asume que la cascada de expresión de genes en tejido neural es similar a lo que ocurre en células no neurales, las características de las células nerviosas determinan que exista el potencial de que la cinética de expresión génica no sea idéntica. Por otro lado, los estudios controlados *in vitro* permiten conocer ciertas propiedades e interacciones entre los genes virales, aunque no siempre es posible asociarlos con lo que podría ocurrir en el individuo infectado.

En este trabajo, no se detectó expresión génica viral en tejido nervioso durante la infección primaria aguda de terneros infectados con BoHV1 o BoHV5 aunque se confirmó que la expresión de GAPDH era adecuada. En la literatura no existen estudios de la cinética de expresión génica viral en tejido nervioso, excepto por algunos estudios particulares en GT, por lo cual resulta difícil analizar comparativamente los hallazgos de este trabajo. bICP4 es el activador más potente de los genes E y L (DeLuca y col., 1985) y represor de su propia actividad y del promotor de bICP0. Su homólogo en HSV1, ICP4 es abundantemente expresado en cultivos celulares. Sin embargo, la información respecto a los niveles de expresión de ICP4 o bICP4 en tejidos infectados, particularmente en cerebro, es escasa. Del mismo modo, durante esta etapa de la infección no se detectó la expresión de genes E y L. De acuerdo a Godowski y Knipe (1986) la expresión de ICP4 cesa a las 4 horas de iniciada la infección productiva in vitro y esta inhibición es dependiente del gen E, ICP8. Schang y Jones (1997) analizaron los transcritos virales en GT de bovinos infectados experimentalmente con BoHV1 y demostraron que la transcripción de los genes IE no es eficiente en este tejido. Por ejemplo, la expresión de genes IE se detectó solo luego de que se produjo un incremento considerable en la cantidad de copias de genoma viral y luego de la detección de

genes E entre los 2 y 4 dpi, lo cual sugiere que la expresión de los genes IE no alcanza niveles detectables mediante RT-PCR. Estos autores tampoco detectaron los genes de ribonucleótido reductasa y TK, de cinética temprana a los 15 dpi e indicaron que no fue posible detectar consistentemente la expresión de gC en GT, lo cual es consistente con los hallazgos de este estudio con respecto a la detección de gD de BoHV1 y gB de BoHV5 durante la infección aguda.

La latencia de los alfa herpesvirus se caracteriza por un abundante nivel de transcripción del gen relacionado a la latencia (LR) (Jones, 1998, 2003) y del ORF-E (Inman y col., 2004) y no se detecta la expresión de genes IE o E. Se ha establecido que los productos del gen LR promueven el establecimiento de la latencia al inhibir la apoptosis (Ciacci-Zanella y col., 1999; Henderson y col., 2004) y la expresión génica viral (Bratanich y col., 1992; Geiser y col., 2002). Por otro lado, el ORF-E, que solo es expresado por BoHV1, colaboraría en el establecimiento eficiente de la latencia al inducir el crecimiento de neuritas (Pérez y col. 2007), facilitando la restauración de las funciones neuronales después de la infección.

Feldman y col. (2002) determinaron la existencia de algunas neuronas que expresan transcritos del ciclo lítico del HSV1 en ganglios murinos latentemente infectados. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que cuando se analiza la

expresión de genes virales mediante técnicas convencionales como la RT-PCR, la detección de la expresión moderada de un solo gen viral en unas pocas células puede malinterpretarse fácilmente como expresión de bajo nivel en todas las células infectadas. En este sentido, Kramer y Coen (1995) en un estudio sobre la latencia de HSV1 detectaron la expresión transitoria o de baja frecuencia de ICP4, lo cual conduciría a la transcripción de TK durante esta etapa. Aunque en esta tesis no se detectó la expresión de bICP4, en terneros latentemente infectados con BoHV5 se detectó la expresión del gen TK en todos los sectores del SNC evaluados y se detectaron genes tardíos en la corteza cerebral y en GT durante la latencia de BoHV5 y BoHV1, respectivamente lo cual permite asumir que en este estadio existe cierto nivel de expresión de genes IE que iniciarían la cascada de expresión génica.

Dada la importancia de la reactivación en el mantenimiento de BoHV en la naturaleza y a las implicancias clínicas de la reactivación de HSV1, los estudios que analizan el inicio de la infección productiva en esta etapa son más abundantes.

Como se mencionó, durante la reactivación de la latencia, los eventos más significativos son el re-establecimiento de la infección viral productiva, la

disminución de la expresión del gen LR y la re-excreción nasal y/u ocular de virus infeccioso (Jones, 1998, 2003; Jones y col., 2006).

Tal-Singer y col. (1997) demostraron que la expresión de genes virales durante la reactivación de la latencia de HSV1 difiere de la cascada de expresión que ocurre en la infección productiva y sugirieron que las observaciones obtenidas *in vitro* no reflejarían exactamente lo que ocurre *in vivo*. Por ejemplo, Workman y col. (2009) demostraron que el promotor E de bICP0 se activa durante la reactivación pero no el promotor IE de este gen o de bICP4, lo cual podría explicar la ausencia de detección de este último gen en nuestro estudio.

En el año 2013, da Silva y col. demostraron que el promotor de la unidad de transcripción inmediata temprana 1 (IEtu1) que conduce la expresión de bICP0 y bICP4 (Wirth y col., 1992) contiene GREs. A través de estos receptores la estimulación con glucocorticoides induce la expresión de genes virales y por lo tanto la infección productiva (Kook y col., 2015).

En este estudio, durante la etapa de reactivación no se detectó la expresión de genes IE o E en tejido nervioso de bovinos infectados. Solo se detectó la expresión de gD en la corteza olfatoria de los terneros infectados con BoHV1.

Estudios de da Silva y col. (2013) demostraron que en cultivos celulares la gD de BoHV1 se expresa relativamente temprano luego de la infección, con una cinética compatible con los genes tardíos L1 o γ 1. Sin embargo, en el mismo estudio, utilizando GT de bovinos infectados experimentalmente y tratados con DXM, la expresión de gD o gC no fue evidente, lo cual es consistente con los resultados de este estudio con respecto a la expresión de genes tardíos en GT. De acuerdo a Rock y col. (1992) la mayoría de las neuronas no producen virus infeccioso ante un estímulo reactivante porque carecerían de factores necesarios para iniciar la infección productiva, y por lo tanto permanecen latentemente infectadas. Los resultados de este trabajo y en coincidencia con da Silva y col. (2013) sugieren que la expresión de genes tardíos es un evento clave para que se logre la infección productiva en esta etapa, en la cual se deberían alcanzar niveles de expresión génica y proteica adecuados para la producción de virus infeccioso.

Dado que en este estudio la reactivación fue evidente a partir de los títulos virales alcanzados en secreciones, particularmente para BoHV5, es probable que la sensibilidad de las PCRs utilizadas en este estudio no sea adecuada para detectar los niveles de expresión alcanzados por los transcriptos en tejidos. Sería importante evaluar la expresión génica mediante un método cuantitativo y

sensible como la qRT-PCR y analizar más de un gen interviniente en cada etapa de la cascada de expresión dada la relevancia que tiene la interacción entre los distintos genes en la progresión de la infección (Samaniego y col., 1995). Uno de los factores más importantes que puede determinar el destino de la infección viral es la respuesta inmune innata. Aunque el rol primordial de la respuesta inmune es detener la invasión de los patógenos también se ha demostrado que cuando la misma es exacerbada puede ocasionar alteraciones patológicas. En base a las diferencias en la neuropatogenicidad del BoHV1 y BoHV5, es posible asumir que la respuesta inmune puede desempeñar un rol preponderante en el desarrollo de estas infecciones. La respuesta inmune innata desencadenada a partir de la estimulación viral de los TLR es una de vías moleculares que se analizaron en este estudio.

El papel de los TLR en el reconocimiento de patógenos ha sido ampliamente reconocido. Sin embargo, sólo se conocen parcialmente los mecanismos inmunes que participan en el control de estos patógenos después de la estimulación de los TLR, particularmente en el caso de enfermedades animales. En este estudio, se analizaron las variaciones en los niveles de expresión de los TLR en el SNC después de la infección por BoHV1 y BoHV5 en relación a los niveles detectados en los

animales no infectados. Luego, se establecieron comparaciones en los niveles de ARNm de los TLR entre bovinos infectados con BoHV1 y BoHV5 para determinar si es posible asociar un patrón de expresión de estos receptores con la patogénesis de cada virus en el tejido neural. Con la excepción del TLR9, se detectó una regulación positiva significativa de los demás TLR analizados después de la infección primaria del tejido nervioso por ambos alfa herpesvirus bovinos. Por otro lado, las etapas de infección aguda y reactivación se caracterizaron por un patrón de expresión de TLR distinguible para cada virus.

El HSV1, que comparte propiedades biológicas con BoHV1 y BoHV5, causa encefalitis severa en humanos. Zhang y col. (2007) demostraron que una deficiencia de TLR3 en el SNC se correlaciona con el desarrollo de la enfermedad neurológica causada por HSV1. Los autores sugirieron que la deficiencia del TLR3 está asociada con un control ineficiente del virus en el cerebro, lo que lleva a la persistencia del virus en este tejido y a una alta tasa de encefalitis debido a la reactivación viral. Al contrario de estos estudios con HSV1, se ha demostrado previamente una regulación positiva de los niveles de ARNm del TLR3 en la corteza cerebral dorso-lateral después de la infección experimental de terneros con BoHV5 (Marin y col., 2014b). Del mismo modo, en el presente estudio, se

detectó una regulación positiva del TLR3 en todas las regiones del SNC evaluadas. Es importante destacar que el mayor aumento en los niveles de TLR3 se detectó en la médula cervical de terneros infectados con BoHV1 y, en menor medida, en el mismo tejido de los animales infectados con BoHV5. Por lo tanto, los resultados de este estudio demuestran consistentemente que existe una participación del TLR3 en la respuesta inmune innata a la infección del SNC por ambos alfa herpesvirus. Las diferencias significativas en los niveles de ARNm del TLR3 entre los terneros infectados con BoHV1 y BoHV5 solo fueron evidentes en la corteza olfatoria, el sitio donde se inicia la invasión viral del cerebro durante la infección primaria aguda (Pérez y col., 2002). Sin embargo, es evidente que la estimulación del TLR3 no fue suficiente para detener la diseminación de BoHV1 o BoHV5 en el cerebro ya que se detectó la replicación del virus y/o la presencia del genoma viral en las diferentes áreas del tejido nervioso analizadas. Por el contrario, se ha demostrado que HSV1 se replica más eficientemente en neuronas deficientes en TLR3, donde la producción de IFN tipo I se ve afectada (Lim y col., 2014). Por lo tanto, los resultados de este estudio también demuestran que la modulación de los TLR en la infección por alfa herpesvirus, al menos en el tejido neural, puede desencadenar distintos eventos. En coincidencia con nuestros

hallazgos, también se ha demostrado que existe una regulación positiva de los niveles del TLR3 durante la infección por el virus del Nilo Occidental (VNO) (Wang y col., 2004) y la encefalitis inducida por los virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y de los simios (VIS) (Suh y col., 2009). En estos casos, la estimulación del TLR3 sería responsable de la respuesta inflamatoria en el SNC. Por otro lado, Daffis y col. (2008) también demostraron que en ratones infectados experimentalmente, el TLR3 podría favorecer la patogénesis del VNO en algunos casos o proteger al hospedador de la diseminación del virus y la encefalitis en otros. Sin embargo, se puede inferir de acuerdo con los resultados obtenidos, que el papel del TLR3 en la infección del SNC por los alfa herpesvirus bovinos es diferente a la observada en la encefalitis por HSV1 en humanos.

Los resultados de este trabajo también proporcionan evidencia de un rol para los TLR7 y TLR8 en la enfermedad neurológica causada por los alfa herpesvirus bovinos. Durante la infección aguda por BoHV5 y BoHV1, los niveles del TLR7 se mantuvieron elevados con respecto a los niveles de expresión encontrados en animales no infectados en todas las secciones del cerebro, excepto en la corteza posterior de terneros infectados con BoHV1. Marin y col. (2014a) demostraron que los niveles de ARNm del TLR7 aumentan

significativamente en leucocitos de sangre periférica de los bovinos después de la infección con BoHV1 y BoHV5. Además, el tratamiento con Imiquimod, un agonista de los TLR7/8, reduce la replicación viral.

En general, en este estudio se determinó que los niveles de los TLR3, 7 y 8 son significativamente más elevados en la corteza olfatoria de terneros infectados con BoHV1 y solo el TLR7 aumenta en esta región del cerebro en los animales infectados con BoHV5. Este incremento en la expresión de los TLR puede ser responsable de la restricción en el acceso de BoHV1 al SNC. Por otro lado, como se describió previamente, se ha reportado la dificultad en el aislamiento de BoHV5 a partir de muestras de tejido neural (Belknap y col., 1994; Pérez y col., 2002) y esto probablemente se deba a los bajos títulos virales alcanzados en este tejido (Belknap y col., 1994). De acuerdo con nuestros resultados, también se puede especular que la estimulación del TLR7 durante la infección viral aguda está conduciendo a una retroalimentación negativa en la replicación del virus en el SNC, como lo han demostrado Baker y col. (2013) en estudios con el virus Langat, un miembro del serocomplejo del virus de las encefalitis transmitidas por garrapatas. Los autores sugirieron que el TLR7 podría no tener influencia en la

neurovirulencia de este virus, aunque podría desempeñar un papel directo en la reducción de la carga viral en el cerebro.

En contraste con los hallazgos durante la infección aguda, los niveles de los TLR3 y TLR8 se redujeron significativamente durante la reactivación del virus. Estos hallazgos eran previstos ya que la replicación del virus durante los episodios de reactivación debería ser menor y compatible con la supervivencia neuronal. Por lo tanto, la estimulación de los TLR no debería verse seriamente afectada en esta etapa. No obstante, la regulación negativa de los TLR7/8 durante la reactivación viral podría favorecer la diseminación, particularmente de BoHV5 a otras regiones del sistema nervioso, en coincidencia con Vogel y col. (2003), quienes como se describió previamente, indicaron que la reactivación del BoHV5 resulta en el establecimiento de la infección latente en sitios adicionales del cerebro.

En este trabajo no fue posible demostrar una función para el TLR9 en la encefalitis inducida por los alfa herpesvirus. En estudios previos se reportó que los niveles de ARNm del TLR9 aumentan en el GT durante la infección por BoHV5 (Marin y col., 2014b). Sin embargo, según los resultados de este estudio, este receptor no se ve particularmente afectado por la infección viral del SNC.

En cuanto a la expresión de los TLR en la médula cervical no se pueden establecer aún conclusiones significativas. Sin embargo, es evidente que la estimulación viral de los TLR ocurre en este tejido.

En general, los resultados de este estudio demostraron que la infección del sistema nervioso por los alfa herpesvirus bovinos estimuló la expresión de los TLR3, TLR7 y TLR8 y no modificó significativamente la expresión de TLR9.

No se detectaron diferencias importantes en los patrones de expresión de los TLR durante la infección del SNC por BoHV1 o BoHV5. Sin embargo, algunas diferencias notables en los niveles de expresión del ARNm de los TLR se observaron durante la infección aguda y la reactivación, lo cual proporciona evidencias de que la respuesta inmune innata puede estar involucrada en las manifestaciones clínicas observadas en cada etapa. No obstante, se requerirán más estudios para analizar los mecanismos que inician la activación de los TLR y la cascada de señalización mediada por cada uno de estos receptores para dilucidar el papel preciso que cada uno desempeña en la encefalitis ocasionada por los alfa herpesvirus bovino.

Además, en este estudio fue posible determinar que la magnitud en la variación de la expresión de los TLR se correlaciona con las manifestaciones clínicas que se pueden observar en cada etapa del ciclo infeccioso de los alfa herpesvirus bovinos.

Los mecanismos de muerte celular constituyen otro factor relevante en la patogénesis de las infecciones virales dado que pueden ser inhibidos o estimulados de acuerdo a la estrategia viral y a la etapa del ciclo infeccioso.

La respuesta mediada por linfocitos T CD8⁺ es importante en la inmunidad contra las infecciones ocasionadas por herpesvirus. Estas células serían importantes para prevenir la reactivación de la infección latente y también contribuirían a la resolución de la etapa aguda de infección (Liu y col., 2000).

Hart y col. (2017) demostraron que los productos de los genes IE, particularmente bICP4, bICP22 y *bcirc* serían los blancos dominantes de la respuesta de las células T CD8⁺ durante la infección por BoHV1. No existe información respecto a los mayores determinantes antigénicos reconocidos por las células citotóxicas en la infección por BoHV5. En este estudio, sólo se analizó la expresión de bICP4 y no fue posible detectarlo en ninguna etapa de la infección

por BoHV1 o BoHV5. También se debe destacar que las proteínas IE de BoHV5 son menos conservadas con respecto a BoHV1 (Delhon y col., 2003; Thiry y col., 2006), por lo cual en este caso no es posible establecer comparaciones que puedan ser válidas y se requerirán estudios respecto a los antígenos reconocidos por las células CD8⁺ durante la infección por BoHV5. La presencia de linfocitos T CD8⁺ activados es detectable durante la latencia de HSV1, indicando que existe al menos una baja expresión de antígenos virales (Feldman y col., 2002), proceso que se conoce como “reactivación molecular espontánea”. Esta expresión antigénica viral persistente mantiene una respuesta de las células T CD8⁺ que sirve para proteger a las neuronas de la acción viral (Liu y col., 2000). Este efecto protector estaría mediado por el IFN- γ producido por las células T CD8⁺ (Liu y col., 2001). Por otro lado, mediante procesos inhibitorios, las neuronas no son destruidas por la acción citolítica mediada por la liberación de gránulos por parte de los linfocitos T CD8⁺ (Suvas y col., 2006). En la infección de terneros con BoHV1, se detectan focos de linfocitos infiltrantes durante la infección aguda. Se ha descrito que unas pocas células en el GT de los terneros infectados de forma latente con BoHV1 expresan transcritos y proteínas virales lo que sugiere que la

reactivación molecular espontánea también ocurre durante la latencia de BoHV1 (Winkler y col., 2002).

En este trabajo sólo se evidenciaron claramente algunas células CD8⁺ en GT de los terneros infectados en forma aguda con BoHV1 y fueron menos evidentes en el GT de los bovinos infectados con BoHV5. Dado lo reportado previamente, es posible que estos linfocitos reconozcan productos génicos no analizados en este estudio.

El SNC es vulnerable a diversas infecciones virales. Si bien una respuesta inmune rápida y efectiva es esencial para limitar la propagación viral, esta respuesta antiviral debe regularse estrictamente para limitar el daño tisular mediado por el sistema inmune. Este equilibrio entre el control eficaz del virus y las alteraciones patológicas que puede ocasionar es importante debido a las funciones altamente especializadas y a la capacidad regenerativa limitada de las neuronas (Savarin y Bergmann, 2018).

La perforina es una proteína efectora indispensable de los linfocitos citotóxicos y de las células NK. La actividad formadora de poros de esta proteína es necesaria para el ingreso de serin-proteasas pro-apoptóticas, conocidas como

granzimas, en el citosol de las células infectadas o cancerosas. Las granzimas desencadenan distintas vías apoptóticas en las células diana, ya sea dependientes o no de las caspasas. Entre las diversas granzimas, la granzima B, que escinde las proteínas específicamente en los residuos de aspartato, se considera el activador más potente de la muerte celular. Por otro lado, la granzima A, a pesar de su incapacidad para activar caspasas, puede producir la muerte celular mediante la escisión directa de proteínas nucleares, lo que facilita la formación y acumulación de daños en el ADN. Por el contrario, en ciertas infecciones virales, la perforina puede no ser crucial para la eliminación viral pero puede tener un impacto importante en el desarrollo de patologías. En algunas infecciones, la activación de determinada vía apoptótica puede influir en la presentación de alteraciones inmunopatológicas. Por ejemplo, tanto la perforina, como la vía apoptótica desencadenada por Fas/FasL, son esenciales para la invasión del cerebro por ciertos flavivirus neurotrópicos, y los ratones que tienen deficiencia en la exocitosis granular o deficiencia de Fas son resistentes a la infección periférica con una baja dosis de estos virus encefalíticos (recopilado por Trapani y Smyth, 2002). Por otro lado, tanto la actividad de la perforina como de las granzimas puede resultar esencial para determinar la persistencia o eliminación viral en un tejido

determinado. De acuerdo a los hallazgos en este trabajo, la ausencia de expresión de perforina y granzimas durante la infección aguda podría facilitar la diseminación viral en el tejido nervioso, demostrando que durante esta etapa las células citotóxicas no logran detener la infección. La relevancia de la detección de perforina durante la latencia de BoHV1 en corteza posterior no puede ser determinada en este punto. Sin embargo, es posible relacionar la expresión de granzima B durante la latencia de BoHV5, dado que los resultados obtenidos en este estudio respecto a diversos aspectos de la latencia de BoHV5 sugieren que la existencia de expresión de genes virales mantendría activos a los linfocitos citotóxicos durante esta etapa. Se debe destacar que sería importante analizar los niveles de expresión a nivel de ARNm y proteína de los genes virales y moléculas citolíticas para ser más concluyentes en este aspecto. Aunque Knickelbein y col. (2008) reportaron que la liberación de IFN γ y granzima B por las células T CD8⁺ es importante para la inhibición de la reactivación del HSV1, también resulta relevante que la expresión de granzima B durante la reactivación de ambos virus es consistente con su función apoptótica, lo cual facilitaría la excreción viral en esta etapa.

Durante la reactivación, no se detectó la expresión de perforina en ningún sector del tejido nervioso de los animales inoculados con BoHV1 ni en corteza frontal, corteza posterior y médula cervical de los animales infectados con BoHV5. No obstante en la mayoría de estas secciones de tejido se detectó la expresión de granzima B. Normalmente, la perforina y la granzima B se producen en forma simultánea. Sin embargo, se ha demostrado que en ciertos tejidos, como la placenta y órganos reproductores, la granzima B podría tener una función independiente de la perforina (Hirst y col., 2001) e induciría apoptosis mediante distintos eventos intra y extracelulares (Choy y col., 2004). Del mismo modo, Hommel-Berrey y col. (1997) determinaron que la granzima B es un importante mediador de la fragmentación del ADN celular y también de la degradación de transcritos virales cuando la perforina no está presente.

Lee y col. (2017) demostraron que la exposición crónica a IL-1 β aumenta la vulnerabilidad neuronal a la toxicidad de la granzima B a través de la activación del Receptor Activado por Proteasas 1 (PAR1). Por lo tanto, es probable que la coincidencia de la granzima B y la IL-1 β en el SNC de individuos con neuroinflamación causen y aceleren la pérdida neuronal. Stopnicky y col. (2019) determinaron que las células T CD4⁺ “helper” que pueden infiltrar el tejido

nervioso ante una lesión también pueden liberar granzima B causando daño subletal a los astrocitos, lo que compromete sus funciones de sostén contribuyendo a la neuroinflamación. Aunque en este trabajo no se analizaron los niveles de citoquinas ni el infiltrado de células T $CD4^+$ en sistema nervioso, sería relevante estudiar estos aspectos en relación a la perforina y granzimas para determinar su contribución a la neuropatología ocasionada por la infección viral.

También se ha demostrado que los linfocitos T regulatorios (Treg, $CD4^+$, $CD25^+$) activados, cuya función principal es modular la respuesta inmune, producen granzima B que actuaría mediante un mecanismo aún no esclarecido en ausencia de perforina (Gondek y col., 2005). Por otro lado, en las infecciones por HSV1 se ha demostrado que las células Treg favorecerían el establecimiento de latencia y la reactivación viral mediante un efecto supresor sobre los linfocitos $CD8^+$ (Yu y col., 2018). En humanos y ratones, las células $T\gamma\delta$ representan <5% del total de linfocitos circulantes. En contraste, el compartimento de células $T\gamma\delta$ en rumiantes representa el 15-60% del total de células mononucleares circulantes y estos linfocitos son el principal subconjunto de células T reguladoras en la sangre periférica. Estudios en ratones demostraron que los linfocitos $T\gamma\delta$ regulan la respuesta inflamatoria en el SNC (Pnomarev y Dittel, 2005) inhibiendo la

proliferación de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ (Yu y col., 2018). En el contexto de la respuesta inmune innata a nivel del sistema nervioso, también se ha demostrado que la activación de las células de la microglia a partir de los ligandos de diversos TLR induce la producción de citoquinas pro-inflamatorias por los linfocitos T γ δ (Derkow y col., 2015). También se ha demostrado que el tratamiento con glucocorticoides estimularía la activación y producción de citoquinas por parte de los linfocitos Treg (Ugor y col., 2018; Yu y col., 2018) lo cual podría también asociarse a los niveles de expresión de granzima B en ausencia de perforina luego de la administración de DXM en este estudio.

La eliminación de células dañadas por apoptosis es un proceso esencial en la homeostasis y el desarrollo. Sin embargo, este mecanismo de muerte celular también puede desempeñar un papel patogénico en las enfermedades infecciosas. Se considera que la apoptosis es un proceso importante en muchas infecciones virales del SNC y, con frecuencia, la gravedad de la enfermedad está asociada con el nivel de apoptosis (Clarke y col., 2009). En este estudio, se investigó si la apoptosis es un mecanismo relevante en la patogénesis de BoHV5. Además, se analizó si las diferencias en el potencial apoptótico de BoHV5 y BoHV1 podrían estar asociadas con las características distintivas de su neuropatogénesis.

Se ha descrito que en algunas infecciones virales, el número de células apoptóticas se correlaciona con los niveles de replicación del virus (Delhon y col., 2002). En este estudio, los cambios apoptóticos observados en los distintos cultivos celulares se correspondieron con la capacidad de las cepas de BoHV1 y BoHV5 de replicarse en cada línea celular. Las líneas celulares MDBK y BoTur que se utilizan con frecuencia para el aislamiento de los alfa herpesvirus bovinos (Chandranaiik y col., 2010; Taborda y col., 2007) mostraron índices de alteraciones nucleares más elevados. Por otro lado, las células HeLa, que no son un sustrato adecuado para la replicación de estos virus, mostraron niveles significativamente más bajos de alteraciones nucleares compatibles con apoptosis. Con respecto a las cepas virales, se observaron diferencias entre la inducción de apoptosis *in vitro* para la cepa Cooper de BoHV1 y las cepas de BoHV5. Esto se manifestó principalmente en las células BoTur a las 24 h después de la infección con BoHV1. La mayor capacidad de BoHV1 para inducir apoptosis *in vitro* se evidenció por las alteraciones morfológicas nucleares observadas en los diferentes tipos de células y se confirmó mediante el ensayo TUNEL en células MDBK. Por otro lado, estos hallazgos contrastan con las observaciones de Cardoso y col. (2015) quienes demostraron bajos niveles de apoptosis después de la infección de células

neuronales con BoHV1 Cooper. Sin embargo, los mismos autores demostraron que BoHV5 no produce altos niveles de apoptosis en las neuronas, lo que es coincidente con los hallazgos de este estudio utilizando diferentes sustratos. Esto también se ha demostrado para otros virus, como el virus varicela-zoster, que puede inducir apoptosis en fibroblastos pero no en neuronas, lo cual, al igual que los hallazgos de este estudio, demuestra que la apoptosis es un proceso específico del tipo celular (Pugazhenthir y col., 2011). Dado que los cambios morfológicos, no siempre son indicadores claros de muerte celular por apoptosis y pueden variar entre diferentes líneas celulares (McGahon y col., 1995), los resultados de la tinción con DAPI y el ensayo de TUNEL luego de la infección de los cultivos celulares, también se complementaron con la determinación de la fragmentación del ADN en geles de agarosa luego de 24 h de infección de los cultivos celulares. Mediante este análisis sólo se detectaron bandas débiles, correspondientes con el tamaño de los fragmentos oligonucleosomales, en células MDBK infectadas con las cepas de BoHV1. Si bien estos resultados coinciden con los obtenidos mediante las otras metodologías empleadas para determinar la presencia de apoptosis, se debe considerar que aunque esta técnica es más económica que otras, es laboriosa y algunos autores consideran que provee sólo una apreciación

cualitativa de la apoptosis (Ioannou y Chen, 1996). Además, Collins y col. (1997) también sugirieron que aunque la presencia de la "escalera" de fragmentos implica un proceso apoptótico, su ausencia no lo descarta. Por lo tanto, aunque esta metodología para evaluar apoptosis puede complementar los resultados de las otras técnicas empleadas, debe considerarse que la escalera de ADN solo fue visible en un tipo celular y no se logró inducir consistentemente la fragmentación cuando se utilizaron la radiación ultravioleta (Geiser y col., 2008) y el tratamiento de los cultivos con deoxinivalenol (Awad y col., 2004; Pérez Gaudio y col., 2016) como controles positivos.

Como se mencionó previamente, Marin y col. (2016b), demostraron que en el tejido neural de terneros inoculados experimentalmente, las cepas de BoHV1 Cooper y Los Ángeles alcanzaron títulos más altos que los observados para BoHV5. Aunque se detectó ADN viral en el GT de todos los animales infectados, en este estudio, solo BoHV1 se aisló de este tejido. Samuel y col. (2007) determinaron que existe una correlación positiva entre los títulos máximos alcanzados por el VNO en SNC y la detección de caspasa 3 activada. Se han observado hallazgos similares para las infecciones por reovirus (Oberhaus y col., 1997) y virus sindbis (Labrada y col., 2002) y la presencia de neuronas apoptóticas en tejido neural. De acuerdo a

Delhon y col. (2002) la inhibición de la replicación de BoHV1 previene la apoptosis neuronal. Este tipo de estudio no se ha realizado con BoHV5. Sin embargo, los niveles de replicación de BoHV1 y BoHV5 y la presencia de neuronas apoptóticas en el GT en el presente trabajo, demuestran que es necesaria la replicación del virus para activar el programa apoptótico que conduce a la muerte neuronal. Del mismo modo, como sugirieron previamente Delhon y col. (2002), es posible también inferir a partir de los resultados de este estudio que se requiere un nivel crítico de replicación del ADN viral para inducir la apoptosis.

Es bien sabido que la inducción de apoptosis limita la respuesta inflamatoria. La fagocitosis de las células apoptóticas suprime la inflamación mediante la producción de mediadores antiinflamatorios y la inhibición de las citoquinas proinflamatorias (Fadok y col., 1998). En este trabajo, no se estimó el número de neuronas positivas para caspasa 3 ya que el número de neuronas del GT en cada campo microscópico no fue suficiente como para obtener un conteo confiable. Sin embargo, en el pico de infección aguda, la caspasa 3 escindida fue claramente evidente en las neuronas del GT de terneros infectados con BoHV1, mientras que se observó un menor número de neuronas positivas después de la infección por BoHV5 en GT y no se detectaron células caspasa 3 positivas en SNC.

En el caso de BoHV1, la tinción caspasa 3 positiva se detectó en unas pocas neuronas y mayormente en células cercanas a los cuerpos neuronales. Se ha demostrado que la activación de la microglia y la neurotoxicidad debido a los procesos inflamatorios tienen un rol preponderante en la patogénesis de varios desordenes neurodegenerativos. En este sentido, la actividad de la caspasa 3 en este tipo celular podría conducir a efectos contrastantes como la activación pro-inflamatoria de la microglia o la muerte celular apoptótica (Kavanagh y col., 2014). Para una comprensión global de los mecanismos que conducen a la muerte celular en el tejido nervioso durante la infección por los alfa herpesvirus bovinos serán necesarios estudios que involucren el uso de inhibidores de caspasas. Además será importante el análisis en futuros estudios, de otras vías de inducción de apoptosis, independientes de la caspasa 3.

De acuerdo a lo que se discutió previamente en relación a la replicación viral, se demostró que la estimulación del TLR7 desencadena la producción de citoquinas pro-inflamatorias e induce una retroalimentación negativa sobre la replicación viral *in vitro*, en células MDBK infectadas con BoHV1 y BoHV5 (Marin y col., 2014b) y en neuronas infectadas con el virus Langat (Baker y col., 2013). Por lo tanto, es probable que en la infección por BoHV5 la respuesta a las citoquinas

desempeñe un papel predominante en la neuropatología y la replicación viral en el tejido neural. Los hallazgos de este trabajo, sugieren que podría haber una asociación entre la magnitud de la replicación de BoHV5 y la inducción de apoptosis en el GT. También es evidente que la estimulación de los TLR tiene un papel adicional en la neuropatogénesis de BoHV5.

En general, los resultados de este estudio sugieren que las diferencias en los niveles de apoptosis inducidos por BoHV5 y BoHV1 pueden relacionarse con el potencial patogénico que distingue a cada virus. Es probable que una combinación de factores, como la inducción de apoptosis y la respuesta inmune innata, dirija el resultado final de la infección del sistema nervioso bovino por BoHV1 y BoHV5. Sería interesante analizar si las diferencias en la magnitud de la apoptosis son relevantes en otras etapas claves de la infección, por ejemplo durante la transición de la infección aguda a la latencia, como se ha establecido para BoHV1 (Lovato y col., 2003) para determinar la importancia de la apoptosis en el ciclo infeccioso del BoHV5.

Otro aspecto interesante en la regulación del ciclo de replicación viral y con un rol potencial en la patogénesis, es el análisis de los componentes del ciclo celular. En este estudio, se detectaron diferencias notables en la modulación de la

expresión de ciclinas por BoHV1 y BoHV5. Estas diferencias fueron particularmente notables en GT, el sitio principal de latencia de los alfaherpesvirus. Los niveles máximos en la expresión de ciclinas A2 y E1 fueron evidentes en GT de terneros infectados de forma aguda con BoHV1. En las células altamente diferenciadas, como las neuronas, la expresión de la ciclina A induce apoptosis (Freeman y col., 1994). Por lo tanto, estos hallazgos se correlacionan con las estrategias del virus para mejorar la infección productiva (Winkler y col., 2000) y los niveles de replicación viral en este tejido (Marin y col., 2014b). Por el contrario, en el GT infectado con BoHV5, los mayores niveles de expresión de los ARNm de ambas ciclinas se detectaron durante la latencia. Es conocido que los productos del gen LR de BoVH1 interactúan con la ciclina A (Jiang y col., 1998) inhibiendo la expresión de los componentes del ciclo celular y la consecuente apoptosis neuronal durante la latencia, lo cual es esencial para la supervivencia del virus en el hospedador (Schang y col., 1996; Winkler y col., 2000). Similar a los hallazgos de este trabajo, en un modelo en conejo, Schang y col. (1996) demostraron que BoHV1 indujo la expresión de ciclina A en GT durante la infección aguda y la reactivación. De acuerdo a los resultados de este estudio, en comparación con BoHV1, BoHV5 induce niveles más bajos de apoptosis neuronal

en GT y esto se correlacionó con niveles más bajos de replicación viral. También es probable que estos niveles de replicación de BoHV5 se correlacionen con los niveles más bajos de ciclina A2 en esta etapa. La asociación entre la replicación viral y los componentes del ciclo celular ha sido demostrada mediante el uso farmacológico de inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas (cdk), los cuales inhiben la replicación de algunos virus, como HSV y VIH, en cultivo celular (Schang y col., 2006; Okamoto y col, 2015).

Por otro lado, ambos alfaherpesvirus indujeron la expresión de ciclina B1 en GT durante la latencia y la reactivación. Normalmente, la entrada en la mitosis está estrictamente regulada y requiere que el complejo ciclina B1/cdk1 alcance un umbral determinado de actividad (Lindqvist y col., 2009). En este estudio, la ciclina B1 aumentó en GT durante la latencia de ambos virus, en la corteza olfatoria y frontal de terneros infectados con BoHV1 y en la médula cervical de bovinos infectados con BoHV5. El aumento de la expresión de ciclina B1 se correlaciona con las neuronas en la etapa de transición G2/M. Estas alteraciones anormales en las células diferenciadas terminan en eventos abortivos, lo que conduce a la degeneración de las neuronas y la neuropatología (Wang y col., 2013). Aunque en la infección por BoHV5 no se observaron diferencias significativas en los niveles de

expresión de ciclina B1 con respecto a los tejidos no infectados, es probable que estos niveles tengan importancia biológica en la neuropatogénesis de BoHV5. Este estudio demuestra también que se producen alteraciones importantes en los niveles de ciclinas en el cerebro del ganado infectado de forma latente.

También es evidente que BoHV5 modula los niveles de ciclina en la médula cervical en todas las etapas de la infección. Esto concuerda con los sitios de replicación de BoHV5 y la inducción de lesiones microscópicas severas en este tejido (Pérez y col., 2002).

En general, los elevados niveles de expresión de ciclinas en GT durante la latencia de BoHV5 sugieren que estos virus utilizan diferentes estrategias para persistir en el hospedador y esto podría estar relacionado con diferentes funciones del gen LR de BoHV5. Según los resultados obtenidos, solo durante la infección aguda es posible establecer una relación entre la replicación viral y los niveles de ARNm de ciclinas. Por lo tanto, otros factores también podrían estar involucrados en la regulación de los componentes del ciclo celular durante la infección por alfa herpesvirus bovinos. Se ha demostrado previamente que BoHV1 y BoHV5 también pueden establecer latencia en las tonsilas (Pérez y col., 2005; Favier y col., 2014) y la reactivación de BoHV5 en este tejido es más eficiente en

comparación con BoHV1 (Favier y col., 2014). La modulación de las moléculas reguladoras del ciclo celular en las tonsilas puede ser un factor adicional que contribuye a la propagación de BoHV5 al sistema nervioso. Serán necesarios estudios que consideren los niveles de ciclinas en otros sitios de latencia, como las tonsilas, para comprender si los hallazgos actuales son específicos del tejido y cómo la modulación de las ciclinas está involucrada en la patogenicidad de los alfa herpesvirus bovinos. Del mismo modo, el análisis de los niveles proteicos de las ciclinas más relevantes permitirá una mejor comprensión del mecanismo preciso de la regulación del ciclo celular por los alfa herpesvirus. No obstante, estos hallazgos sugieren que la neuropatogenia también podría estar influenciada por distintos mecanismos ejercidos por cada virus sobre la regulación de los componentes del ciclo celular.

Aunque no es posible ser concluyente en diversos aspectos analizados en este trabajo, los hallazgos clínicos, virológicos e histopatológicos se correlacionan con la distribución del ADN viral, la respuesta inmune innata mediada por los TLR y la muerte celular por apoptosis en cada infección viral y en cada estadio de la infección. Además, los resultados de expresión génica viral, la expresión de

ciclinas y la caracterización de enzimas citolíticas sugieren que la latencia de BoHV5 tendría características particulares que difieren de BoHV1.

CONCLUSIONES GENERALES

✓ En la infección aguda, la distribución de BoHV1 en SNC es más amplia que la de BoHV5, mientras que durante la latencia y reactivación sólo el genoma de BoHV5 está presente en SNC. Sin embargo, no es posible establecer un patrón específico en la distribución del genoma viral en tejido nervioso.

✓ No se detectó la expresión de genes virales en SNC durante la infección aguda, lo cual sugiere que al igual que lo reportado para GT, la transcripción de genes virales no sería eficiente en este tejido.

- ✓ Durante la latencia existe expresión génica viral en SNC y GT de terneros infectados con BoHV5 y en GT de terneros infectados con BoHV1, lo cual puede asociarse con el fenómeno de “reactivación molecular espontánea”.
- ✓ La infección primaria por BoHV1 y BoHV5 estimula la expresión de los TLR 3, 7 y 8. El incremento significativo del TLR3 en la infección por BoHV1 podría restringir su acceso al SNC y el incremento significativo de TLR7 en la infección por BoHV5 podría desempeñar un papel directo en la reducción de la carga viral en el cerebro.
- ✓ La regulación negativa de los TLR7/8 durante la reactivación viral favorecería la diseminación, particularmente de BoHV5, a otras regiones del SNC.
- ✓ BoHV1 tendría más capacidad para inducir apoptosis *in vitro* e *in vivo*. Los cambios apoptóticos se corresponden con la capacidad de replicación de las cepas de BoHV1 y BoHV5.

✓ Existen diferencias notables en la modulación de la expresión de ciclinas por BoHV1 y BoHV5, particularmente en GT, el sitio principal de latencia de los alfa herpesvirus.

✓ Los niveles máximos de expresión de ciclinas A2 y E1 en GT de terneros infectados de forma aguda con BoHV1 favorecería la infección productiva y los mayores niveles de replicación durante esta etapa.

✓ En la infección por BoHV5 los niveles máximos de expresión de ciclina ocurrieron en GT latentemente infectado. Estas diferencias durante la latencia sugieren que BoHV1 y BoHV5 utilizan diferentes estrategias para persistir en el hospedador.

✓ No se detectó una presencia abundante de linfocitos T CD8⁺ en GT. Estos fueron más evidentes durante la infección aguda por BoHV1 y menos evidentes en el GT de los bovinos infectados con BoHV5.

✓ La ausencia de expresión de perforina y granzimas durante la infección aguda facilitaría la diseminación viral en el tejido nervioso.

✓ La expresión de granzima B durante la latencia de BoHV5, sugiere que antígenos virales mantendrían activos a los linfocitos citotóxicos durante esta etapa. La expresión de granzima B durante la reactivación de ambos virus es consistente con su función apoptótica, lo cual facilitaría la excreción viral en esta etapa.

5-BIBLIOGRAFIA

1. Abdelmagid O, Minocha H, Collins J, Chowdhury S. Fine mapping of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) glycoprotein D (gD) neutralizing epitopes by type-specific monoclonal antibodies and sequence comparison with BHV-5 gD. *Virology*. 1995. 206(1): 242–253.
2. Abreu Velez A, Howard M. Tumor-suppressor genes, cell cycle regulatory checkpoints, and the skin. *N Am J Med Sci*. 2015. 7(5): 176-188.
3. Akira S. TLR Signaling. En: Pulendran B y Ahmed R. *Innate Immunity to Immunological Memory*. Springer, Berlin, Heidelberg. 2006. 1–16.
4. Ashbaugh S, Thompson K, Belknap E, Schultheiss P, Chowdhury S, Collins J. Specific Detection of Shedding and Latency of Bovine Herpesvirus 1 and 5 using a Nested Polymerase Chain Reaction. *J Vet Diagn Invest*. 1997. 9(4): 387–394.
5. Awad W, Bohm J, Razzazi-Fazeli E, Hulan H, Zentek J. Effects of deoxynivalenol on general performance and electrophysiological properties of intestinal mucosa of broiler chickens. *Poult Sci*. 2004. 83(12): 1964–1972.
6. Babiuk L, van Drunen Littel-van den Hurk S, Tikoo S. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Vet Microbiol*. 1996. 53(1-2): 31–42.

7. Bagust T, Clark L. Pathogenesis of meningo-encephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. *J Comp Pathol.* 1972. 82(4): 375–383.
8. Bagust T. Comparison of the biological, biophysical and antigenic properties of four strains of infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. *J Comp Pathol.* 1972. 82(4): 365–374.
9. Baker D, Woods T, Butchi N, Morgan T, Taylor R, Sunyakumthorn P, Mukherjee P, Lubick K, Best S, Peterson K. Toll-like receptor 7 suppresses virus replication in neurons but does not affect viral pathogenesis in a mouse model of Langkat virus infection. *J Gen Virol.* 2013. 94: 336-347.
10. Bartha A, Hajdu G, Aldasy P, Paczolay G. Occurrence of encephalitis caused by infectious bovine rhinotracheitis virus in calves in Hungary. *Acta Vet Acad Sci Hung.* 1969. 19: 145-151.
11. Belknap E, Collins J, Ayers V, Schultheiss P. Experimental Infection of Neonatal Calves with Neurovirulent Bovine Herpesvirus Type 1.3. *Vet Pathol.* 1994. 31(3): 358–365.

12. Beltrão N. Herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5): infecção experimental de bovinos e utilização de coelhos como modelo. Tesis de Maestría, Universidad Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil. 2000.
13. Blanco Viera F, Carrillo B, Weber E, Bardon J, Combessies G, Cordeviola J, Nosedá R, Soni C, Schudel A. Casuística neuropatológica. Estudio microscópico de los casos clínicos remitidos al programa de vigilancia de BSE en Argentina, durante el período comprendido entre 1994-1996. *Rev Med Vet (B Aires)*. 1998. 79: 226-230.
14. Borrow P, Martínez-Sobrido L, De la Torre J. Inhibition of the Type I Interferon Antiviral Response During Arenavirus Infection. *Viruses*. 2010. 2(11): 2443–2480.
15. Botos I, Segal D, Davies D. The Structural Biology of Toll-like Receptors. *Structure*. 2011. 19(4): 447–459.
16. Brake F, Studdert M. Molecular epidemiology and pathogenesis of ruminant herpesviruses including bovine, buffalo and caprine herpesviruses 1 and bovine encephalitis herpesvirus. *Aust Vet J*. 1985. 62: 331-334.

17. Bratanich A, Jones C. Localization of Cis-Acting Sequences in the Latency Related Promoter of Bovine Herpesvirus 1 Which are Regulated by Neuronal Cell Type Factors and Immediate-Early Genes. *J Virol*. 1992. 68: 6099-6106.
18. Brenner M, Silva-Frade C, Ferrarezi M, Garcia A, Flores E, Cardoso T. Evaluation of developmental changes in bovine in vitro produced embryos following exposure to bovine herpesvirus type 5. *Reprod Biol Endocrinol*. 2012. 10: 53.
19. Burucúa M, Quintana S, Lendez P, Cobo E, Ceriani M, Dolcini G, Odeón A, Pérez S, Marin M. Modulation of cathelicidins, IFN β and TNF α by bovine alpha-herpesviruses is dependent on the stage of the infectious cycle. *Mol Immunol*. 2019. 111: 136-144.
20. Cagnini D, Cunha P, Pantoja J, Badial P, de Oliveira-Filho J, Araújo-Junior J, Alfieri A, Borges A. Histopathological, immunohistochemical, and molecular study of BHV-5 infection in the central nervous system of experimentally infected calves. *Pesq. Vet. Bras*. 2015. vol.35: 337-343.
21. Cameron J, Alexopoulou L, Sloane J, DiBernardo A, Ma Y, Kosaras B, Flavell R, Strittmatter S, Volpe J, Sidman R, Vartanian T. Toll-like receptor 3 is a potent

- negative regulator of axonal growth in mammals. *J Neurosci*. 2007. 27: 13033-13041.
22. Cardoso T, Ferreira H, Okamura L, Oliveira B, Rosa A, Gameiro R, Flores E. Comparative analysis of the replication of bovine herpesvirus 1 (BHV1) and BHV5 in bovine-derived neuron-like cells. *Arch Virol*. 2015. 160(11): 2683–2691.
  23. Cardoso T, Rosa A, Ferreira H, Okamura L, Oliveira B, Vieira F, Flores E. Bovine herpesviruses induce different cell death forms in neuronal and glial-derived tumor cell cultures. *J Neurovirol*. 2016. 22(6): 725–735.
  24. Cargill E, Womack J. Detection of polymorphisms in bovine toll-like receptors 3, 7, 8, and 9. *Genomics*. 2007. 89(6): 745–755.
  25. Caron L, Flores E, Weiblen R, Scherer C, Irigoyen L, Roehe P, Odeon A, Sur J. Latent infection by bovine herpesvirus type-5 in experimentally infected rabbits: virus reactivation, shedding and recrudescence of neurological disease. *Vet Microbiol*. 2002. 84(4): 285-295.
  26. Carr D, Tomanek L. Herpes Simplex Virus and the Chemokines That Mediate the Inflammation. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006. 303: 47–65.

27. Carrillo B. Encefalitis en bovinos por herpesvirus. *Revista Médica (Bs. As.)* 1982. 63: 372-376.
28. Carrillo B, Pospischil A, Dahme E. Pathology of a bovine viral necrotizing encephalitis in Argentina. *Zentralbl Veterinaarmed.* 1983a. 30: 161-168.
29. Carrillo B, Ambrogi A, Schudel A, Vazquez M, Dahme E, Pospischil A. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. *Zentralbl Veterinaarmed.* 1983b. 30: 327-332.
30. Carty M, Reinert L, Paludan S, Bowie A. Innate antiviral signalling in the central nervous system. *Trends Immunol.* 2014. 35(2): 79–87.
31. Cascio K, Belknap E, Schultheiss P, Ames A, Collins J. Encephalitis Induced by Bovine Herpesvirus 5 and Protection by Prior Vaccination or Infection with Bovine Herpesvirus 1. *J Vet Diagn Invest.* 1999. 11(2): 134–139.
32. Caron L, Flores E, Weiblen R, Scherer C, Irigoyen L, Roehe P, Odeon A, Sur J. Latent infection by bovine herpesvirus type-5 in experimentally infected rabbits: virus reactivation, shedding and recrudescence of neurological disease. *Vet Microbiol.* 2002. (4):285-95.
33. Chan W, Yu J, Yang S. Apoptotic signalling cascade in photosensitized human epidermal carcinoma A431 cells: involvement of singlet oxygen, c-Jun N-

terminal kinase, caspase-3 and p21-activated kinase 2. *Biochem.* 2000. 351: 221–232.

34. Chandranaik B, Shivaraj S, Kumar S, Renukaprasad C. Isolation of BoHV-1 from bovine semen and application of Real Time PCR for diagnosis of IBR/IVP from clinical samples. *Veterinaski Arhiv.* 2010. 80: 467–475.
35. Chang H, Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000. 64:821-846.
36. Choy J, Hung V, Hunter A, Cheung P, Motyka B, Goping I, Sawchuk T, Bleackley R, Podor T, McManus B, Granville D. Granzyme B induces smooth muscle cell apoptosis in the absence of perforin: involvement of extracellular matrix degradation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004. 24(12): 2245-2250.
37. Chowdhury S, Lee B, Mosier D, Sur J, Osorio F, Kennedy G, Weiss M. Neuropathology of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) meningo-encephalitis in a rabbit seizure model. *J Comp Pathol.* 1997. 117(4): 295-310.
38. Ciacchi-Zanella J, Stone M, Henderson G, Jones C. The latency-related gene of bovine herpesvirus 1 inhibits programmed cell death. *J Virol.* 1999. 73(12): 9734–9740.

39. Clarke P, Tyler K. Apoptosis in animal models of virus-induced disease. *Nat Rev Microbiol.* 2009. 7(2): 144–155.
40. Collins J, Schandi C, Young K, Vesely J, Willingham M. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J Histochem Cytochem.* 1997. 45(7): 923-34.
41. Colodel E, Nakazato L, Weiblen R, Mello R, Silva R, Souza M, Filho J, Caron L. Meningoencefalite necrosante causada por herpesvírus bovino no Estado de Mato Grosso, Brasil. *Ciência Rural.* 2002. 32: 293-298.
42. Connolly S, Whitbeck J, Rux A, Krummenacher C, van Drunen Littel-van den Hurk S, Cohen G, Eisenberg R. Glycoprotein D Homologs in Herpes Simplex Virus Type 1, Pseudorabies Virus, and Bovine Herpes Virus Type 1 Bind Directly to Human HveC (Nectin-1) with Different Affinities. *Virology.* 2001. 280(1): 7–18.
43. D'Arce R, Almeida R, Silva T, Franco A, Spilki F, Roehe P, Arns C. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. *Vet Microbiol.* 2002. 88: 315-324.

44. D'Offay J, Mock R, Robert W, Fulton D. Isolation and characterization of encephalitic bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle in North America. *Vet Res. Am J Vet Res.* 1993. 54: 534-539.
45. Daffis S, Samuel M, Suthar M, Gale M, Diamond M. Toll-Like Receptor 3 Has a Protective Role against West Nile Virus Infection. *J Virol.* 2008. 82(21): 10349–10358.
46. D'Amelio M, Cavallucci V, Cecconi F. Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death Differ.* 2010. 17(7): 1104-1114.
47. Dashzeveg N, Yoshida K. Cell death decision by p53 via control of the mitochondrial membrane. *Cancer Lett.* 2015. 367(2): 108–112.
48. Dasika G, Letchworth G. Cellular Expression of Bovine Herpesvirus 1 gD Inhibits Cell-to-Cell Spread of Two Closely Related Viruses without Blocking Their Primary Infection. *Virology.* 1999. 254(1): 24–36.
49. Dasika G, Letchworth G. Homologous and heterologous interference requires bovine herpesvirus-1 glycoprotein D at the cell surface during virus entry. *J Gen Virol.* 2000. 81: 1041-1049.
50. Davison A. Evolution of the herpesviruses. *Vet Microbiol.* 2002. 86(1-2): 69–88.

51. DeCaprio J, Ludlow J, Figge J, Shew J, Huang C, Lee W, Marsilio E, Paucha E, Livingston D. SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell*. 1988. 54(2): 275–283.
52. Decman V, Kinchington P, Harvey S, Hendricks R. Gamma Interferon Can Block Herpes Simplex Virus Type 1 Reactivation from Latency, Even in the Presence of Late Gene Expression. *J Virol*. 2005. 79(16): 10339–10347.
53. Del Médico Zajac M, Puntel M, Zamorano P, Sadir A, Romera S. BHV-1 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle. *Res Vet Sci*. 2006. 81(3): 327–334.
54. Del Médico Zajac M, Ladelfa M, Kotsias F, Muylkens B, Thiry J, Thiry E, Romera S. Biology of bovine herpesvirus 5. *Vet J*. 2010. 184(2): 138–145.
55. Delhon G, González M, Murcia P. Susceptibility of sensory neurons to apoptosis following infection by bovine herpesvirus type 1. *J Gen Virol*. 2002. 83: 2257–2267.
56. Delhon G, Moraes M, Lu Z, Afonso C, Flores E, Weiblen R, Rock D. Genome of Bovine Herpesvirus 5. *J Virol*. 2003. 77(19): 10339–10347.

57. DeLuca N, Schaffer P. Activation of immediate-early, early, and late promoters by temperature-sensitive and wild-type forms of herpes simplex virus type 1 protein ICP4. *Mol Cell Biol.* 1985. 5(8): 1997-2008.
58. Denis M, Splitter G, Thiry E, Pastoret P, Babiuk L. Infectious bovine rhinotracheitis (Bovine herpesvirus 1): helper T cells, cytotoxic T cells, and NK cells. En: Godderis, B., Morrison, W. (Eds). *Cell-mediated immunity in ruminants.* Chapter 10. CRC Press, 1994.
59. Derfuss T, Segerer S, Herberger S, Sinicina I, Hübner K, Ebel K, Theil D. Presence of HSV-1 Immediate Early Genes and Clonally Expanded T-cells with a Memory Effector Phenotype in Human Trigeminal Ganglia. *Brain Pathol.* 2007. 17(4): 389–398.
60. Derkow K, Krüger C, Dembny P, Lehnardt S. Microglia Induce Neurotoxic IL-17+ $\gamma\delta$ T Cells Dependent on TLR2, TLR4, and TLR9 Activation. *PLoS One.* 2015. 10(8): e0135898.
61. Devireddy L, Jones C. Activation of Caspases and p53 by Bovine Herpesvirus 1 Infection Results in Programmed Cell Death and Efficient Virus Release. *J Virol.* 1999. 73(5): 3778–3788.

62. Diallo I, Corney B, Rodwell B. Detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 using a multiplex real-time polymerase chain reaction. *J Virol Methods*. 2011. 175(1): 46–52.
63. Dobbs M, Strasser J, Chu C, Chalk C, Milligan G. Clearance of Herpes Simplex Virus Type 2 by CD8+ T Cells Requires Gamma Interferon and either Perforin- or Fas-Mediated Cytolytic Mechanisms. *J Virol*. 2005. 79(23): 14546–14554.
64. Eckner R, Ewen M, Newsome D, Gerdes M, DeCaprio J, Lawrence J, Livingston D. Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor. *Genes Dev*. 1994. 8(8): 869–884.
65. El-Bacha T, Da Poian A. Virus-induced changes in mitochondrial bioenergetics as potential targets for therapy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013. 45(1): 41–46.
66. Elias F, Schild A, Riet-Correa F. Meningoencefalite e encefalomalacia por Herpesvírus bovino-5: distribuição das lesões no sistema nervoso central de bovinos naturalmente infectados. *Pesqui Vet Bras*. 2004. 24: 123-131.
67. El-Mayet F, Sawant L, Thunuguntla P, Jones C. Combinatorial Effects of the Glucocorticoid Receptor and Krüppel-Like Transcription Factor 15 on Bovine

- Herpesvirus 1 Transcription and Productive Infection. *J Virol.* 2017. 91(21): 904-917.
68. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007. 35(4): 495–516.
  69. Engels M, Ackermann M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Vet Microbiol.* 1996. 53(1-2): 3–15.
  70. Fadok V, Bratton D, Frasch S, Warner M, Henson P. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ.* 1998. 5: 551–562.
  71. Fauquet C, Mayo M, Maniloff J, Desselberger U, Ball L. *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, 197. Elsevier. 2005.
  72. Favier P, Marin M, Morán P, Odeón A, Verna A, Pérez S. Latency of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) in tonsils and peripheral blood leukocytes. *Vet J.* 2014. 202(1): 134–140.
  73. Feldman L, Ellison A, Voytek C, Yang L, Krause P, Margolis T. Spontaneous molecular reactivation of herpes simplex virus type 1 latency in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002. 99(2): 978–983.

74. Fenner. Capítulo 9 - Herpesvirales. En: Fenner's Veterinary Virology. 4th ed. N.J. MacLachlan, E.J. Dubovi (Eds). Academic Press, Elsevier Inc. 2011. 179-187.
75. Flemington E. Herpesvirus Lytic Replication and the Cell Cycle: Arresting New Developments. J Virol. 2001. 75(10): 4475–4481.
76. Flores E. Herpesvirus bovino tipo 1 (HVB-1). Encontro Internacional de Virologia Molecular Veterinária. Universidade Federal de Santa Maria UFSM, Rio Grande do Sul, Brasil, 1996.
77. Flores E, Silva A, Weiblen R. Neuropatogenicidade do herpesvírus bovino tipo 5 (HVB-5) (Avaliação de ovinos e coelhos como modelos experimentais). Simpósio Internacional sobre Herpesvírus bovino (tipo 1 e 5) e vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV). Santa Maria, RS, Brasil, 1998.
78. Flores E, Weiblen R, Vogel F, Dezengrini R, Almeida S, Spilki F, Roehe P. Neuropatogênese experimental da infecção pelo herpesvírus bovino tipo 5 em coelhos. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2009. 29(1): 1-16.
79. Freeman R, Estus S, Johnson E. Analysis of cell cycle-related gene expression in postmitotic neurons: selective induction of Cyclin D1 during programmed cell death. Neuron. 1994. 12: 343–355.

80. French E. A specific virus encephalitis in calves: isolation and characterization of the causal agent. *Aust Vet J.* 1962. 38(4): 216–221.
81. Frizzo da Silva L, Kook I, Doster A, Jones C. Bovine Herpesvirus 1 Regulatory Proteins bICP0 and VP16 Are Readily Detected in Trigeminal Ganglionic Neurons Expressing the Glucocorticoid Receptor during the Early Stages of Reactivation from Latency. *J Virol.* 2013. 87(20): 11214–11222.
82. Fuchs M, Hubert P, Detterer J, Rziha H. Detection of Bovine Herpesvirus Type 1 in Blood from Naturally Infected Cattle by Using a Sensitive PCR That Discriminates between Wild-Type Virus and Virus Lacking Glycoprotein E. *J Clin Microbiol.* 1999. 37(8): 2498–2507.
83. Furuoka H, Izumida N, Horiuchi M, Osame S, Matsui T. Bovine herpesvirus meningoencephalitis association with infectious bovine rhinotracheitis (IBR) vaccine. *Acta Neuropathol.* 1995. 90(6): 565–571.
84. Gabev E, Tobler K, Abril C, Hilbe M, Senn C, Franchini M, Campadelli-Fiume G, Fraefel C, Ackermann M. Glycoprotein D of bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) confers an extended host range to BoHV-1 but does not contribute to invasion of the brain. *J Virol.* 2010. 84(11): 5583–5593.

85. Garcia A, Novais J, Antello T, Silva-Frade C, Ferrarezi M, Flores E, Cardoso T. Bovine herpesvirus type 5 infection regulates Bax/BCL-2 ratio. *Genet Mol Res.* 2013. 12(3): 3897–3904.
86. Geiser V, Inman M, Zhang Y, Jones C. The latency-related gene of bovine herpesvirus-1 can inhibit the ability of bICP0 to activate productive infection. *J Gen Virol.* 2002. 83: 2965–2971.
87. Geiser V, Rose S, Jones C. Bovine herpesvirus type 1 induces cell death by a cell-type-dependent fashion. *Microb Pathog.* 2008. 44(6): 459–466.
88. Geraghty R, Krummenacher C, Cohen G, Eisenberg R, Spear P. Entry of Alphaherpesviruses Mediated by Poliovirus Receptor-Related Protein 1 and Poliovirus Receptor. *Science.* 1998. 280(5369): 1618–1620.
89. Gillette K, Misra V, Bratanich A. Sequence analysis of the alpha trans-inducing factor of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5). *Virus Genes.* 2002. 24(2): 149-52.
90. Giraudo J. Descripción clinica-epidemiológica de casos de meningoencefalitis producidos por herpesvirus bovino en el período (1974-1988). *Therios.* 1989. 13: 287-293.

91. Godowski P, Knipe D. Transcriptional control of herpesvirus gene expression: gene functions required for positive and negative regulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986. 83(2): 256–260.
92. Gomes L, Rocha M, Costa E, Lobato Z, Mendes L, Borges A, Leite R, Barbosa Stancioli E. Detecção de herpesvírus bovino 5 (BoHV-5) em bovinos do Sudeste Brasileiro. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2002. 54: 217-220.
93. Gomes L, Rocha M, Souza J, Costa E, Barbosa-Stancioli E. Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) in bull semen: amplification and sequence analysis of the US4 gene. *Vet Res Commun*. 2003. 27: 495-504.
94. Gondek D, Lu L, Quezada S, Sakaguchi S, Noelle R. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol*. 2005.174(4): 1783–1786.
95. Griffin B, Verweij, M, Wiertz E. Herpesviruses and immunity: The art of evasion. *Vet Microbiol*. 2010. 143(1): 89–100.
96. Guo Y, Shen C, Cheng A, Wang M, Zhang N, Chen S, Zhou Y. Anatid herpesvirus 1 CH virulent strain induces syncytium and apoptosis in duck embryo fibroblast cultures. *Vet Microbiol*. 2009. (3-4): 258-265.

97. Gustafson D. Cellular events in herpesvirus replication and inapparent infections. *J Am Vet Med Assoc.* 1973. 163: 847-849.
98. Guzman E, Hope J, Taylor G, Smith AL, Cubillos-Zapata C, Charleston B. Bovine $\gamma\delta$ T cells are a major regulatory T cell subset. *J Immunol.* 2014. 193(1): 208–222.
99. Halfen D, Vidor T. Meningoencefalite por herpesvirus bovino tipo 5. En: Riet Correa F, Schild A, Mendez M, Lemos R (Eds). *Doencas de ruminantes e equinos*, 2000. Vol 1 - 2ª ed. Editora Varela, Sao Paulo, SP. 97-108.
100. Hanon E, Meyer G, Vanderplasschen A, Dessy-Doize C, Thiry E, Pastoret P. Attachment but not penetration of bovine herpesvirus 1 is necessary to induce apoptosis in target cells. *J Virol.* 1998a. 72: 7638-7641.
101. Hanon E., Lambot M, Hoornaert S, Lyaku J, Pastoret P. Bovine herpesvirus 1-induced apoptosis: phenotypic characterization of susceptible peripheral blood mononuclear cells. *Arch Virol.* 1998b. 143(3): 441–452.
102. Hanon E, Keil G, van Drunen Littel-van den Hurk S, Griebel P, Vanderplasschen A, Rijsewijk F, Babiuk L, Pastoret P. Bovine Herpesvirus 1-Induced Apoptotic Cell Death: Role of Glycoprotein D. *Virology.* 1999. 257(1): 191–197.

103. Hardwick L, Ali F, Azzarelli R, Philpott A. Cell cycle regulation of proliferation versus differentiation in the central nervous system. *Cell Tissue Res.* 2014. 359(1): 187–200.
104. Hashimoto C, Hudson K, Anderson K. The Toll gene of drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell.* 1988. 52(2): 269–279.
105. Hay S, Kannourakis G. A time to kill: viral manipulation of the cell death program. *J Gen Virol.* 2002. 83: 1547–1564.
106. Henderson G, Perng G, Nesburn A, Wechsler S, Jones C. The latency-related gene encoded by bovine herpesvirus 1 can suppress caspase 3 and caspase 9 cleavage during productive infection. *J Neurovirol.* 2004. 10(1): 64–70.
107. Hernández-Ortega K, Ferrera P, Arias C. Sequential expression of cell-cycle regulators and Alzheimer's disease-related proteins in entorhinal cortex after hippocampal excitotoxic damage. *J Neurosci Res.* 2007. 85(8): 1744–1751.
108. Higaki S, Gebhardt B, Lukiw W, Thompson H, Hill J. Effect of Immunosuppression on Gene Expression in the HSV-1 Latently Infected Mouse Trigeminal Ganglion. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002. 43(6): 1862-1869.

109. Hill B, Hill M, Chung Y, Whittle R. Meningoencephalitis in calves due to bovine herpesvirus type 1 infection. *Aust Vet J.* 1984. 61: 242-243.
110. Hommel-Berrey G, Bochan M, Montel A, Goebel W, Froelich C, Brahmi Z. Granzyme B independently of perforin mediates noncytolytic intracellular inactivation of vesicular stomatitis virus. *Cell Immunol.* 1997. 180(1): 1–9.
111. Horiuchi M, Yamazaki N, Furuoka H, Matsui T, Nakagawa M, Ishiguro N, Shinagawa M. Restriction Endonuclease Analysis of Bovine Herpesvirus Type 1 Isolates from Calves with Fatal Encephalitis: Comparison with Vaccine Virus. *J Vet Med Sci.* 1995. 57(3): 577–580.
112. Hossain A, Schang L, Jones C. Identification of Gene Products Encoded by the Latency-Related Gene of Bovine Herpesvirus 1. *J Virol.* 1995. 69(9): 5345–5352.
113. Howe J, Mymrykt J, Egan C, Brantn F, Bayley S. Retinoblastoma growth suppressor and a 300-kDa protein appear to regulate cellular DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci.* 1990. 87: 5883-5887.
114. Hufford M, Kim T, Sun J, Braciale T. The effector T cell response to influenza infection. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2015. 386: 423–455.

115. Hunter E. Virus assembly. En: Fields Virology. 4th edition. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2001. p. 150-169.
116. Ibáñez F, Farías M, Gonzalez-Troncoso M, Corrales N, Duarte L, Retamal-Díaz A, González P. Experimental Dissection of the Lytic Replication Cycles of Herpes Simplex Viruses *in vitro*. Front Microbiol. 2018. 9:2406.
117. Inman M, Lovato L, Doster A, Jones C. A Mutation in the Latency-Related Gene of Bovine Herpesvirus 1 Disrupts the Latency Reactivation Cycle in Calves. J Virol. 2002. 76(13): 6771–6779.
118. Inman M, Zhou J, Webb H, Jones C. Identification of a Novel Bovine Herpesvirus 1 Transcript Containing a Small Open Reading Frame That Is Expressed in Trigeminal Ganglia of Latently Infected Cattle. J Virol. 2004. 78(10): 5438–5447.
119. Ioannou Y, Chen F. Quantitation of DNA fragmentation in apoptosis. Nucleic Acids Res. 1996. 24(5): 992–993.
120. Isaacson M, Compton T. Human cytomegalovirus glycoprotein B is required for virus entry and cell-to-cell spread but not for virion attachment, assembly, or egress. J Virol. 2009. 83(8): 3891–3903.

121. Isernhagen A, Cosenza M, da Costa M, Médici K, Balarin M, Bracarense A, Alfieri A, Lisboa J. Asymptomatic encephalitis in calves experimentally infected with bovine herpesvirus-5. *Can Vet J*. 2011. 52: 1312-1318.
122. Jaber T, Workman A, Jones C. Small Noncoding RNAs Encoded within the Bovine Herpesvirus 1 Latency-Related Gene Can Reduce Steady-State Levels of Infected Cell Protein 0 (bICP0). *J Virol*. 2010. 84(13): 6297–6307.
123. Jian K, Zhang C, Shang Z, Yang L, Kong L. Eucalrobusone C suppresses cell proliferation and induces ROS-dependent mitochondrial apoptosis via the p38 MAPK pathway in hepatocellular carcinoma cells. *Phytomedicine*. 2017. 25: 71–82.
124. Jiang Y, Hossain A, Winkler MT, Holt T, Doster A, Jones C. A protein encoded by the latency-related gene of bovine herpesvirus 1 is expressed in trigeminal ganglionic neurons of latently infected cattle and interacts with cyclin-dependent kinase 2 during productive infection. *J Virol*. 1998. 72(10): 8133-8142.
125. Jin H, Suh H, Kim S, Jo E. Mitochondrial Control of Innate Immunity and Inflammation. *Immune Netw*. 2017. 17(2): 77-88.

126. Johnston L, Simmons G, McGavin M. A viral meningoencephalitis in calves. *Aust Vet J.* 1962. 38: 207-215.
127. Jones C. Alphaherpesvirus latency: its role in disease and survival of the virus in nature. *Adv Virus Res.* 1998. 51: 81-133.
128. Jones C. Herpes Simplex Virus Type 1 and Bovine Herpesvirus 1 Latency. *Clin Microbiol Rev.* 2003. 16(1): 79–95.
129. Jones C, Geiser V, Henderson G, Jiang Y, Meyer F, Pérez S, Zhang Y. Functional analysis of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) genes expressed during latency. *Vet Microbiol.* 2006. 113(3-4): 199–210.
130. Jones C, da Silva L, Sinani D. Regulation of the latency–reactivation cycle by products encoded by the bovine herpesvirus 1 (BHV-1) latency-related gene. *J Neurovirol.* 2011. 17(6): 535–545.
131. Kahrs R. Infectious bovine rhinotracheitis: a review and update. *J Am Vet Med Assoc.* 1977. 171: 1055-1064.
132. Kahrs R. Infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis. *Viral Diseases of Cattle.* Iowa State University Press. 2001. 159-170.

133. Kavanagh E, Rodhe J, Burguillos MA, Venero JL, Joseph B. Regulation of caspase-3 processing by cIAP2 controls the switch between pro-inflammatory activation and cell death in microglia. *Cell Death Dis.* 2014. 5: 1565.
134. Kawai T, Akira S. Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol.* 2005. 17(4): 338–344.
135. Khanna K, Bonneau R, Kinchington P, Hendricks R. Herpes Simplex Virus-Specific Memory CD8⁺ T Cells Are Selectively Activated and Retained in Latently Infected Sensory Ganglia. *Immunity.* 2003. 18(5): 593–603.
136. Kirkland P, Gu X, Davis R, Poynting A. Infertility and venereal disease in cattle inseminated with semen containing bovine herpesvirus type 5. *Vet Rec.* 2009. 165(4): 111–113.
137. Knickelbein J, Khanna K, Yee M, Baty C, Kinchington P, Hendricks R. Noncytotoxic Lytic Granule-Mediated CD8⁺ T Cell Inhibition of HSV-1 Reactivation from Neuronal Latency. *Science.* 2008. 322(5899): 268–271.
138. Knipe D, Cliffe A. Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. *Nat Rev Microbiol.* 2008. 6(3): 211–221.
139. Kook I, Henley C, Meyer F, Hoffmann F, Jones C. Bovine herpesvirus 1 productive infection and immediate early transcription unit 1 promoter are

- stimulated by the synthetic corticosteroid dexamethasone. *Virology*. 2015. 484: 377–385.
140. Kramer MF, Coen DM. Quantification of transcripts from the ICP4 and thymidine kinase genes in mouse ganglia latently infected with herpes simplex virus. *J Virol*. 1995. 69(3): 1389–1399.
  141. Kutish G, Mainprize T, Rock D. Characterization of the Latency-Related Transcriptionally Active Region of the Bovine Herpesvirus 1 Genome. *J Virol*. 1990. 6(12): 5730-5737.
  142. Labrada L, Liang X, Zheng W, Johnston C, Levine B. Age-dependent resistance to lethal alphavirus encephalitis in mice: analysis of gene expression in the central nervous system and identification of a novel interferon-inducible protective gene, mouse ISG12. *J Virol*. 2002. 76: 11688–11703.
  143. Lacasse J, Schang L. During Lytic Infections, Herpes Simplex Virus Type 1 DNA Is in Complexes with the Properties of Unstable Nucleosomes. *J Virol*. 2009. 84(4): 1920–1933.
  144. Lacasse J, Schang L. Herpes Simplex Virus 1 DNA Is in Unstable Nucleosomes throughout the Lytic Infection Cycle, and the Instability of

- the Nucleosomes Is Independent of DNA Replication. *J Virol*. 2012. 86(20): 11287–11300.
145. Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald K, Monks B, Knetter C, Golenbock D. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol*. 2004. 5(2): 190–198.
  146. Lee B, Weiss M, Mosier D, Chowdhury S. Spread of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in the rabbit brain after intranasal inoculation. *J Neurovirol*. 1999. 5(5): 474–484.
  147. Lee H, Lee S, Cho I, Joong Lee S. Toll-Like Receptors: Sensor Molecules for Detecting Damage to the Nervous System. *Curr Protein Pept Sci*. 2013. 14(1): 33–42.
  148. Lee P, Johnson T, Gnanapavan S, Giovannoni G, Wang T, Steiner J, Medynets M, Vaal M, Gartner V, Nath A. Protease-activated receptor-1 activation by granzyme B causes neurotoxicity that is augmented by interleukin-1 β . *J Neuroinflammation*. 2017. 14(1): 131.
  149. Lemaire M, Meyer G, Ernst E, Vanherreweghe V, Limbourg B, Pastoret P, Thiry E. Latent bovine herpesvirus 1 infection in calves protected by colostral immunity. *Vet Rec*. 1995. 137(3): 70-71.

150. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart J, Hoffmann J. The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus*. Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. *Cell*. 1996. 86(6): 973–983.
151. Li Y, van Drunen Littel-van den Hurk S, Babiuk L, Liang X. Characterization of cell-binding properties of bovine herpesvirus 1 glycoproteins B, C, and D: identification of a dual cell-binding function of gB. *J Virol*. 1995. 69: 4758-4768.
152. Li Y, Liang X, van Drunen Littel-van den Hurk S, Attah-Poku S, Babiuk L. Glycoprotein Bb, the N-terminal subunit of bovine herpesvirus 1 gB, can bind to heparan sulfate on the surfaces of Madin-Darby bovine kidney cells. *J Virol*. 1996. 70: 2032-2037.
153. Lindqvist A, Rodríguez-Bravo V, Medema R. The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *J Cell Biol*. 2009. 185: 193–202.
154. Lim H, Seppänen M, Hautala T, Ciancanelli M, Itan Y, Lafaille F, Dell W, Lorenzo L, Byun M, Pauwels E, Rönnelid Y, Cai X, Boucherit S, Jouanguy E, Paetau A, Lebon P, Rozenberg F, Tardieu M, Abel L, Yildiran A, Vergison A, Roivainen R, Etzioni A, Tienari P, Casanova J, Zhang S. TLR3 deficiency in

herpes simplex encephalitis: high allelic heterogeneity and recurrence risk.

Neurology. 2014. 83: 1888-1897.

155. Liu T, Khanna K, Chen X, Fink D, Hendricks R. CD8⁺T Cells Can Block Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) Reactivation from Latency in Sensory Neurons. *J Exp Med*. 2000. 191(9): 1459–1466.
156. Liu T, Khanna K, Carriere B, Hendricks R. Gamma Interferon Can Prevent Herpes Simplex Virus Type 1 Reactivation from Latency in Sensory Neurons. *J Virol*. 2001. 75(22): 11178–11184.
157. Logue S, Cleary P, Saveljeva S, Samali A. New directions in ER stress-induced cell death. *Apoptosis*. 2013. 18(5): 537–546.
158. Lorenzo H, Susin S, Penninger J. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ*. 1999. 6: 516–524.
159. Lovato L, Inman M, Henderson G, Doster A, Jones C. Infection of cattle with a bovine herpesvirus 1 strain that contains a mutation in the latency-related gene leads to increased apoptosis in trigeminal ganglia during the transition from acute infection to latency. *J Virol*. 2003. 77(8): 4848-4857

160. Luna L. En: Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. Mac Graw-Hill (Ed). 3rd edition. Book Company, New York, USA, 1968. p. 258.
161. Magyar G, Tanyi J, Hornyak A, Bartha A. Restriction endonuclease analysis of Hungarian bovine herpesvirus isolates from different clinical forms of IBR, IPV and Encephalitis. *Acta Vet Hung.* 1993. 41: 159-170.
162. Maidana S, Craig P, Craig M, Ludwig L, Mauroy A, Thiry E, Romera S. Evidence of natural interspecific recombinant viruses between bovine alphaherpesviruses 1 and 5. *Virus Res.* 2017. 242: 122–130.
163. Margineda C, Odeón A, Marin M, Odriozola E, Giannetti F, Campero C. Diagnóstico de enfermedades de los bovinos con signos neurológicos en la Región Pampeana. Séptima Reunión Argentina de Patología Veterinaria (VII RAPAVE), Ciudad de Buenos Aires, 2010.
164. Marin M, Quintana S, Faverín C, Leunda M, Odeón A, Pérez S. Toll-like receptor activation and expression in bovine alpha-herpesvirus infections. *Res Vet Sci.* 2014a. 96(1): 196–203.

165. Marin M, Quintana S, Leunda M, Odeón A, Pérez S. Toll-like receptor expression in the nervous system of bovine alpha-herpesvirus-infected calves. *Res Vet Sci*. 2014b. 97(2): 422–429.
166. Marin M, Quintana S, Leunda M, Recavarren M, Pagnuco I, Späth E, Odeón A. A new method for simultaneous detection and discrimination of Bovine herpesvirus types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) using real time PCR with high resolution melting (HRM) analysis. *J Virol Methods*. 2016a. 227: 14–22.
167. Marin M, Leunda M, Verna A, Morán P, Odeón A, Pérez S. Distribution of bovine herpesvirus type 1 in the nervous system of experimentally infected calves. *Vet J*. 2016. 209: 82–86.
168. Martin W. The herpesviruses. *Vet Rec*. 1976. 99: 352-354.
169. Maruyama W, Irie S, Sato T. Morphological changes in the nucleus and actin cytoskeleton in the process of Fas-induced apoptosis in Jurkat T cells. *Histochem J*. 2000. 32(8): 495–503.
170. Matundan H, Mott K, Ghiasi H. Role of CD8+T Cells and Lymphoid Dendritic Cells in Protection from Ocular Herpes Simplex Virus 1 Challenge in Immunized Mice. *J Virol*. 2014. 88(14): 8016–8027.

171. Mayer S, de Quadros V, Vogel F, Winkelmann E, Arenhart S, Weiblen R, Flores E. Dexamethasone-induced reactivation of bovine herpesvirus type 5 latent infection in experimentally infected rabbits results in a broader distribution of latent viral DNA in the brain. *Braz J Med Biol Res.* 2006. 39: 335-343.
172. McGahon A, Martin S, Bissonnette R, Mahboubi A, Shi Y, Mogil R, Nishioka W, Green D. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. *Methods Cell Biol.* 1995. 46: 153-185.
173. McGuire K, Manuja A, Russell G, Springbett A, Craigmile S, Nichani A, Glass E. Quantitative analysis of pro-inflammatory cytokine mRNA expression in *Theileria annulata*-infected cell lines derived from resistant and susceptible cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* 2004. 99(1-2): 87–98.
174. McKercher DG, Bibrack B, Richards WP. Effects of the infectious bovine rhinotracheitis virus on the central nervous system of cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 1970. 156(10): 1460-1467.
175. Medzhitov R, Janeway C. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol.* 1997. 9(1): 4–9.

176. Mettenleiter T. Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res.* 2004. 106(2): 167–180.
177. Metzler A, Schudel A, Engels M. Bovine herpesvirus 1: Molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. *Arch Virol.* 1986. 87(3-4): 205–217.
178. Meurens F, Schynts F, Keil G, Muylkens B, Vanderplasschen A, Gallego P, Thiry E. Superinfection Prevents Recombination of the Alphaherpesvirus Bovine Herpesvirus 1. *J Virol.* 2004. 78(8): 3872–3879.
179. Meyer G, Lemaire M, Ros C, Belak K, Gabriel A, Cassart D, Thiry E. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. *Arch Virol.* 2001. 146(4): 633–652.
180. Miller J, Whetstone C, Bello L, Lawrence W. Determination of the ability of a thymidine kinase-negative deletion mutant of bovine herpesvirus-1 to cause abortion in cattle. *Am J Vet Res.* 1991. 52: 1038-1043.
181. Mocarski E, Upton J, Kaiser W. Viral infection and the evolution of caspase 8-regulated apoptotic and necrotic death pathways. *Nat Rev Immunol.* 2011. 12(2): 79–88.

182. Mohanty S, Dutta, S. Herpesvirus. En: Mohanty y Dutta Virología Veterinaria. Editorial Interamericana S.A. 1988. p. 412.
183. Moretti B, Orfei Z, Mondino G, Persechino A. Infectious bovine rhinotracheitis, clinical observations and isolation of virus. Vet Ital. 1964. 15: 676-702.
184. Mott K, Allen S, Zandian M, Konda B, Sharifi B, Jones C, Ghiasi H. CD8 α Dendritic Cells Drive Establishment of HSV-1 Latency. PLoS ONE. 2014. 9(4): e93444.
185. Muylkens B, Thiry J, Kirten P, Schynts F, Thiry E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. Vet Res. 2007. 38(2): 181–209.
186. Mweene A, Okazaki K, Kida H. Detection of viral genome in non-neural tissues of cattle experimentally infected with bovine herpesvirus 1. Jap J Vet Res. 1996. 44: 165-174.
187. Narita M, Inui S, Namba K, Shimizu Y. Trigeminal ganglionitis and encephalitis in calves intranasally inoculated with infectious bovine rhinotracheitis virus. J Comp Pathol. 1976. 86(1): 93–100.

188. Oakley R, Cidlowski J. The biology of the glucocorticoid receptor: New signaling mechanisms in health and disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2013. 132(5): 1033–1044.
189. Oberhaus S, Smith S, Clayton G, Dermody T, Tyler K. Reovirus infection and tissue injury in the mouse central nervous system are associated with apoptosis. *J Virol*. 1997. 71: 2100–2106.
190. Odeón A. Herpesvirus bovino. Simpósio Internacional sobre Herpesvírus bovino (tipo 1 e 5) e virus da Diarréia Viral Bovina (BVDV). Santa María, RS, Brasil, 1998.
191. Odriozola E, Späth E, Odeón A, Scicchitano S, Campero C, Sernia C, Cseh S, Cipolla A, Paolicchi F, López T, Entrocasso C. Diagnósticos de enfermedades de los bovinos con signos neurológicos en el área de influencia del INTA Balcarce durante el año 2001. XIV Reunión Anual de la AAVLD, Córdoba, Argentina. 2002.
192. Ohta A, Nishiyama Y. Mitochondria and viruses. *Mitochondrion*. 2011. 11(1): 1–12.

193. Okamoto M, Hidaka A, Toyama M, Hosoya T, Yamamoto M, Hagiwara M, Baba M. Selective inhibition of HIV-1 replication by the CDK9 inhibitor FIT-039. *Antiviral Res.* 2015. 123: 1–4.
194. Osorio F. Infectious bovine rinotracheítis and other clinical syndromes caused by bovine herpesvirus-1 or bovine herpesvirus-5. En: *Current Veterinary Therpapy: Food Animal Practice*. Publ. W.B. Saunders, Philadelphia, P.A. 1998. p. 283-286.
195. Pastoret P, Thiry E, Brochier B, Derboven G. Bovid herpesvirus 1 infection of cattle: pathogenesis, latency, consequences of latency. *Ann Vet Res.* 1982. 13: 221-235.
196. Pérez S, Bretschneider G, Leunda M, Osorio F, Flores E, Odeón A. Primary Infection, Latency, and Reactivation of Bovine Herpesvirus Type 5 in the Bovine Nervous System. *Vet Pathol.* 2002. 39(4): 437–444.
197. Pérez S, Vagnozzi A, Sur J, Odriozola E, Campero C, Odeón A. Análisis retrospectivo de casos con diagnóstico de necrosis cerebrocortical y su relación con el herpesvirus bovino tipo 5. *Rev Argt Microbiol.* 2003. 35(2): 69-73.

198. Pérez S, Inman M, Doster A, Jones C. Latency-Related Gene Encoded by Bovine Herpesvirus 1 Promotes Virus Growth and Reactivation from Latency in Tonsils of Infected Calves. *J Clin Microbiol.* 2005. 43(1): 393–401.
199. Pérez S, Meyer F, Henderson G, Jiang Y, Sherman S, Doster A, Inman M, Jones C. A protein encoded by the bovine herpesvirus 1 open reading frame E gene induces neurite-like morphological changes in mouse neuroblastoma cells and is expressed in trigeminal ganglionic neurons. *J Neurovirol.* 2007. 13(2): 139-149.
200. Pérez S, Meyer F, Saira K, Doster A., Jones C. Premature expression of the latency-related RNA encoded by bovine herpesvirus type 1 correlates with higher levels of beta interferon RNA expression in productively infected cells. *J Gen Virol.* 2008. 89(6): 1338–1345.
201. Pérez Gaudio D, Martínez G, Fernández Paggi M, Riccio M, Decundo J, Dieguez S, Tapia M, Soraci A. Protective effect of fosfomycin on deoxynivalenol-treated cell cultures. *European J Biomed Pharmacol Sci.* 2016. 3: 99-106.

202. Peshev R, Christensen L, Christova L. Comparative molecular epidemiological investigation on different bovine herpes viruses. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 1998. 21(4): 247–255.
203. Polman J, Welten J, Bosch D, de Jonge R, Balog J, van der Maarel S, Datson N. A genome-wide signature of glucocorticoid receptor binding in neuronal PC12 cells. *BMC Neurosci*. 2012. 13(1): 118.
204. Ponomarev E, Dittel B. Gamma delta T cells regulate the extent and duration of inflammation in the central nervous system by a Fas ligand-dependent mechanism. *J Immunol*. 2005. 174(8): 4678–4687.
205. Probert L. TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. *Neuroscience*. 2015. 302: 2–22.
206. Pugazhenthir S, Nair S, Velmurugan K, Liang Q, Mahalingam R, Cohrs R, Nagel M, Gilden G. Varicella-zoster virus infection of differentiated human neural stem cells. *J Virol*. 2011. 85: 6678–6686.
207. Reed D, Bicknell E, Bury R. Systemic form of infectious bovine rhinotracheitis in young calves. *J Am Vet Med Assoc*. 1973. 163: 753-755.
208. Reed L, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg*. 1938. 27: 493-497.

209. Riet-Correa G, Dutra Duarte M, Barbosa J, Chaves Oliveira C, Duarte Cerqueira V, de Farias Brito M, Riet-Correa F. Meningoencefalite e poliencefalomalacia causada por herpesvirus bovino-5 no Estado do Pará. *Pesqui Vet Bras*. 2006. 26: 44-46.
210. Rijsewijk F, Kaashoek M, Langeveld J, Meloen R, Maris-Veldhuis M, Judek J, Bienkowska-Szewczyk K, Maris-Veldhuis M, van Oirschot J. Epitopes on glycoprotein C of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) that allow differentiation between BHV-1.1 and BHV-1.2 strains. *J Gen Virol*. 1999. 80(6): 1477–1483.
211. Riley J, Malik A, Holohan C, Longley D. DED or alive: assembly and regulation of the death effector domain complexes. *Cell Death Dis*. 2015. 6(8): e1866.
212. Rissi D, Oliveira F, Rech R, Pierezan F, Lemos R, Barros C. Epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões encefálicas em bovinos afetados por meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. *Pesq Vet Bras*. 2006. 26: 123-132.
213. Rissi D, Pierezan F, Silva M, Furtado Flores E, Barros C. Neurological disease in cattle in southern Brazil associated with bovine herpesvirus infection. *J Vet Diagn Invest*. 2008. 20:346-349.

214. Rock D, Lokensgard J, Lewis T, Kutish G. Characterization of dexamethasone-induced reactivation of latent bovine herpesvirus 1. *J Virol*. 1992. 66(4): 2484–2490.
215. Rock D. The molecular basis of latent infections by alphaherpesviruses. *Sem Virol*. 1993. 4: 157-165.
216. Roels S, Charlier G, Letellier C, Meyer G, Schynts F, Kerkhofs P, Thiry E, Vanopdenbosch E. Natural case of bovine herpesvirus 1 meningoencephalitis in an adult cow. *Vet Rec*. 2000. 146: 586-588.
217. Roizman B, Bartha A, Biggs P, Carmichael L, Granoff A, Hampar B, Kaplan A, Melendez L, Munk K, Nahmias A, Plummer G, Rajcani J, Rapp F, Terni M, de Thé G, Watson D, Wildy P. Provisional labels for herpesviruses. *J Gen Virol*. 1973. 20: 417-419.
218. Roizman B. The structure and isomerization of herpes simplex virus genomes. *Cell*. 1979. 16: 481-494.
219. Roizman B, Baines J. The diversity and unity of herpesviridae. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 1991. 14(2): 63–79.
220. Roizman B, Desrosiers R, Fleckenstein B, Lopez C, Minson A, Studdert M. The family Herpesviridae: an update. *Arch Virol*. 1992. 123: 425-449.

221. Roizman B, Pellet P. The family Herpesviridae: a brief introduction. En: BN Fields, Knipe D, Howley P, Chanock R, Monath T, Melnick J, Roizman B, Straus S. (Eds). Fields Virology, 4th edition. 2007. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, p. 2480-2499.
222. Rosenthal K. Tweaking innate immunity: The promise of innate immunologicals as anti-infectives. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2006. 17(5): 307-314.
223. Salvador J, Lemos R, Riet-Correa F, Roehe P, Osorio A. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvirus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e Sao Paulo. Pesq Vet Bras. 1998. 18: 75-82.
224. Samaniego L, Webb A, DeLuca N. Functional interactions between herpes simplex virus immediate-early proteins during infection: gene expression as a consequence of ICP27 and different domains of ICP4. J Virol. 1995. 69(9): 5705–5715.
225. Samuel M, Morrey J, Diamond M. Caspase 3-dependent cell death of neurons contributes to the pathogenesis of West Nile virus encephalitis. J Virol. 2007. 81: 2614–2623.

226. Santaclara F, Espiñeira M, Cabado A, Vieites J. Detection of land animal remains in fish meals by the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism technique. *J Agric Food Chem*. 2007. 55(2): 305–310.
227. Savarin C, Bergmann CC. Fine Tuning the Cytokine Storm by IFN and IL-10 Following Neurotropic Coronavirus Encephalomyelitis. *Front Immunol*. 2018. 9: 3022.
228. Schafer K. The cell cycle: a review. *Vet Pathol*. 1998. 35: 461-478.
229. Schang L, St Vincent M, Lacasse J. Five years of progress on cyclin-dependent kinases and other cellular proteins as potential targets for antiviral drugs. *Antivir Chem Chemother*. 2006. 17: 293–320.
230. Schang L, Hossain A, Jones C. The latency-related gene of bovine herpesvirus 1 encodes a product which inhibits cell cycle progression. *J Virol*. 1996. 70(6): 3807–3814.
231. Schang L, Jones C. Analysis of bovine herpesvirus 1 transcripts during a primary infection of trigeminal ganglia of cattle. *J Virol*. 1997. 71(9): 6786–6795.

232. Schröder C, Keil G. Bovine herpesvirus 1 requires glycoprotein H for infectivity and direct spreading and glycoproteins gH_{W450} and gB for glycoprotein D-independent cell-to-cell spread. *J Gen Virol*. 1999. 80: 57–61.
233. Schudel A. Virus de encefalitis bovina descubierto en la Argentina. *Acintacnia*. 1983. N 13 p. 5.
234. Schudel A, Carrillo B, Wyler R, Metzler A. Infections of calves with antigenic variants of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) and neurological disease. *Zentralbl Veterinarmed B*. 1986. 33: 303-310.
235. Schwyzer M, Wirth U, Vogt B, Fraefel C. BICP22 of bovine herpesvirus 1 is encoded by a spliced 1.7 kb RNA which exhibits immediate early and late transcription kinetics. *J Gen Virol*. 1994. 75: 1703-1711.
236. Schwyzer M, Ackermann M. Molecular virology of ruminant herpesviruses. *Vet Microbiol*. 1996. 53(1-2): 17–29.
237. Schynts F, McVoy M, Meurens F, Detry B, Epstein A, Thiry E. The structures of bovine herpesvirus 1 virion and concatemeric DNA: implications for cleavage and packaging of herpesvirus genomes. *Virology*. 2003. 314(1): 326–335.

238. Seal B, Whetstone C. Immediate-early gene expression and gene mapping comparisons among isolates of bovine herpesvirus 1 and 5. *Vet Microbiol.* 1994. 38(4): 369–384.
239. Seth R, Sun L, Chen Z. Antiviral innate immunity pathways. *Cell Research.* 2006. 16(2): 141–147.
240. Sheffy B, Davies D. Reactivation of a bovine herpesvirus after corticosteroid treatment. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.* 1972. 140: 974-976.
241. Sheridan B, Khanna K, Frank G, Hendricks R. Latent virus influences the generation and maintenance of CD8⁺ T cell memory. *J Immunol.* 2006. 177(12): 8356-8364.
242. Shimeld C, Hill T, Blyth W, Easty D. Reactivation of latent infection and induction of recurrent herpetic eye disease in mice. *J Gen Virol.* 1990. 71(2): 397–404.
243. Silva A, Weiblen R, Irigoyen L, Roehe P, Sur H, Osorio F, Flores E. Experimental infection of sheep with bovine herpesvirus type-5 (BHV-5): acute and latent infection. *Vet Microbiol.* 1999. 66(2): 89–99.

244. Silva M, Brum M, Loreto E, Weiblen R, Flores E. Molecular and antigenic characterization of Brazilian bovine herpesvirus type 1 isolates recovered from the brain of cattle with neurological disease. *Virus Res.* 2007. 129(2): 191–199.
245. Silva-Frade C, Gameiro R, Okamura L, Flores E, Cardoso T. Programmed cell death-associated gene transcripts in bovine embryos exposed to bovine Herpesvirus type 5. *Mol Cell Probes.* 2014. 28(4): 113–117.
246. Silvestro C, Bratanich A. The latency related gene of bovine herpesvirus types 1 and 5 and its modulation of cellular processes. *Arch Virol.* 2016. 161(12): 3299–3308.
247. Sinani D, Cordes E, Workman A, Thunuguntia P, Jones C. Stress-induced cellular transcription factors expressed in trigeminal ganglionic neurons stimulate the herpes simplex virus 1 ICP0 promoter. *J Virol.* 2013. 87(23): 13042-13047.
248. Smith P, Lombardi G, Foster G. Type I interferons and the innate immune response—more than just antiviral cytokines. *Mol Immunol.* 2005. 42(8): 869–877.

249. Smyth M, Cretney E, Kelly J, Westwood J, Street S, Yagita H, Takeda K, van Dommelen S, Degli-Esposti M, Hayakawa Y. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol*. 2005. 42(4): 501-10.
250. Stopnicki B, Blain M, Cui Q, Kennedy T, Antel J, Healy L, Darlington P. Helper CD4 T cells expressing granzyme B cause glial fibrillary acidic protein fragmentation in astrocytes in an MHCII-independent manner. *Glia*. 2019. 67(4): 582-593
251. Studdert M. Bovine encephalitis herpesvirus. *Vet Record*. 1989 125(23): 584.
252. Suh H, Brosnan C, Lee S. Toll-Like Receptors in CNS Viral Infections. *Toll-Like Receptors: Roles in Infection and Neuropathology. Curr Top Microbiol Immunol*. 2009. 336: 63–81.
253. Suvas S, Azkur A, Rouse B. Qa-1b and CD94-NKG2a interaction regulate cytolytic activity of herpes simplex virus-specific memory CD8+ T cells in the latently infected trigeminal ganglia. *J Immunol*. 2006. 176(3): 1703–1711.
254. Taborda N, Acevedo L, Patiño C, Forero J, López-Herrera A. Actividad antiviral in vitro de extractos de *Hura crepitans* y *Codiaeum variegatum* en

la replicación de herpes virus bovino tipo-1 y virus de estomatitis vesicular.

Rev Colomb Ciencias Pecuarias. 2007. 20:3.

255. Tal-Singer R, Lasner T, Podrzucki W, Skokotas A, Leary J, Berger S, Frazer N.

Gene expression during reactivation of herpes simplex virus type 1 from latency in the peripheral nervous system is different from that during lytic infection of tissue cultures. *J. Virol.* 71: 5268–5276.

256. Traesel C, Sá e Silva M, Weiss M, Spilki F, Weiblen R, Flores E. Genetic diversity of 3' region of glycoprotein D gene of bovine herpesvirus 1 and 5. *Virus Genes.* 2014; 48(3): 438–447.

257. Trapani J, Smyth M. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol.* 2002. 2(10): 735–747.

258. Tummers B, Green D. Caspase-8: regulating life and death. *Immunol Rev.* 2017. 277(1): 76–89.

259. Tyler K, Nathanson N. Pathogenesis of viral infections. En: Knipe DM, Howley PM, (Eds). *Fields Virology.* Lippencott Williams Wilkins, Philadelphia. 2001. 199–244.

260. Ugor E, Prenek L, Pap R, Berta G, Ernszt D, Najbauer J, Németh P, Boldizsár F, Berki T. Glucocorticoid hormone treatment enhances the cytokine

- production of regulatory T cells by upregulation of Foxp3 expression. Immunobiology. 2018. 223(4-5): 422-431.
261. Vanden Oever M, Han J. Caspase 9 is essential for herpes simplex virus type 2-induced apoptosis in T cells. J Virol. 2010. 84: 3116–3120.
  262. Van Lint A, Kleinert L, Clarke S, Stock A, Heath W, Carbone F. Latent Infection with Herpes Simplex Virus Is Associated with Ongoing CD8+ T-Cell Stimulation by Parenchymal Cells within Sensory Ganglia. J Virol. 2005. 79(23): 14843–14851.
  263. Vogel F, Caron L, Flores E, Weiblen R, Winkelmann E, Mayer S, Bastos R. Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. J Clin Microbiol. 2003. 41: 4512-4520.
  264. Vogel F, Flores E, Weiblen R, Winkelmann R, Moraes M, Bragança J. Intrapreputial infection of young bulls with bovine herpesvirus type 1.2 (BHV-1.2): acute balanoposthitis, latent infection and detection of viral DNA in regional neural and non-neural tissues 50 days after experimental reactivation. Vet Microbiol. 2004. 85: 185-196.

265. Voskoboinik I, Whisstock J, Trapani J. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol*. 2015. 15(6): 388-400.
266. Wang P, Hurley D, Braun L, Chase C. Detection of Bovine Herpesvirus-1 in Peripheral Blood Mononuclear Cells Eight Months Postinfection. *J Vet Diagn Invest*. 2001. 13(5): 424–427.
267. Wang J, Shao Y, Bennett T, Shankar R, Wightman P, Reddy L. The Functional Effects of Physical Interactions among Toll-like Receptors 7, 8, and 9. *J Biol Chem*. 2006. 281: 37427-37434.
268. Wang J, Liu P, Latz E, Golenbock D, Finberg R, Libraty D. Flavivirus activation of plasmacytoid dendritic cells delineates key elements of TLR7 signaling beyond endosomal recognition. *J Immunol*. 2006. 177: 7114-7121.
269. Wang H, Tian C, Xu Y, Xie W, Zhang J, Zhang B, Ren K, Wang K, Chen C, Wang S, Shi Q, Shao Q, Dong X. Abortive cell cycle events in the brains of scrapie infected hamsters with remarkable decreases of PLK3/Cdc25C and increases of PLK1/cyclin B1. *Mol Neurobiol*. 2013. 48: 655–668.

270. Wang Z, Zhong T, Wang Y, Song F, Yu X, Xing L, Zhang W, Hua S, Yu X. Human Enterovirus 68 Interferes with the Host Cell Cycle to Facilitate Viral Production. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017. 7: 29.
271. Wentink G, van Oirschot J, Verhoeff J. Risk of infection with bovine herpes virus 1 (BHV-1): a review. *Vet Q*. 1993. 15: 30-33.
272. Werness B, Levine A, Howley P. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*. 1990. 248(4951): 76–79.
273. West A, Shadel G, Ghosh S. Mitochondria in innate immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2011. 11(6): 389–402.
274. Whetstone C, Miller J, Seal B, Bello L, Lawrence W. Latency and reactivation of a thymidine kinase-negative bovine herpesvirus 1 deletion mutant. *Arch Virol*. 1992. 122(1-2): 207-214
275. Whetstone C, Seal B, Miller J. Variability occurs in the inverted repeat region of genomic DNA from bovine herpesvirus 1 respiratory, genital and bovine herpesvirus 5 encephalitic isolates. *Vet Microbiol*. 1993. 38(1-2): 181–189.

276. Winkler M, Doster A, Jones C. Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in the tonsils of latently infected calves. *J Virol.* 2000. 74: 5337-5346.
277. Winkler M, Doster A, Sur J., Jones, C. Analysis of bovine trigeminal ganglia following infection with bovine herpesvirus 1. *Vet Microbiol.* 2002. 86(1-2): 139–155.
278. Wirth U, Vogt B, Schwyzer M. The Three Major Immediate-Early Transcripts of Bovine Herpesvirus 1 Arise from Two Divergent and Spliced Transcription Units. *J Virol.* 1991. 65(1): 195-205.
279. Wirth U, Fraefel C, Vogt B, Vlcek C, Paces V, Schwyzer M. Immediate-Early RNA 2.9 and Early RNA 2.6 of Bovine Herpesvirus 1 are 3' Coterminal and Encode a Putative Zinc Finger Transactivator Protein. *J Virol.* 1992. 66(5): 2763-2772.
280. Workman A, Jones C. Analysis of the cell cycle regulatory protein (E2F1) after infection of cultured cells with bovine herpesvirus 1 (BHV-1) or herpes simplex virus type 1 (HSV-1). *Virus Res.* 2011. 160(1-2): 66–73.
281. Workman A, Eudy J, Smith L, Frizzo da Silva L, Sinani D, Bricker H, Jones C. Cellular Transcription Factors Induced in Trigeminal Ganglia during

- Dexamethasone-Induced Reactivation from Latency Stimulate Bovine Herpesvirus 1 Productive Infection and Certain Viral Promoters. *J Virol.* 2012. 86(5): 2459–2473.
282. Xu X, Zhang K, Huang Y, Ding L, Chen G, Zhang H, Tong D. Bovine herpes virus type 1 induces apoptosis through Fas-dependent and mitochondria-controlled manner in Madin-Darby bovine kidney cells. *Virol J.* 2012. 9(1): 202.
283. Yazici Z, Baskin Y, Baskin H, Gecer O, Hakki Bahar I, Özkul A. Study of programmed cell death in bovine herpesvirus 1 infected MDBK cells and the possible role of nitric oxide in this process. *Acta Vet Hung.* 2004. 52(3): 287–297.
284. Yu W, Geng S, Suo Y, Wei X, Cai Q, Wu B, Zhou X, Shi Y, Wang B. Critical Role of Regulatory T Cells in the Latency and Stress-Induced Reactivation of HSV-1. *Cell Rep.* 2018. 25(9): 2379-2389.
285. Zarembek K, Godowski P. Tissue Expression of Human Toll-Like Receptors and Differential Regulation of Toll-Like Receptor mRNAs in Leukocytes in Response to Microbes, Their Products, and Cytokines. *J Immunol.* 2002. 168(2): 554–561.

286. Zhang S, Jouanguy E, Ugolini S, Smahi A, Elain G, Romero P, Segal D, SanchoShimizu V, Lorenzo L, Puel A, Picard C, Chapgier A, Plancoulaine S, Titeux M, Cognet C, von Bernuth H, Ku C, Casrouge A, Zhang X, Barreiro L, Leonard J, Hamilton C, Lebon P, Héron B, Vallée L, Quintana-Murci L, Hovnanian A, Rozenberg F, Vivier E, Geissmann F, Tardieu M, Abel L, Casanova J. TLR3 Deficiency in Patients with Herpes Simplex Encephalitis. *Science*. 2007. 317(5844): 1522–1527.
287. Zhao C, Wang M, Cheng A, Yang Q, Wu Y, Zhu D, Chen S1, Liu M1, Zhao X, Jia R, Sun K, Chen X. Programmed cell death: the battlefield between the host and alpha-herpesviruses and a potential avenue for cancer treatment. *Oncotarget*. 2018. 9(55): 30704-30719.
288. Zheng J., Viacava Follis A, Kriwack R, Moldoveanu T. Discoveries and controversies in BCL-2 protein-mediated apoptosis. *FEBS J*. 2015. 283(14): 2690–2700.
289. Zhou X, Jiang W, Liu Z, Liu S, Liang X. Virus Infection and Death Receptor-Mediated Apoptosis. *Viruses*. 2017. 9(11): 316.

290. Zhu L, Thompson J, Ma F, Eudy J, Jones C. Effects of the synthetic corticosteroid dexamethasone on bovine herpesvirus 1 productive infection. *Virology*. 2017. 505:71–79.

6-ANEXO

Figura 6.1: Imagen representativa del análisis de la expresión deTK de BoHV5 mediante RT-PCR de un ternero con infección aguda por BoHV5. CO: Corteza Olfatoria, CF: Corteza Frontal, CP: Corteza Posterior, MC: Médula Cervical, GT: Ganglio Trigémico. C-: control negativo. C+: control positivo.

Figura 6.2: Imagen representativa del análisis de la expresión de gB de BoHV5 mediante RT-PCR de un ternero latentemente infectado y de un ternero latentemente infectado tratado con DXM. CO: Corteza Olfatoria, CF: Corteza Frontal, CP: Corteza Posterior, MC: Médula Cervical, GT: Ganglio Trigémico. C-: control negativo. C+: control positivo.

Figura 6.3: Imagen representativa del análisis de la expresión de gD de BoHV1 mediante RT-PCR durante la infección aguda por BoHV1. CO: Corteza Olfatoria, CF: Corteza Frontal, CP: Corteza Posterior, MC: Médula Cervical, GT: Ganglio Trigémico. C-: control negativo. C+: control positivo.

Figura 6.4: Imagen representativa del análisis de la expresión de perforina mediante RT-PCR de un ternero latentemente infectado con BoHV5. CO: Corteza Olfatoria, CF: Corteza Frontal, CP: Corteza Posterior, MC: Médula Cervical, TG: Ganglio Trigémico. C-: control negativo. C+: cDNA de PBLs.

Figura 6.5: Imagen representativa del análisis de la expresión de granzima A mediante RT-PCR de un ternero latentemente infectado con BoHV1. CO: Corteza Olfatoria, CF: Corteza Frontal, CP: Corteza Posterior, MC: Médula Cervical, GT: Ganglio Trigémico. C-: control negativo. C+: cDNA de PBLs.

Figura 6.6: Imagen representativa del análisis de la expresión de granzima B mediante RT-PCR de un ternero latentemente infectado con BoHV5 y otro infectado con BoHV1 tratados con DXM. CO: Corteza Olfatoria, CF: Corteza Frontal, CP: Corteza Posterior, MC: Médula Cervical, GT: Ganglio Trigémico. C-: control negativo. C+: cDNA de PBLs.

PUESTA A PUNTO DETECCIÓN DE ALPHAHERPESVIRUS BOVINO 1 Y 5 POR PCR EN TIEMPO REAL Y DISTINCIÓN DE LOS DOS TIPOS MEDIANTE ANÁLISIS POR HIGH RESOLUTION MELTING (MARIN Y COL., 2016).

- Se evaluaron dos pares de cebadores que amplifican a partir de ADN de ambos virus:

- Cebadores que amplifican un fragmento de 97 pb perteneciente al gen de la glicopreina B de BoHV1 y BoHV5 de Abril y col., 2004.

- Cebadores que amplifican un fragmento de 189 pb perteneciente al gen de la ADN polimerasa de BoHV1 y BoHV5 de Dallio y col., 2011.

- Se evaluaron diferentes temperaturas de annealing: 50°C, 55°C y 60°C.

- Se utilizó un templado de ADN purificado a partir de un cultivo puro de BoHV1 y BoHV5.

PCR - HRM CON LOS CEBADORES DE 97 pb

Figura 6.7: Imagen que ilustra las curvas de melting para los cebadores de 97pb. Si bien se pueden distinguir por HRM los dos tipos de alfa herpesvirus bovinos, los niveles de fluorescencia de las curvas de melting son muy bajos.

GRADIENTE DE CEBADORES DE 97 pb

PCR - HRM CON LOS CEBADORES DE 189 pb

Figura 6.8: Imagen que ilustra las curvas de melting para los cebadores de 189pb. Se pueden distinguir por HRM los dos tipos de alfa herpesvirus bovinos, los niveles de fluorescencia de las curvas de melting permiten diferenciar los dos virus.

GRADIENTE DE CEBADORES DE 189pb

DIFERENCIACION DE BoHV1 Y BoHV5 POR PCR - HRM

CURVAS NORMALIZADAS

GRAFICO DE DIFERENCIA