

Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de Veterinária
Programa Integrado de Residência Multiprofissional

Carlos Eduardo Bastos Lopes

DOENÇA DE LAFORA EM BOVINO

Belo Horizonte

2020

Carlos Eduardo Bastos Lopes

DOENÇA DE LAFORA EM BOVINO

Trabalho de conclusão de residência apresentado ao Programa de Integrado de Residência Multiprofissional da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Patologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Maurício Carvalho Guedes

Belo Horizonte

2020

L864d Lopes, Carlos Eduardo Bastos ,1993-
Doença de Lafora em bovino/Carlos Eduardo Bastos Lopes. – 2020.
57f: il

Orientador: Roberto Maurício Carvalho Guedes
Monografia apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG,
como requisito parcial para obtenção do título Especialista em Patologia Animal
Bibliografias: f:49 a 56.

1. Bovino - Doenças - Teses - 2. Patologia veterinária - Teses –
I. Guedes, Roberto Maurício Carvalho - II. Universidade Federal de Minas
Gerais, Escola de Veterinária – III. Título.

CDD – 636.208 96

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.

ATA DE DEFESA DE TCR DE CARLOS EDUARDO BASTOS LOPES

Às 15:00 horas do dia 25/11/2020 reuniu-se, na Escola de Veterinária da UFMG a Banca Examinadora do Trabalho de Conclusão do Curso, para julgar em exame final, a defesa do TCR intitulado:

"DOENÇA DE LAFORA EM BOVINO",

como requisito final para a obtenção do Título de Especialista em **PATOLOGIA ANIMAL**.

Abriendo a sessão, o Presidente da Banca, ROBERTO MAURÍCIO CARVALHO GUEDES após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares da Defesa do TCR, passou a palavra ao candidato(a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Banca se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento da TCR, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

| | Aprovada | Reprovada |
|----------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|
| Prof. ROBERTO MAURÍCIO CARVALHO GUEDES | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Profa. PAULA ROBERTA GIARETTA | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Dra. THAYNARA PARENTE DE CARVALHO | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Prof. _____ | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Pelas indicações, o (a) candidato (a) foi considerado (a): Aprovado

Reprovado

Nota: 95

Para concluir o Programa, o(a) candidato(a) deverá entregar 7 volumes encadernados da versão final do TCR, acatando, se houver as modificações sugeridas pela banca. Para tanto terá o prazo máximo de 30 dias a contar da data da defesa.

O resultado final, foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo Presidente da Banca. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Banca Examinadora.

Belo Horizonte, 25 de novembro de 2020.

Assinatura dos membros da Banca:

Paula R Giaretta

Thaynara Parente de Carvalho

(Este documento não terá validade sem assinatura e carimbo do Coordenador e não poderá conter rasuras)

Dedico esse trabalho àqueles que nunca desistiram de mim e que me fizeram ser uma pessoa minimamente justa e correta. Aqueles que sempre me ampararam e que nunca me abandonariam. Meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo o que me foi oportunizado nessa jornada. Por todas as vitórias e por todas as derrotas, sendo ambas partes de meu aprendizado e crescimento pessoal e espiritual.

À Universidade Federal de Minas Gerais, pelo fornecimento do amparo necessário para o meu aprendizado, sendo referência na formação de excelentes profissionais. A todas as pessoas que direta ou indiretamente fizeram parte da minha caminhada mineira deixo aqui meus sinceros agradecimentos.

Ao Professor Roberto Guedes, muito mais que um orientador, um tutor e um amigo, tudo representado nessa pessoa simples e de um enorme coração. Obrigado pelos direcionamentos, por todo o apoio prestado e pelas gargalhadas durante as leituras de lâmina, essas certamente eram a melhor parte da semana.

À professora Paula Roberta Giaretta, que há pouco nos surgiu de maneira muito inusitada, mas que, sem dificuldades, já cativou a todos. Cheia de ânimo, empatia e conhecimento, você é um verdadeiro exemplo de um profissional completo. Obrigado por todo o compromisso e tempo empenhado em nossas atividades. Sem você, nada desse trabalho teria sido possível!

Aos demais professores do robusto grupo da Patologia Animal da UFMG: Prof. Felipe Pierezan, Profa. Roselene Ecco, Prof. Renato de Lima Santos, Profa. Rogéria Serakides e Profa. Natália Ocarino. Sou eternamente grato por todo o empenho dedicado à formação dos residentes. Vocês são o grande pilar da minha formação!

À Professora Suzane Beier, que durante todo esse tempo demonstrou ser uma pessoa de singular compaixão. A você devemos todos nós residentes!

Aos residentes Clarissa, Samantha, Lucas, Nayara e Eric, que comigo compartilharam o incansável trabalho diário, junto aos choros e risadas. Aprendi bastante com todos vocês! Tenho a certeza de que estão traçando o caminho dos profissionais brilhantes!

Aos meus grandes amigos, companheiros nos momentos oportunos e nas desventuras tempestuosas: Sóstenes Apolo, Leonardo Gorza e Douglas Marinho. O tempo

não volta, mas as histórias que temos para contar são eternas. Sei que posso contar com vocês!

Aos seletos integrantes do grupo dos “resiloucos”: Jéssica, Luiz, Lucas, Hanna, Clara e Junior, vocês me fizeram entender o significado de resiliência. Obrigado pelos inesquecíveis momentos juntos! Vocês fazem parte da minha história.

Às técnicas de histologia e grandes amigas Valéria, Leimar e Natália. Vocês têm tanto mérito quanto qualquer um outro a frente deste trabalho. Obrigado por toda a paciência e por desempenhar um trabalho de tanta qualidade! Sempre de bom humor, vocês colorem o dia de qualquer um!

Ao técnico de necropsia Luis Assis, um grande amigo e um excelente conselheiro, sempre à disposição para ajudar quem precisa! Devo muito a você!

Aos meus pais, Carlos Henrique Aguiar Lopes e Elza Maria Bastos Lopes, que foram imprescindíveis para todas as etapas da minha vida. Não poderia ter escolhido melhores e mais cuidadosos pais.

Aos meus irmãos Lia Bastos Lopes, Érica Valente Lopes e Lucas Valente Lopes, os quais sempre me ensinaram o conceito de união, me fazendo possível a vivência dentro de uma realidade aconchegante e descontraída.

À amiga de longas datas, companheira de quarentena e namorada, Mariana Andrioli. Não há como exprimir tudo aquilo que você representa para mim. Sei que posso contar com você para qualquer coisa!

A cada uma das pessoas que comigo compartilharam essa caminhada, meus familiares, amigos e colegas de trabalho, dando-me força e ânimo para sempre seguir.

A cada um dos centros/laboratórios que gentilmente aceitaram colaborar com esse trabalho, possibilitando o enriquecimento da investigação diagnóstica através dos exames complementares de altíssima qualidade, fazendo especial menção à Professora Erica Azevedo, Doutor Anibal Armien e doutorandas Thaynara Parente e Andreina Carvalho.

Ao órgão de fomento MEC por todo o apoio e incentivo prestados ao programa de residência.

Um agradecimento especial faço à banca examinadora, a qual, com grande carinho, prontamente aceitou o convite para avaliação deste humilde trabalho.

Não sabendo que era impossível,

ele foi lá e fez.

- Jean Cocteau.

RESUMO

A doença de Lafora é uma desordem neurológica grave, crônica e progressiva, de base genética autossômica recessiva, resultante do acúmulo sistêmico de formas anômalas de glicogênio sob a forma de inclusões que recebem o nome da doença. Nesse trabalho foi relatado um caso da doença de Lafora em um bovino, descrevendo os principais achados anatomopatológicos dessa condição. Uma vaca mestiça de 3 anos de idade foi encontrada morta em uma propriedade de bovinos leiteiros. Os achados histológicos significativos estavam confinados ao encéfalo, fígado e músculo esquelético, e tratavam do intenso acúmulo intra e extracelular dos corpos de Lafora, confirmados histoquimicamente (ácido periódico de Schiff-díastase positivo, Gomori-Grocott positivo, azul de toluidina negativo, vermelho congo negativo, azul alciano positivo) e ultraestruturalmente (inclusões não revestidas por membrana, compostas por filamentos ramificados anastomosantes). A causa da morte foi explicada pela ocorrência concomitante de um quadro de encefalite, cuja base etiológica é ainda desconhecida. Este é, portanto, o primeiro relato da doença de Lafora em um bovino do Brasil.

Palavras-chave: Poliglucosanos; corpos de Lafora; Brasil; vaca; Girolando.

ABSTRACT

Lafora disease is a severe, chronic, and progressive neurologic disorder of an autosomal recessive genetic basis, that results in systemic accumulation of anomalous glycogen structures as inclusions named as the disease. Here it was reported a case of Lafora's disease in a bovine, describing the main anatomopathological findings of this condition. A 3-year-old mixed-breed cow was found dead in a dairy cattle property. Significant histological findings were confined to the brain, liver and skeletal muscle, and consisted of marked intra and extracellular accumulation of Lafora bodies, confirmed histochemically (periodic acid Schiff-diastase positive, Gomori-Grocott positive, toluidine blue negative, Congo red negative, alcian blue positive) and ultrastructurally (non-membrane bound inclusions composed of anastomosing branching filaments). The cause of death was explained by the simultaneous occurrence of encephalitis, which etiological basis is still unknown. Therefore, this is the first Brazilian report of the condition in a bovine.

Keywords: Polyglucosans; Lafora bodies; Brazil; cow; Girolando.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – Mutações causativas na doença de Lafora em humanos. Genes de codificação para laforina e malina (EPM2A e NHLRC1, respectivamente) localizados no mesmo cromossomo (cromossomo 6)..... | 17 |
| Figura 2 – Simplificação da patogênese da doença de Lafora. Geração de formas insolúveis de glicogênio por defeito no complexo laforina-malina..... | 19 |
| Figura 3 – Histoquímica dos corpos de poliglucosanos no encéfalo (tálamo)..... | 39 |
| Figura 4 – Histoquímica dos corpos de poliglucosanos no fígado e no músculo esquelético..... | 40 |
| Figura 5 – Alterações inflamatórias no sistema nervoso central..... | 41 |
| Figura 6 – Aspecto ultraestrutural do corpúsculo de Lafora..... | 43 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 – Doenças de acúmulo intracelular de origem genética em bovinos..... | 21 |
| Tabela 2 – Sequências de oligonucleotídeos iniciadores, região gênica para os ensaios de PCR convencional para <i>Trypanosoma vivax</i> e <i>Trypanosoma evansi</i> | 28 |
| Tabela 3 – Sequências de oligonucleotídeos iniciadores, região gênica para os ensaios de nested PCR para <i>Babesia/Theileria</i> | 29 |
| Tabela 4 – Sequências de oligonucleotídeos iniciadores, região gênica para os ensaios de nested PCR para <i>Anaplasma marginale</i> | 31 |
| Tabela 5 – Sequências de oligonucleotídeos iniciadores, região gênica para os ensaios de nested PCR para <i>Ovine gammaherpesvirus 2</i> | 32 |
| Tabela 6 – Sequências de oligonucleotídeos iniciadores, região gênica para os ensaios de PCR convencional para <i>Bovine herpesvirus 1</i> e <i>Bovine herpesvirus</i> | 33 |
| Tabela 7 – Sequências de oligonucleotídeos iniciadores, região gênica para os ensaios de nested RT-PCR para <i>West Nile</i> vírus..... | 34 |
| Tabela 8 – Padrão de distribuição por área anatômica e análise semiquantitativa das inclusões de Lafora no sistema nervoso central..... | 36 |
| Tabela 9 – Marcação histoquímica dos corpos de Lafora comparada a relatos anteriores..... | 37 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------|--------------------------------------------------------------|
| BoHV-1 | <i>Bovine herpesvirus 1</i> |
| BoHV-5 | <i>Bovine herpesvirus 5</i> |
| CBM20 | Módulo de ligação ao carboidrato aminoterminal da família 20 |
| DCCV | Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DSP | Fosfatase carboxiterminal de dupla especificidade |
| GMS | Metanamina de prata de Grocott |
| HE | Hematoxilina e Eosina |
| ICB | Instituto de Ciências Biológicas |
| IFD | Reação de imunofluorescência direta |
| IMA | Instituto Mineiro de Agropecuária |
| LPV | Laboratório de Protozoologia Veterinária |
| LPVA | Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal |
| LSA | Laboratório de Saúde Animal |
| MET | Microscopia eletrônica de transmissão |
| OvHV-2 | <i>Ovine Gammaherpesvirus 2</i> |
| PAS | Ácido periódico de Schiff |
| PAS-D | Ácido periódico de Schiff-diaestase |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| SNC | Sistema nervoso central |
| UFMG | Universidade Federal de Minas Gerais |

SUMÁRIO

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 15 |
| 2.1 Epidemiologia das doenças neurológicas de bovinos | 15 |
| 2.2 Epidemiologia da doença de Lafora | 16 |
| 2.2.1 Patogenia..... | 17 |
| 2.2.2 Diagnóstico..... | 19 |
| 2.2.3 Diagnósticos diferenciais..... | 21 |
| 2.2.4 Tratamento e prognóstico..... | 22 |
| 3 DESENVOLVIMENTO | 24 |
| 3.1 Histórico clínico | 24 |
| 3.2 Material e métodos | 24 |
| 3.2.1 Macroscopia e histopatologia..... | 25 |
| 3.2.2 Análise semiquantitativa dos corpos de poliglucosanos no SNC..... | 26 |
| 3.2.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)..... | 26 |
| 3.2.4 Reação de imunofluorescência direta (IFD) e inoculação intracraniana em camundongos..... | 27 |
| 3.2.5 Extração de material genético..... | 27 |
| 3.2.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR)..... | 28 |
| 3.2.7 Eletroforese de DNA em gel de agarose..... | 35 |
| 3.3 Resultados | 36 |
| 4 DISCUSSÃO | 45 |
| 5 CONCLUSÕES | 48 |
| REFERÊNCIAS | 49 |

1 INTRODUÇÃO

A doença de Lafora, também denominada glicoproteinose neuronal (Cusick et al., 1998), constitui uma desordem progressiva rara de base genética, ocasionada por um defeito autossômico recessivo (Vandeveldt et al., 2012; Cantile e Youssef, 2015; Desdentado et al., 2019). Tal defeito interfere no metabolismo de carboidratos e resulta no acúmulo de inclusões citoplasmáticas corpusculares que recebem o nome da doença. A condição foi primeiramente descrita na espécie humana em 1911 pelo neuropsiquiatra espanhol Gonzalo Rodríguez Lafora em parceria com o psiquiatra forense Bernard Glueck, a partir de estudos observacionais de pacientes internados no então Hospital de Insanidade de Washington nos Estados Unidos (Lafora e Glueck, 1911; Nanduri et al., 2008). Desde então, relatos esporádicos da doença têm sido documentados em diferentes espécies animais, tais como cães (Holland et al., 1970; Schoeman et al., 2002; Chambers et al., 2018), gato (Hall et al., 1998) e vacas (Kreeger et al., 1990; Simmons, 1994).

Em humanos, a doença está associada à ocorrência de epilepsia mioclônica progressiva (Turnbull et al., 2016; Nitschke et al., 2018; Desdentado et al., 2019), mas outras síndromes neurológicas tem sido igualmente relatadas, bem como a ocorrência do acúmulo isolada de qualquer sintomatologia neurológica, como observado em pacientes geriatrias (Cavanagh, 1999; Minassian et al., 2001), fato igualmente descrito em cães (Borràs et al., 1999) e bovinos com idade avançada (Yanai et al., 1994; Wohlsein et al., 2012).

Devido a sua baixa prevalência, pouco ainda se sabe sobre a condição na medicina veterinária, especialmente sobre sua ocorrência em animais de produção. Portanto, o presente trabalho tem como objetivo relatar um caso da doença de Lafora em um bovino, descrevendo os principais achados anatomopatológicos dessa condição.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epidemiologia das doenças neurológicas de bovinos

No Brasil, as doenças neurológicas contabilizam cerca de 10-30% das causas de morte em bovinos (Sanches et al., 2000; Galiza et al., 2010; Ribas et al., 2013), resultando em perdas econômicas significativas para a pecuária do país (Barros et al., 2006). Algumas dessas doenças são zoonoses graves com implicância na saúde pública, como a encefalopatia espongiforme bovina e a raiva, fazendo com que o diagnóstico etiológico das doenças neurológicas mereça grande notoriedade (Barros et al., 2006; Clarke et al., 2019).

As doenças neurológicas dividem-se basicamente em causas virais, priônicas, bacterianas, protozoárias, tóxicas, genéticas e/ou congênitas, carenciais e/ou metabólicas, e neoplásicas (Barros et al., 2006; Cantile e Youssef, 2015). Dentre as causas virais, a raiva, a herpesvirose bovina e a febre catarral maligna são as de maior importância. Em animais jovens, as doenças bacterianas tomam destaque, citando-se alguns dos principais agentes causadores de meningoencefalite, como *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Histophilus somni*, este último, causador da meningoencefalite tromboembólica (Sanches et al., 2000; Barros et al., 2006; Rissi et al., 2008; Galiza et al., 2010; Dore e Smith, 2016; Clarke et al., 2019).

Outras causas importantes de morte associadas a doenças neurológicas incluem ainda a polioencefalomalácia e a encefalopatia hepática, a última, particularmente em regiões em que há plantas hepatotóxicas, tais como a *Crotalaria retusa* no Nordeste do país, ou ainda o *Senecio brasiliensis* no Sul do Brasil (Sanches et al., 2000).

Uma representatividade ainda menor da mortalidade é observada no grupo de doenças genéticas/hereditárias. Essa baixa prevalência faz com que esse grupo de doenças se tornem esquecidas e/ou subrepresentadas, trazendo consequências desastrosas na produção animal caso negligenciadas, tendo-se como base que a maioria dessas desordens

genéticas possuem caráter recessivo (Barros et al., 2006; Gholap et al., 2013). Esse é o caso de algumas doenças endógenas do armazenamento, como a glicogenose hereditária, de ocorrência documentada em algumas raças de corte, como bovinos Brahman e Shorthorn (Cieploch et al., 2017). Outras condições, ainda mais raras e menos compreendidas, como a doença de Lafora, de ocorrência bem documentada em humanos, representa ainda uma incógnita em animais de produção, tendo em vista os poucos relatos da condição em bovinos (Kreeger et al., 1990; Simmons, 1994).

2.2 Epidemiologia da doença de Lafora

Em humanos, a doença de Lafora surge em uma frequência média de quatro casos a cada milhão de indivíduos (Turnbull et al., 2016), tendendo a ocorrer com maior frequência em países mediterrâneos, norte da África e sul da Índia, locais onde há alta taxa de consanguinidade (Turnbull et al., 2016; Desdentado et al., 2019).

As manifestações clínicas costumam ter início em idade jovem, com curso crônico e progressivo da sintomatologia neurológica e com tempo médio de evolução variando entre 5-10 anos para humanos, quando culmina em um desfecho fatal (Turnbull et al., 2016; Nitschke et al., 2018; Desdentado et al., 2019).

Na medicina veterinária há diversos relatos da doença em cães (Holland et al., 1970; Davis et al., 1990; Jian et al., 1990; Kaiser et al., 1991; Schoeman et al., 2002; Gredal et al., 2003; Fitzmaurice et al., 2008; Hajek et al., 2016; Swain et al., 2017; Chambers et al., 2018), com um único relato em gato (Hall et al., 1998) e apenas três casos documentados em vacas (Kreeger et al., 1990; Simmons, 1994). A condição é ainda descrita em uma raposa (Honnold et al., 2010), um periquito (Loupal, 1985) e um rato (Jayaraj, 1980). Em cães, a doença é mais estudada em Dachshunds miniatura de pelo cerdoso puros, onde Lohi et al. (2005) descreveram que mais que 5% dos cães desta raça sofrem da condição no Reino Unido. Quando comparada com a doença em humanos, o início dos sinais clínicos costuma ocorrer tardiamente em cães, com idade aproximada

quase sempre igual ou maior que 5 anos (Kaiser et al., 1991; Gredal et al., 2003; Lohi et al., 2005). Em bovinos, a idade de acometimento descrita varia de 3 a 6 anos, com tempo médio de evolução dos sinais de poucos dias (Kreeger et al., 1990; Simmons, 1994).

2.2.1 Patogenia

As bases moleculares da condição em humanos se concentram na ocorrência de um defeito genético localizado em um ou em ambos os genes EPM-2A, *locus* 6q24, e EPM-2B (NHLRC1), *locus* 6p22. Ambos loci estão localizados no cromossomo 6, responsáveis por codificar a produção de laforina (fosfatase) e malina (ubiquitina ligase), respectivamente (Figura 1). Em cães, uma mutação simples no gene EPM-2B levando a perda de expressão e função do gene foi identificada em cães das raças Dachshund miniatura de pelo cerdoso, Beagle e Bassett Hound com doença de Lafora (Lohi et al., 2005; Hajek et al., 2016).

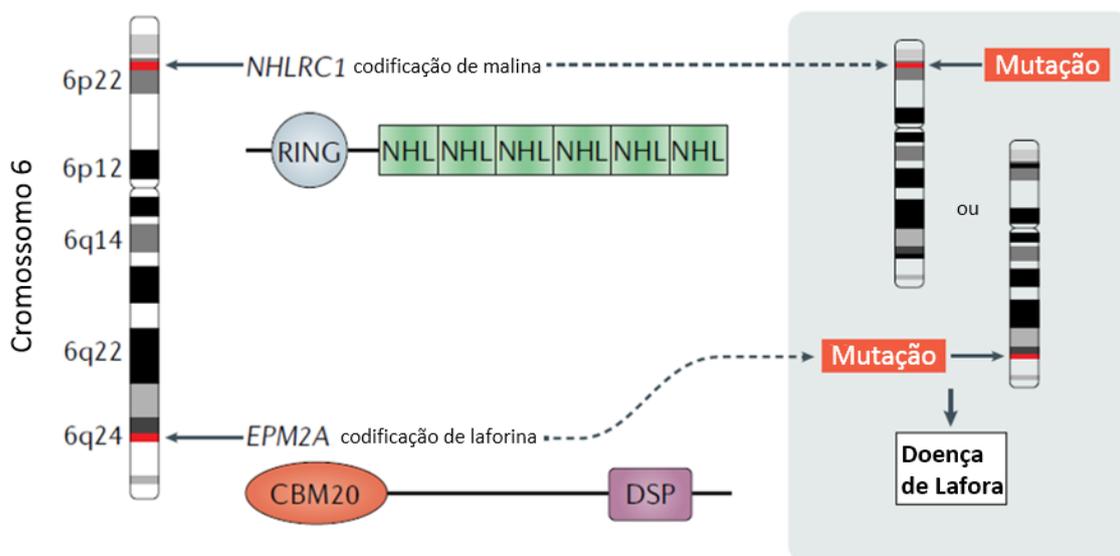


Figura 1: Mutações causativas na doença de Lafora em humanos. Genes de codificação para laforina e malina (EPM2A e NHLRC1, respectivamente) localizados no mesmo

cromossomo (cromossomo 6). A laforina contém um módulo de ligação ao carboidrato aminoterminal da família 20 (CBM20) e um domínio de fosfatase carboxiterminal de dupla especificidade (DSP). A malina contém domínios RING e NHL. Adaptado de Nitschke et al. (2018).

O glicogênio consiste em um tipo de polissacarídeo de reserva encontrado principalmente em animais. Estruturalmente, é também classificado como um polímero de alfa-D-glicose de alto peso molecular. Ainda que haja semelhança funcional e histoquímica, com forte reatividade histoquímica à coloração de ácido periódico de Schiff (PAS), o glicogênio difere do amido (polissacarídeo de reserva de origem vegetal), por se tratar de uma estrutura solúvel em água. Sua síntese depende da ação concomitante de enzimas específicas (glicogênio sintase e enzimas de ramificação) sobre um primer proteico inicial (Manners, 1991; Andrade et al., 2007).

Em condições fisiológicas, complexos formados por ambas as enzimas (laforina-malina) trabalham para a redução da disponibilidade da enzima glicogênio sintase e proteína fosfatase 1, subunidade R5, através de processos que envolvem desfosforilação e poliubiquitinação. Ocorre assim modulação da produção endógena de polissacarídeos e aumentam as ramificações simétricas nas cadeias de glicogênio recém-formadas, o que torna o carboidrato solúvel e reduz a possibilidade de acúmulo da molécula, evitando sua precipitação no citosol da célula produtora (Sullivan et al., 2017).

Em humanos e animais com doença de Lafora, a ausência da função da malina e laforina leva ao acúmulo de glicogênio mal ramificado e insolúvel (poliglucosanos) em compartimentos neuronais somatodendríticos (Figura 2) sob a forma de corpos de Lafora (corpos de poliglucosanos). Ao longo do tempo, o acúmulo resulta em neurodegeneração e desenvolvimento de epilepsia mioclônica progressiva (Turnbull et al., 2016).

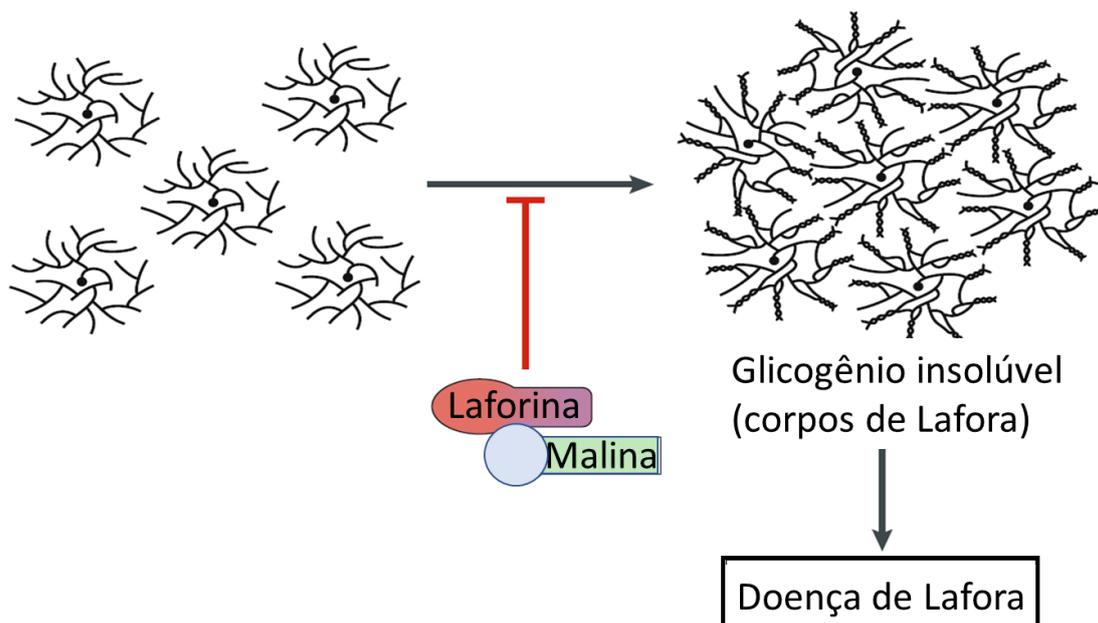


Figura 2: Simplificação da patogênese da doença de Lafora. Geração de formas insolúveis de glicogênio por defeito no complexo laforina-malina. Adaptado de Nitschke et al. (2018).

2.2.2 Diagnóstico

O diagnóstico da condição em humanos se sustenta principalmente na observação da sintomatologia clínica e nos achados anatomopatológicos clássicos, seguidos pela confirmação de mutação gênica, apesar de que métodos de monitoramento eletrofisiológico estejam sendo empregados com sucesso no diagnóstico dessa condição (Turnbull et al., 2016).

Os principais sintomas descritos em humanos consistem em mioclonias deflagradas por ação e/ou estímulos, convulsões refratárias, psicoses, ataxia e disartria. As mioclonias progridem para um padrão de espasmos assimétrico e segmentar praticamente constante (Minassian, 2001; Striano et al., 2008). Cães portadores da condição geralmente apresentam histórico de fasciculações musculares ou contrações

mioclônicas progressivas e crises epiléticas, podendo incluir demência, hiperestesia, depressão/letargia ou agressividade, cegueira, surdez e incontinência urinária/fecal (Holland et al., 1969; Davis et al., 1990; Jian et al., 1990; Schoeman et al., 2002; Fitzmaurice et al., 2008; Hajek et al., 2016; Swain et al., 2017). Em bovinos, os principais sintomas concentram-se em tremores corporais, apatia, incoordenação motora, ataxia e comportamento apreensivo/nervoso (Kreeger et al., 1990; Simmons, 1994).

Em humanos, alterações eletroencefalográficas costumam se iniciar com atividade paroxística focal ou generalizada e uma discreta redução do ritmo de base, que tende a se intensificar com o passar dos anos, evoluindo para ondas de descargas epiléticas difusas, acrescidas de convulsões occipitais, mioclonias e, frequentemente, sensibilidade luminosa (Minassian, 2001; Striano et al., 2008).

Macroscopicamente, não há alterações que indiquem a ocorrência da doença. No entanto, os achados histopatológicos consistem na observância de depósitos de corpúsculos de centro denso e basofílico, circundado por uma camada pálida externa, denominados poliglucosanos ou corpos/corpúsculos de Lafora. Tal acúmulo se cora fortemente positivo pela coloração de ácido periódico de Schiff, sendo resistente à diastase (PAS-D). Frequentemente, as inclusões são encontradas em cortes cerebrais que envolvem a substância negra, núcleo denteado e núcleos talâmicos, onde é visualizado no corpo celular (pericário) e nos dendritos de neurônios. Na doença de Lafora, acúmulos de poliglucosanos são também comumente encontrados no citoplasma de hepatócitos e cardiomiócitos, sendo adicionalmente observados em diversos outros sítios corpóreos, incluindo músculo esquelético e anexos cutâneos (Turnbull et al., 2016; Nitschke et al., 2018; Desdentado et al., 2019).

Desse modo, na medicina humana, a observação dos clássicos corpúsculos de Lafora em glândulas sudoríparas apócrinas e écrinas de biópsias cutâneas possui valor diagnóstico presuntivo para a condição (Turnbull et al., 2016; Nitschke et al., 2018), ainda que alguns refutem sua real aplicabilidade pela possibilidade de falsos positivos (Andrade et al., 2003) e falsos negativos (Lesca et al., 2010).

Em humanos, os testes moleculares são necessários para o diagnóstico definitivo da condição, sendo observadas mutações em um ou em ambos os genes deflagradores da doença [EPM2A e EPM2B (NHLRC1)] (Nitschke et al., 2018).

2.2.3 Diagnósticos diferenciais

A condição é atualmente classificada como uma doença do armazenamento, compreendida dentro do âmbito das doenças degenerativas. Em humanos, os principais diferenciais incluem a doença de Unverricht-Lundborg, epilepsia mioclônica associada a fibras vermelhas, ceroide-lipofuscinoses neuronais e sialidose (Turnbull et al., 2016). Em animais, outros diferenciais devem ser listados, tais como esfingolipidoses, glicoproteinoses, mucopolissacaridoses, glicogenoses hereditárias, manosidoses, mucolipidoses e ceroide-lipofuscinoses (Barros et al., 2006; Vandeveldel et al., 2012; Cantile e Youssef, 2015). A Tabela 1 representa as principais características de alguns desses diferenciais em bovinos. É importante mencionar que corpos de poliglucosanos se acumulam no sistema nervoso central de bovinos e cães com o avançar da idade, sendo observados principalmente em animais a partir dos 8 anos. Nestes animais com idade avançada, os corpos de poliglucosanos também são chamados de *corpora amylacea* e são considerados achados incidentais que não causam sinais neurológicos (Wohlsein et al., 2012).

Tabela 1. Doenças de acúmulo intracelular de origem genética em bovinos. Adaptado de Barros et al. (2006).

| Doença | Deficiência enzimática | Raças afetadas | Principal metabólito acumulado |
|---------------|-------------------------------|-----------------------|---------------------------------------|
| Glicogenoses | | | |
| - Tipo II | | Brahman | Glicogênio |

| | | | |
|---------------------------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------------------------|
| - Tipo II (presumível) | α -1,4- glucosidade α -1,4- glucosidade | Shorthorn | Glicogênio |
| Lafora ^{L1, L2} | Laforina Malina | Holandês e Hereford/Angu s | Formas anômalas de glicogênio |
| Esfingolipidoses | | | |
| - Gangliosidose GM1 | β -galactosidase | Holandês | Gangliosídeo GM, oligossacarídeo contendo maltose |
| Manosidoses | | | |
| - α -manosidose | α -manosidase | Aberdeen Angus, | Oligossacarídeos contendo manose |
| - β -manosidose | β -manosidase | Murray, Galloway Salers | Oligossacarídeos contendo manose |

Lista de abreviações: L1, Kreeger et al. (1990); L2, Simmons et al. (1994).

2.2.4 Tratamento e prognóstico

Até o presente momento, não há tratamento curativo para a doença de Lafora. Nesta linha, drogas antiepiléticas têm sido utilizadas com a finalidade de amenizar a sintomatologia e desacelerar a progressão da doença (Turnbull et al., 2016; Nitschke et al., 2018; Desdentado et al., 2019).

Para os humanos portadores da condição, o prognóstico é invariavelmente desfavorável, com um desfecho fatal, tendo em vista a ausência de drogas específicas de

alta eficácia e a piora progressiva da sintomatologia apesar dos esforços em retardá-la (Turnbull et al., 2016). Resultados contrastantes têm sido observado no âmbito da medicina veterinária (Holland et al., 1970; Davis et al., 1990; Jian et al., 1990; Honnold et al., 2010; Hajek et al., 2016; Chambers et al., 2018), ainda que modelos animais tenham se mostrado promissores ao se utilizar de técnicas de engenharia genética e terapia gênica (Turnbull et al., 2016).

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 Histórico clínico

Uma vaca mestiça (girolando) de três anos de idade foi encontrada caída ao chão com salivação profusa e mugidos “roucos”. O animal estava com temperatura corporal de 42°C e apresentou movimentos de pedalagem, vindo a óbito em cerca de 30 minutos. A vaca era proveniente de uma criação leiteira em Desterro de Entre Rios, Minas Gerais, sendo criada em regime de *Compost Barn*. A alimentação consistia de caroço de algodão, feno, fubá, soja, silagem de milho e núcleo (Vacinar®). De acordo com a veterinária responsável, a vaca morreu cerca de seis dias após o seu segundo parto. Até onde se tem conhecimento, não há histórico de alterações comportamentais de ambos os filhotes até o presente momento. Por informação, não havia sido realizada qualquer alteração de manejo antes do início da sintomatologia neurológica. O animal não possuía comorbidades prévias e estava alocado em um lote de 200 bovinos, todos vacinados regularmente para raiva. Havia histórico de outras mortes com evolução clínica semelhante na mesma propriedade, totalizando outras cinco vacas adultas de idade aproximada e com óbito no período puerperal, sem grau de parentesco genético entre si.

3.2 Material e métodos

Após a verificação do óbito, a carcaça foi encaminhada para o serviço de necropsia no setor de Patologia Animal no Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária (DCCV) da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Durante o exame cadavérico, fragmentos de diferentes órgãos foram coletados e encaminhados para exames complementares nos seguintes laboratórios/centros/instituições: California Animal Health and Food Safety Laboratory System, sediado na Universidade de UC

Davis na Califórnia; Laboratório de Saúde Animal (LSA) do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA); Laboratório de Protozoologia Veterinária (LPV) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG; e Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal (LPVA) da UFMG.

3.2.1 Macroscopia e histopatologia

O transporte da carcaça foi realizado em carroceria aberta não refrigerada. Ao chegar ao Laboratório de Patologia Animal da UFMG, passadas oito horas do óbito, o animal foi submetido ao exame necroscópico completo. Fragmentos de encéfalo [córtex telencefálico, núcleos basais, tálamo, cerebelo e tronco encefálico (mesencéfalo, ponte e bulbo)], rede admirável, medula espinhal, fígado, baço, rim, pulmão, coração, músculo esquelético, esôfago, pré-estômagos, abomaso, intestino delgado, intestino grosso, linfonodos mesentéricos e glândula mamária foram coletados e fixados em formalina neutra tamponada a 10%. Após 48 horas, as amostras foram clivadas e processadas rotineiramente para a histopatologia. Os tecidos emblocados em parafina foram seccionados a 5 µm de espessura, corados por Hematoxilina e Eosina (HE) e examinados em microscópio óptico convencional, com base no preconizado por Luna (1968). Colorações especiais complementares pelo ácido periódico de Schiff (PAS), PAS-diastase (PAS-D), metanamina de prata de Grocott (GMS), azul de toluidina, vermelho Congo, azul alciano e Ziehl-Neelsen foram realizadas em cortes do sistema nervoso central (SNC). Os corantes histoquímicos PAS e PAS-D foram adicionalmente utilizados em secções histológicas de músculo esquelético e fígado.

3.2.2 *Análise semiquantitativa dos corpos de poliglucosanos no SNC*

Cortes histológicos sequenciais do sistema nervoso central foram realizados a fim de contemplar os principais sítios anatômicos: córtex frontal, córtex parietal, córtex temporal, córtex occipital, núcleos da base (núcleo caudado, putâmen, globo pálido e substância negra), tálamo [núcleo ventral lateral, núcleo dorsal medial, núcleo central medial, núcleo ventral caudal, núcleo lateral caudal e núcleo geniculado lateral (dorsal)], hipocampo (giro denteado), cerebelo [camada molecular e substância branca (pedúnculo)], tronco, rede admirável e medula espinhal cervical.

A análise sistemática dos corpos de poliglucosanos de cada um dos referidos sítios partiu da avaliação de cortes histológicos observados à microscopia óptica de luz em campos de grande aumento (400x). O processo consistiu de duas etapas: avaliação do neurópilo e do corpo celular de neurônios (quando aplicável). Para tanto, os corpos de poliglucosanos foram contados individualmente em cada campo representativo e graduados de acordo com a frequência de observação: acúmulo não observado, acúmulo leve (até 1 corpúsculo/campo), acúmulo moderado (de 2 a 5 corpúsculos/campo) e acúmulo intenso (acima de 5 corpúsculos/campo).

3.2.3 *Microscopia eletrônica de transmissão (MET)*

Blocos parafinizados do tálamo foram pós-fixados em cacodilato tamponado a 0.166 M, solução de glutaraldeído a 3% e em solução de tetróxido de ósmio a 1%, desidratados e incluídos em *EMbed*[®] (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania 19440, USA). Secções de um micrômetro de espessura, coradas por azul de metileno foram utilizadas para avaliar as alterações histológicas e para selecionar as áreas para serem examinadas ultraestruturalmente. Então, secções selecionadas foram cortadas a 70-80 nm, coradas com acetato de uranil e citrato de chumbo e examinadas em microscópio eletrônico.

3.2.4 Reação de imunofluorescência direta (IFD) e inoculação intracraniana em camundongos

Amostras de lobo caudal telencefálico, tronco encefálico, tálamo, cerebelo e medula espinhal cervical foram submetidas à imunofluorescência direta e inoculação intracraniana em camundongos no LSA do IMA para diagnóstico de raiva, conforme o preconizado pela Organização Mundial de Saúde (Meslin et al., 1996).

3.2.5 Extração de material genético

Para a pesquisa de hemoparasitas (*Trypanosoma* sp., *Babesia/Theileria* e *Anaplasma marginale*), o ácido desoxirribonucleico (DNA) genômico das amostras de fígado, encéfalo (tronco encefálico, cerebelo e lobo caudal telencefálico), rim e baço foi extraído utilizando o kit comercial DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen®, Germany), seguindo as instruções do fabricante.

Para a detecção do DNA do *Ovine gammaherpesvirus 2* (OvHV-2), *Bovine herpesvirus 1* (BoHV-1) e *Bovine herpesvirus 5* (BoHV-5) e ácido ribonucleico (RNA) do *West Nile virus*, o material genético das amostras de tronco encefálico, cerebelo e lobo caudal telencefálico foi extraído utilizando o kit comercial DNA/RNA mini spin, Kasvi®, K9-1050, seguindo as instruções do fabricante.

Todas as amostras de DNA e RNA extraídas foram armazenadas a -20°C até a realização das reações em cadeia da polimerase.

3.2.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Todas as amplificações de DNA utilizadas para pesquisa de hemoparasitas foram realizadas para um volume final de 10 μ L, contendo uma mistura de 1 μ L de DNA-amostra; 0,2 μ M de concentração de cada primer; 5 μ L de GoTaq[®] Green Master Mix, 2X (Promega[®], Madison, Wisconsin, Estados Unidos); 400 mM de dNTP; 3 mM de MgCl₂; e água ultrapura esterilizada (Nuclease-Free Water, Promega[®], Madison, Wisconsin, Estados Unidos) q.s.p. 10 μ L. As reações de nested PCR foram realizadas seguindo as mesmas especificações citadas anteriormente, utilizando 1 μ L de produto amplificado da primeira reação.

Ensaio de PCR para detectar DNA de *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma evansi* foram realizados conforme descrito por Lima et al. (1994), Omanwar et al. (1999) e Ravindran et al. (2008), cujas descrições estão na Tabela 2.

Tabela 2. Sequências de oligonucleotídeos iniciadores, região gênica para os ensaios de PCR convencional para *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma evansi*.

| Sequência dos Oligonucleotídeos iniciadores (5'-3') | Tamanho do produto amplificado (pb) | Região gênica | Referência |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------|
| DTO154 (ACAGAATTCCAGGGCCAATGCGGC TCGTGCTGG) | 500 | Domínio catalítico do gene da Catepsina L | Lima et al. (1994) |
| DTO155 (TTAAAGCTTCCACGAGTTCTTGAT GATCCAGTA) | | (<i>Trypanosoma vivax</i>) | |

| | | | |
|--------------------------------------|-----|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| TevF (TGCAGACGACCTGACGCTACT (21) | | Glicoproteína de superfície variante-específica | Ravindran et al. (2008) e Omanwar et al. (1999) |
| TevR (CTCCTAGAAGCTTCGGTGTCT) (22) | 227 | (<i>Trypanosoma evansi</i>) | |

As reações de amplificação para o domínio catalítico do gene da Catepsina L de *Trypanosoma vivax* foram conduzidas de acordo com a sequência térmica: desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos, 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, seguidos de uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Para o gene da glicoproteína de superfície variante-específica de *Trypanosoma evansi*, as reações de amplificação foram conduzidas de acordo com a sequência térmica: desnaturação inicial de 95°C por 4 minutos, 30 ciclos a 95°C por 60 segundos, 55°C por 40 segundos e 72°C por 30 segundos, seguidos de uma extensão final a 72°C por 4 minutos.

Para detecção de DNA de parasitos dos gêneros *Babesia/Theileria* as amostras de DNA foram submetidas a ensaios de nested PCR, baseados nos genes 18S rRNA de *Babesia/Theileria* utilizando os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Zahler et al. (2000) e Silveira et al. (2011), cujas descrições estão na Tabela 3.

Tabela 3. Sequências de oligonucleotídeos iniciadores, região gênica para os ensaios de nested-PCR para *Babesia/Theileria*.

| Sequência dos Oligonucleotídeos iniciadores (5'-3') | Tamanho do produto amplificado (pb) | Região gênica | Referência |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------|---------------|------------|
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------|---------------|------------|

| | | | |
|-----------------------|----------------------|------|-----------------------------------------------|
| | RIB19 | | |
| | (CGGGATCCAACCTGGTTGA | | |
| 1 ^a reação | TCCTGC) | 1700 | Zahler et al. |
| | RIB20 | | (2000) |
| | (CCGAATTCCTTGTTACGAC | | |
| | TTCTC) | | 18S |
| | BAB-rumF | | rRNA/ <i>Babesia</i> / <i>Theileria</i> |
| | (ACCTCACCAGGTCCAGAC | | |
| 2 ^a reação | AG) | 430 | Silveira et |
| | BAB-rumR | | al. (2011) |
| | (GTACAAAGGGCAGGGACG | | |
| | TA) | | |

As reações de amplificação para os genes 18S rRNA de *Babesia/Theileria* foram conduzidas de acordo com sequência térmica no primeiro e segundo ciclo: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 63°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, seguidos de uma extensão final a 72°C por 2 minutos. Para o gene MPSP de *T. orientalis*: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, seguidos de uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

A pesquisa de DNA de *Anaplasma marginale* foi realizada por ensaios de nested-PCR baseados no gene *msp4*, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores descritos por De la Fuente et al. (2008), Silveira et al. (2012), respectivamente, cujas descrições constam na Tabela 4.

Tabela 4. Sequências de oligonucleotídeos iniciadores, região gênica para os ensaios de nested PCR para *Anaplasma marginale*.

| Sequência dos Oligonucleotídeos iniciadores (5'-3') | Tamanho do produto amplificado (pb) | Região gênica | Referência |
|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------|
| MSP45 (GGGAGCTCCTATGAATTACA GAGAATTGTTTAC) | 872 | msp4/A naplas ma margin ale/A. ovis | De la Fuente et al. (2008) |
| MSP43 (CCGGATCCTTAGCTGAACAG GAATCTTGC) | | | |
| AnapF (CGCCAGCAAACCTTTCCAAA) | 294 | | Silveira et al. (2011) |
| AnapR (ATATGGGGACACAGGCAAAT) | | | |

As reações de amplificação para *Anaplasma marginale* foram conduzidas de acordo com sequência térmica no primeiro e segundo ciclo: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 63°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, seguidos de uma extensão final a 72°C por 2 minutos.

A nested-PCR para detecção do DNA do *Ovine gammaherpesvirus 2* baseou-se na amplificação de parte do gene que codifica a proteína do tegumento viral, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores desenhados por Baxter et al. (1993), cujas descrições constam na Tabela 5. As amplificações de DNA foram realizadas para um volume final de 25 µL, contendo uma mistura de 2 µL de DNA-total; Buffer 1X (Phoneutria®); 2 mM

de MgCl₂; 200 mM de dNTP (Phoneutria[®]); 0,4 µM para cada primer; 1,5 U de Taq DNA polimerase (Phoneutria[®]); e água livre de DNA/RNase. Para a segunda reação, 2 mL do amplicon da primeira reação foram utilizados como alvo para a amplificação da segunda reação.

Tabela 5. Sequências de oligonucleotídeos iniciadores, região gênica para os ensaios de nested PCR para *Ovine gammaherpesvirus 2*.

| | Sequência dos Oligonucleotídeos iniciadores (5'-3') | Tamanho do produto amplificado (pb) | Região gênica do OVHV-2 | Referência |
|-----------|------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------|
| | 556 (AGTCTGGGGTATATGAATC CAGATGGCTCTC) | | | |
| 1ª reação | 775 (AAGATAAGCACCCAGTTATG CATCTGATAAA) | 422 | Gene da proteína do tegumento | Baxter et al. (1993) |
| 2ª reação | 556 e 555 (TTCTGGGGTAGTGGCGAGC G AAGGCTTC) | 238 | | Baxter et al. (1993) |

As ciclagens das reações de amplificação para *Ovine gammaherpesvirus 2* foram idênticas nas 2 reações de amplificação da nested-PCR, sendo: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 30 ciclos a 94°C por 1 minuto, 46°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, seguidos de uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

A nested-PCR para detecção do DNA do *Bovine herpesvirus 1* e *Bovine herpesvirus 5* baseou-se na amplificação de parte do gene que codifica uma região altamente conservada da glicoproteína B, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores desenhados por Van Engelenburg et al. (1993), cujas descrições constam na Tabela 6. As reações de amplificação para BoHV-1/BoHV-5 foram conduzidas de acordo com sequência térmica: 40 ciclos a 95°C por 30 segundos, 52°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos, seguidos de uma extensão final a 72°C por 7 minutos e 4°C *overnight*.

Tabela 6. Sequências de oligonucleotídeos iniciadores, região gênica para os ensaios de PCR convencional para *Bovine herpesvirus 1* e *Bovine herpesvirus 5*.

| Sequência dos Oligonucleotídeos iniciadores (5'-3') | Tamanho do produto amplificado (pb) | Região gênica | Referência |
|----------------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Glicoproteína B (<i>forward</i>) (CTGCTGTTCGTAGCCCACAACG) | 173 | Região altamente conservada da glicoproteína B (BoHV-1/BoHV-5) | Van Engelenburg et al. (1993) |
| Glicoproteína B (<i>reverse</i>) (TGTGACTTGGTGCCCATGTCGC) | | | |

As amplificações de DNA foram realizadas para um volume final de 25 µL, contendo uma mistura de 200 ng de DNA-total; 1,5 mM de MgCl₂; 200 µM de dNTPs Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), tampão da enzima Taq DNA polymerase 1X; 0,4 µM de cada primer; 0,3 U/reacção de Taq DNA polymerase (Phoneutria®); e água ultrapura estéril q.s.p.

A investigação do RNA do *West Nile virus* foi realizada por ensaios de nested RT-PCR baseados no gene NS5, utilizando na primeira reacção oligonucleotídeos iniciadores

para *Flavivirus* gênero específicos, conforme descrito por Fulop et al. (1993), seguidos de uma segunda reação, que utiliza oligonucleotídeos iniciadores específicos para *West Nile virus*, segundo Silva et al. (2018), cujas descrições constam na Tabela 7.

Tabela 7. Sequências de oligonucleotídeos iniciadores, região gênica para os ensaios de nested RT-PCR para *West Nile virus*.

| | Sequência dos Oligonucleotídeos iniciadores (5'-3') | Tamanho do produto amplificado (pb) | Região gênica | Referência |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------|---------------------|
| 1ª reação | NS5 (<i>forward</i>) (TCAAGGAACTCCACACATG AGATGTACT) NS5 (<i>reverse</i>) (GTGTCCCATCCTGCTGTGTC ATCAGCATACA) | 958 | NS5/ <i>Flavivirus</i> | Fulop et al. (1993) |
| 2ª reação | NS5 (<i>forward</i>) (AACCKCCAGAAGGAGTSAA R) NS5 (<i>reverse</i>) (AGCYTCRAACTCCAGRAAG C) | 370 | NS5/ <i>West Nile virus</i> | Silva et al. (2018) |

A reação de RT-PCR foi realizada utilizando SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase, para um volume final de 25 µL, contendo uma mistura de 5 µL de RNA-total; 12,5 µl de tampão 2x Reaction mix contendo 0,4 mM

de cada dNTP e 3,2 mM de MgSO₄; 0,6 μM de cada primer (*forward* e *reverse*), 1 U de SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix) e água livre de DNA/RNase.

Para a segunda reação, foi utilizado um volume final de 25 μL, contendo uma mistura de 2 μL de amplicon da primeira reação-total; 2,5 μl de 10 × tampão para PCR (200 mM Tris-HCl [pH 8,4], 500 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 0,4 μM de cada primer (*forward* e *reverse*), 0,8 μM de cada dNTP, 1 U de Taq DNA polimerase (Platinum Taq DNA polymerase: Invitrogen®) e água livre de DNA/RNase.

As reações de amplificação para *West Nile virus* foram conduzidas de acordo com sequência térmica: 40 ciclos a 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, seguidos de uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

3.2.7 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Para a pesquisa de hemoparasitas, os produtos amplificados por meio dos ensaios de PCR e nested-PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 2,0% (m/v) corado com GelRed™ (Biotium, Fremont, USA), em tampão de corrida TAE 0,5X (TRIS 400 mM, Ácido Acético 1% e EDTA 20 mM). Para a pesquisa viral, os produtos amplificados por meio dos ensaios de nested-PCR e nested RT-PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% (m/v), no *Ovine gammaherpesvirus 2*, e 1,0% nos amplificados do *West Nile virus*. Ambos foram corados com brometo de etídio (Sambrook e Russel, 2001), sendo utilizado o tampão de corrida TBE 1X (Tris-HCl 0,09 M; ácido bórico 0,09 M e EDTA 0,002 M).

Em todas as amostras, a eletroforese foi realizada a 100 V/400 mA durante 60 minutos. Para a determinação do tamanho em pares de bases dos produtos amplificados de interesse utilizou-se um marcador de peso molecular de 100 pares de base de DNA Ladder (Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos). Os resultados foram visibilizados e analisados através de um transiluminador de luz ultravioleta.

3.3 Resultados

Macroscopicamente, não foram observadas alterações significativas que justificassem o óbito. Os principais achados histopatológicos estavam confinados ao encéfalo, fígado e músculo esquelético. Nos núcleos talâmicos, havia acúmulo intraneuronal e extracelular (neurópilo) de material circular de centro basofílico denso, circundado por um halo claro periférico de bordos radiados, variando de 2 a 20 μm de diâmetro (corpos de poliglucosanos/Lafora). Em menor grau, os acúmulos foram observados em áreas do neurópilo de diversos segmentos encefálicos. Dados correlacionando o padrão de distribuição e intensidade dos acúmulos no encéfalo estão listados na Tabela 8. Os acúmulos foram corados fortemente positivos à coloração de GMS, azul alciano e PAS, mantendo positividade em secções teciduais tratadas com diastase (PAS-D), sendo negativos à coloração de azul de toluidina, vermelho Congo e Ziehl-Neelsen, conforme disposto na Tabela 9 e na Figura 3. Os corpos de poliglucosanos foram adicionalmente observados no citoplasma de hepatócitos e no sarcoplasma de rabdomiócitos (Figura 4).

Tabela 8. Padrão de distribuição por área anatômica e análise semiquantitativa das inclusões de Lafora no sistema nervoso central.

| Área anatômica | Intensidade | |
|------------------|-------------|---------------------------|
| | Neurópilo | Neurônios (corpo celular) |
| Córtex frontal | + | - |
| Córtex parietal | + | - |
| Córtex temporal | + | - |
| Córtex occipital | + | - |
| Núcleos da base | | |
| - Núcleo caudado | + | - |

| | | |
|-----------------------------------------|-----|-----|
| - Putâmen | ++ | + |
| - Globo pálido | + | - |
| - Substância negra | + | - |
| Tálamo | | |
| - Núcleo ventral lateral | +++ | +++ |
| - Núcleo dorsal medial | +++ | +++ |
| - Núcleo central medial | +++ | +++ |
| - Núcleo ventral caudal | +++ | +++ |
| - Núcleo lateral caudal | +++ | +++ |
| - Núcleo geniculado lateral (dorsal) | +++ | +++ |
| Hipocampo | | |
| - Giro denteado | + | - |
| Cerebelo | | |
| - Camada molecular | + | - |
| - Substância branca (pedúnculo) | ++ | - |
| Tronco | + | - |
| Rede admirável | - | - |
| Medula espinhal cervical | + | - |

Lista de abreviações: -, acúmulo não observado; +, acúmulo leve; ++, acúmulo moderado; +++, acúmulo intenso.

Tabela 9. Marcação histoquímica dos corpos de Lafora comparada a relatos anteriores.

| Coloração histoquímica | Kreeger et al. (1990) | Simmons (1994) | Presente caso |
|-----------------------------------|----------------------------------|---------------------------|----------------------|
| PAS | + | + | + |
| PAS-D | + | + | + |

| | | | |
|-------------------|---|---|---|
| GMS | + | + | + |
| Azul de toluidina | + | + | - |
| Vermelho Congo | - | - | - |
| Azul alciano | - | + | + |
| Ziehl-Neelsen | x | - | - |

Lista de abreviações: +, marcado; -, não marcado; x, dado não disponível.

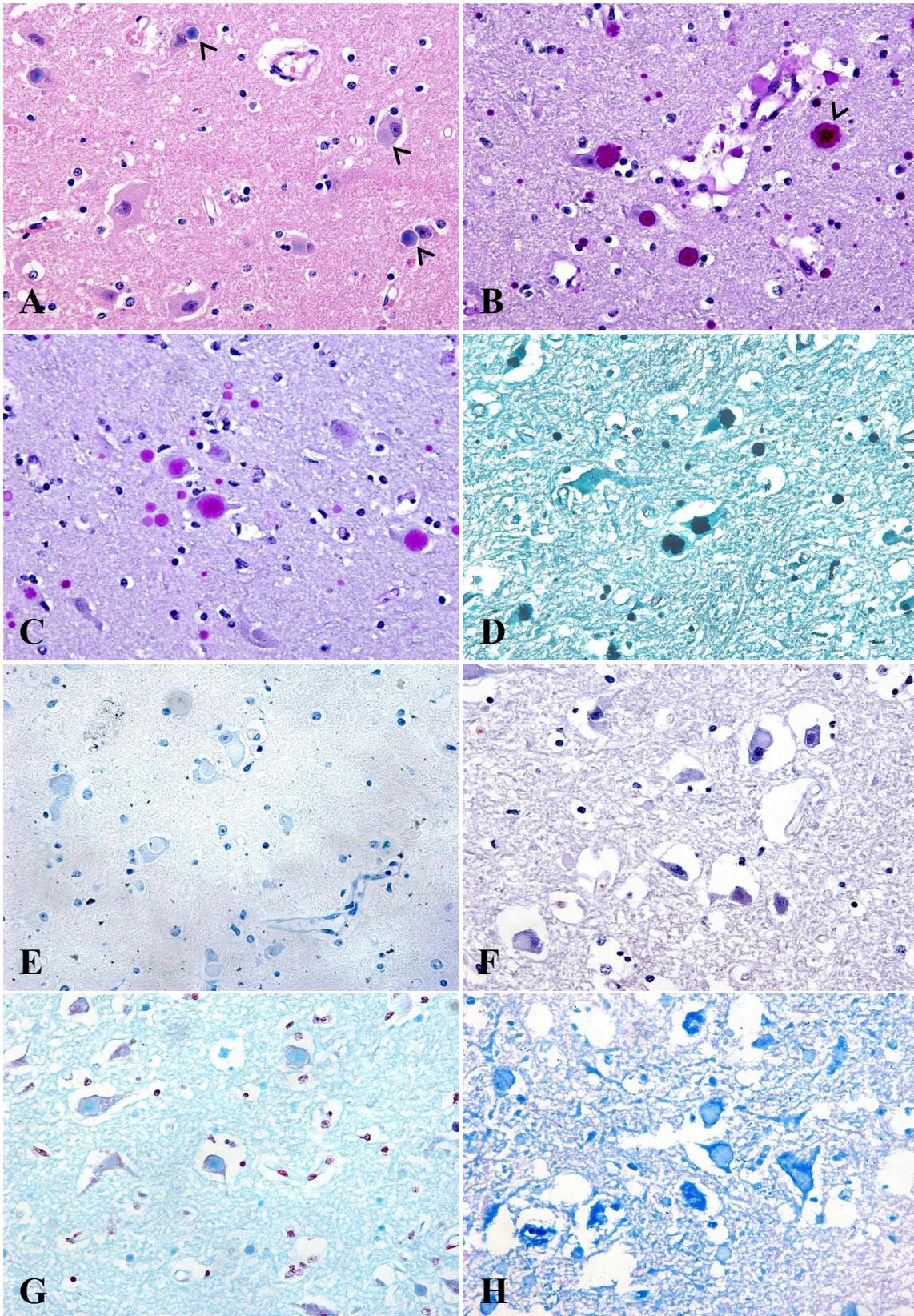


Figura 3: Histoquímica dos corpos de poliglucosanos no encéfalo (tálamo). A. Corpos de Lafora no pericário de neurônios. HE, 400x. B. Inclusões intra e extracelulares com forte marcação histoquímica. Alguns corpúsculos apresentam padrão fibrilar externo (aspecto de couve-flor), com centro denso e radiado (cabeça de seta). PAS, 400x. C. Numerosas inclusões intra e extracelulares resistentes à diastase. PAS-D, 400x. D. Inclusões fortemente marcadas pela prata. GMS, 400x. E. Inclusões intraneuronais sem afinidade pelo corante histoquímico. Azul de toluidina, 400x. F. Inclusões intraneuronais sem afinidade pelo corante histoquímico. Vermelho Congo, 400x. G. Corpos de Lafora intra e extracelulares com marcação histoquímica positiva. Azul alciano, 400x. H. Inclusões intra e extracelulares sem afinidade pelo corante histoquímico. Ziehl-Neelsen, 400x.

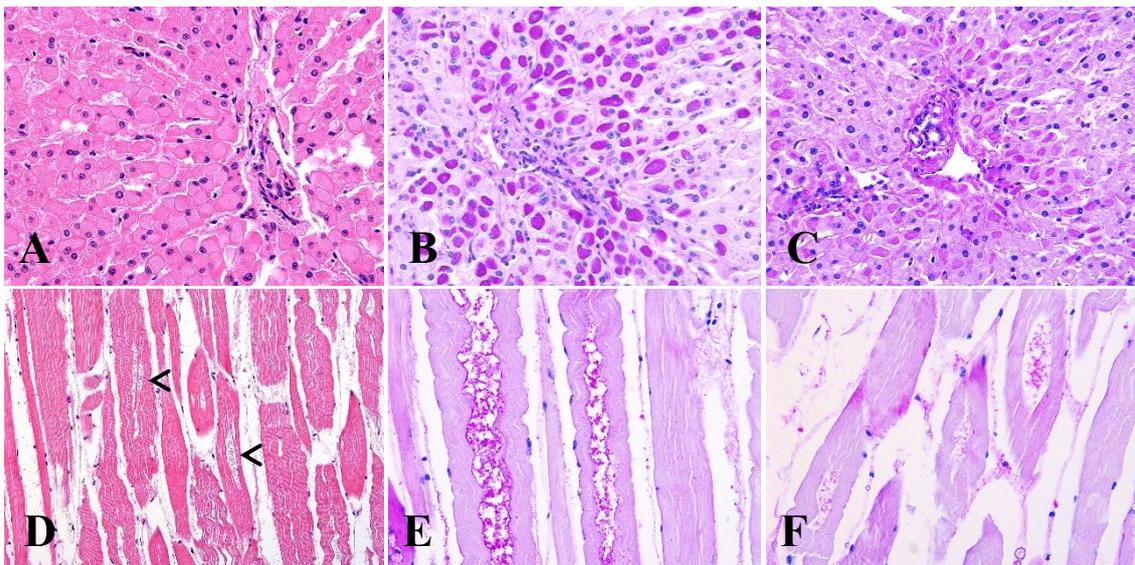


Figura 4: Histoquímica dos corpos de poliglucosanos no fígado e no músculo esquelético. A. Fígado. Hepatócitos com acúmulo intracitoplasmático difuso e intenso de material homogêneo e fracamente basofílico (aspecto de vidro fosco). HE, 400x. B. Fígado. Acúmulo citoplasmático fortemente marcado. PAS, 400x. C. Fígado. Material intracitoplasmático parcialmente resistente à diastase. PAS-D, 400x. D. Músculo esquelético. Sarcoplasma com área central de degeneração por acúmulo de material basofílico e finamente granular (cabeças de seta). HE, 200x. E. Músculo esquelético.

Acúmulo sarcoplasmático fortemente marcado. PAS, 400x. F. Músculo esquelético. Material sarcoplasmático resistente à diastase. PAS-D, 400x.

Em áreas adicionais do encéfalo (córtex telencefálico, núcleo caudado, núcleos basais, tálamo, substância branca cerebelar e tronco encefálico), e medula espinhal cervical, havia focos discretos de degeneração axonal (esferoides) com infiltrado de linfócitos, histiócitos e raros neutrófilos íntegros perivasculares, formando manguitos com duas a quatro camadas celulares, acompanhados de moderada reatividade endotelial (encefalomielite não supurativa). No neurópilo e parênquima nervoso havia acúmulo multifocal discreto de astrócitos e células da micróglia, por vezes acompanhados de necrose individual de neurônios multifocal discreta. No gânglio trigeminal havia infiltrado linfocitário multifocal mínimo. As principais alterações inflamatórias vistas no encéfalo estão exemplificadas na Figura 5. Nos fragmentos de pulmão analisados foi observado edema difuso acentuado e congestão difusa intensa. Não foram observadas alterações histológicas significativas nos outros tecidos examinados (baço, rim, coração, esôfago, pré-estômagos, abomaso, intestino delgado, intestino grosso linfonodos mesentéricos e glândula mamária).

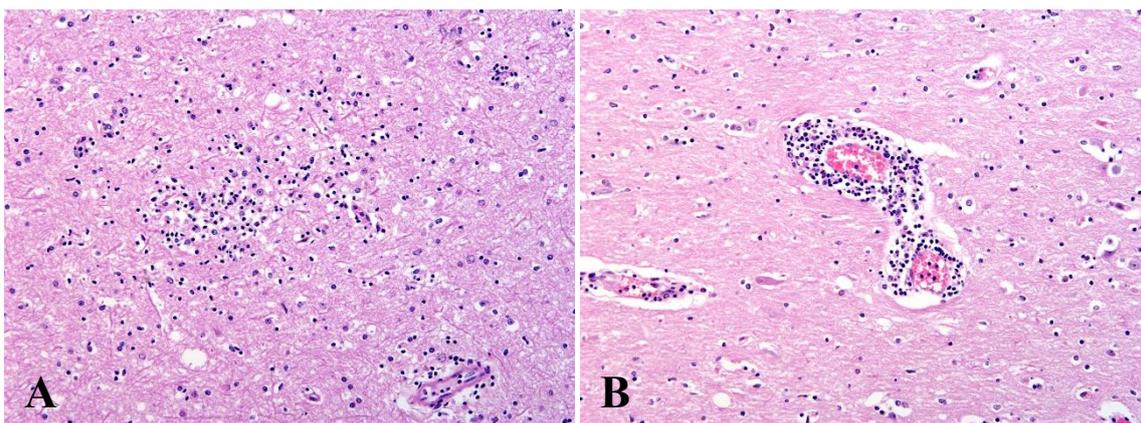


Figura 5: Alterações inflamatórias no sistema nervoso central. A. Substância branca telencefálica. Neuroparênquima com área focal de gliose central. Periféricamente, raros linfócitos perivasculares. HE, 200x. B. Córtex telencefálico. Vaso sanguíneo central com

acúmulo moderado de linfócitos e plasmócitos no espaço perivascular (manguito). HE, 200x.

No exame de microscopia eletrônica, os corpos de poliglucosanos eram arredondados, sem revestimento por membranas. Os corpos tinham 5,71 a 9,94 μm de diâmetro e consistiam em emaranhados de filamentos lineares curtos de 10 a 12 nm (Figura 6).

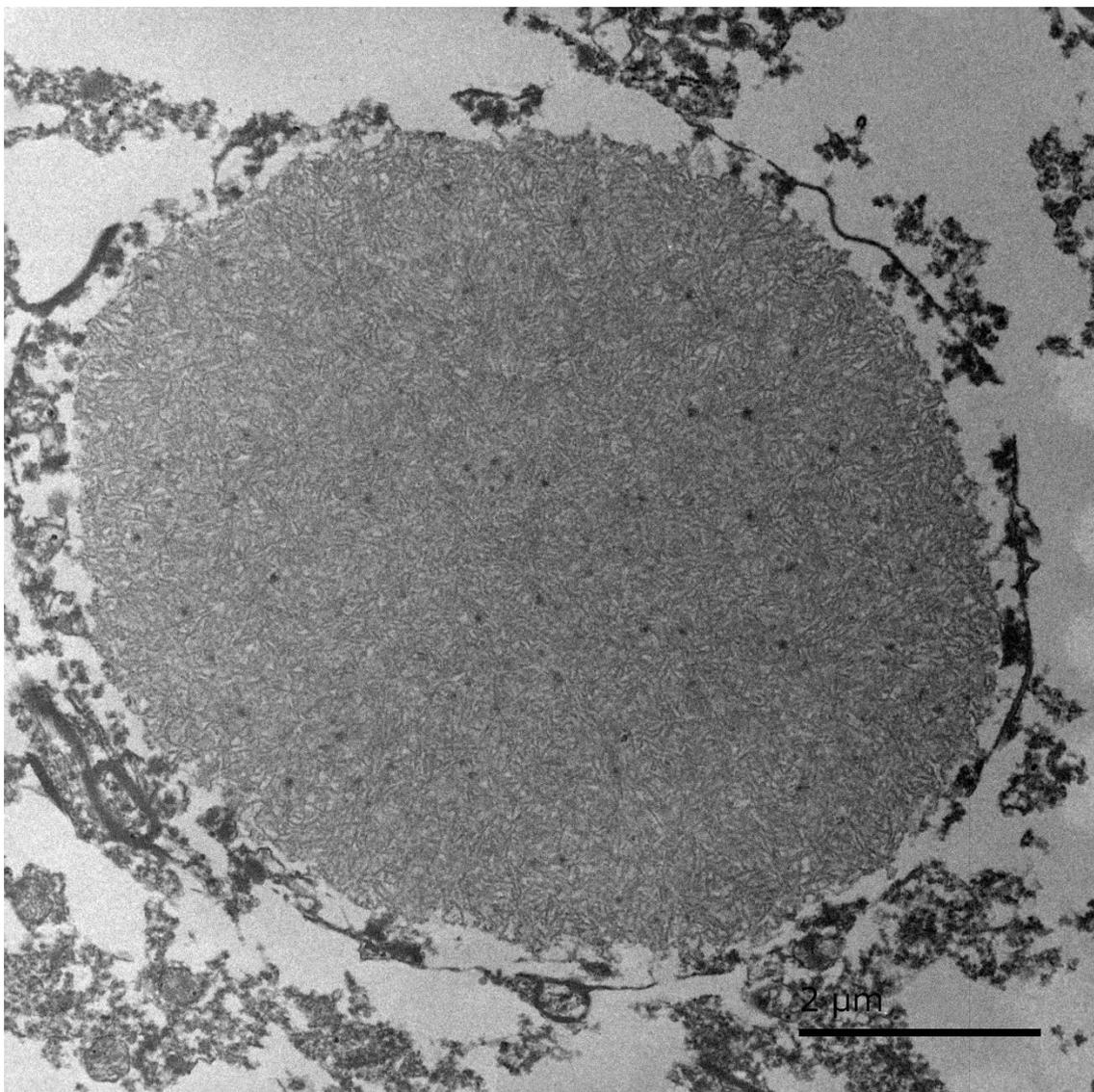


Figura 6: Aspecto ultraestrutural do corpúsculo de Lafora. Tálamo. Inclusão intraneuronal circular não revestida por membrana, composta por filamentos ramificados anastomosantes de 10-12 nm de comprimento, com ocasionais grânulos eletrodensos aleatoriamente distribuídos. MET, barra = 2 μ m.

Acerca dos testes complementares adicionais, as amostras de encéfalo e medula espinhal, submetidas aos exames para diagnóstico de raiva, tiveram resultado negativo

para ambos os exames (IFD e inoculação intracraniana em camundongos). Os ensaios de nested-PCR resultaram negativo para todos os agentes testados.

4 DISCUSSÃO

Os achados histopatológicos, histoquímicos e ultraestruturais, combinados à ausência de alterações macroscópicas possibilitaram o diagnóstico de doença de Lafora neste bovino.

Com base no conjunto de achados anatomopatológicos, as principais alterações histopatológicas estavam confinadas aos núcleos talâmicos, fígado e músculo esquelético, semelhante ao relatado por Kreeger et al. (1990) e Simmons (1994). Esses dois são os únicos relatos da doença em bovinos, os quais também correlacionam o aparecimento da doença dentro da faixa etária de 3 a 6 anos.

O painel histoquímico utilizado foi elaborado com base no preconizado para cães e bovinos (Holland et al., 1970; Davis et al., 1990; Jian et al., 1990; Kreeger et al., 1990; Simmons, 1994; Schoeman et al., 2002; Turnbull et al., 2016). O padrão de afinidade tintorial do presente caso diferiu do observado na maioria dos outros relatos unicamente na resposta ao corante azul de toluidina, apresentando metacromasia negativa. No entanto, esse achado assemelha-se ao observado por Schoeman et al. (2002), sendo possível que essa característica esteja sujeita a variações laboratoriais individuais. Adicionalmente, as colorações de PAS e GMS maximizaram a observação dos corpos de poliglucosanos, muitas vezes imperceptíveis à avaliação convencional com HE, devido à escassez em número e diâmetro de alguns dos acúmulos em determinadas áreas do SNC.

A ocorrência do acúmulo de corpos de poliglucosanos isolada de qualquer sintomatologia clínica é ainda descrita por Yanai et al. (1994) em bovinos velhos. Este fato intrigante é também visto em cães senis (Borràs et al., 1999; Márquez et al., 2010), quando o acúmulo passa a receber a denominação de corpora amylacea (Suzuki et al., 1978; Suzuki et al., 1980; Kamiya et al., 1983; Yamanami et al., 1992; Duran e Guinovart, 2015). Apesar de se assemelharem em termos morfotintoriais, estes incidentais corpúsculos diferem das inclusões de Lafora por serem exclusivamente extracelulares, localizando-se preferencialmente na superfície telencefálica e cerebelar, espaço

perivascular e em áreas da substância branca circunventricular (Cavanagh, 1999; Wohlsein et al., 2012; Navarro et al., 2018).

Outros tipos de acúmulos, ainda menos frequentes, mas de morfologia semelhante, também merecem destaque, é o caso dos incidentais corpos de Buscaino (“mucócitos”), os quais se assemelham aos corpos de Lafora por serem fracamente basofílicos e positivos à coloração de PAS. Frequentemente, no entanto, esses acúmulos apresentam grandes dimensões, chegando a medir aproximadamente 100 µm de diâmetro, sendo considerados artefatos de fixação e estando restritos ao neurópilo preferencialmente da substância branca (Garman, 2011; Wohlsein et al., 2012).

Um dos principais diferenciais desta forma atípica de acúmulo de glicogênio (doença de Lafora) consiste na glicogenose hereditária generalizada, condição também descrita em bovinos, ocorrendo a partir do acúmulo sistêmico de glicogênio por redução da atividade da enzima glicosidase alfa ácida (Barros et al., 2006). Apesar de a distribuição sistêmica ser também uma característica da glicogenose hereditária, essa condição diverge da estudada por diferir no formato e na afinidade tintorial dos acúmulos por determinados corantes histoquímicos, sendo sensível à atividade enzimática da diastase (PAS-D negativo). Esta mesma coloração possibilitou ainda a diferenciação de formas anômalas de glicogênio dos acúmulos fisiológicos de glicogênio no tecido muscular e hepático.

O padrão de distribuição dos corpos de poliglucosanos no tecido nervoso comprova a severidade da doença, ainda que não tenha sido possível determinar a real parcela de contribuição dos acúmulos sistêmicos dentro do quadro clínico apresentado devido às lesões inflamatórias concomitantes. De acordo com a literatura, não é esperada reação inflamatória nos casos de doença de Lafora (Minassian, 2001). Portanto, apesar de não ter sido elucidada a causa específica para o distúrbio inflamatório no sistema nervoso central neste animal, é levado a crer que a encefalite tenha contribuído substancialmente para o óbito, possibilitando o exame necroscópico em uma fase ainda precoce da doença de Lafora, o que é respaldado pela ausência de sintomatologia clínica crônica e progressiva previamente documentada. Nesta linha, encefalites por *Trypanosoma spp.*,

Herpesvirus, ou ainda pelo vírus rábico, são epidemiologicamente importantes em bovinos do Brasil (Galiza et al., 2010; Ribas et al., 2013; Terra et al., 2018), do mesmo modo que *Babesia bovis* e *Theileria parva*, eventualmente relacionados a alterações clínicas neurológicas (Sanches et al., 2000; Valli et al., 2015). No presente caso, todos estes agentes foram desconsiderados com base nos resultados de PCR apresentados.

De acordo com Gavier-Widen et al. (2001), baixos graus de inflamação no sistema nervoso podem não ter necessariamente repercussões clínicas. No entanto, a distribuição e intensidade dos achados inflamatórios de certas áreas deste caso levam a considerar as causas infecciosas de encefalite como a hipótese mais provável. Portanto, é possível que outros agentes infecciosos, não testados molecularmente, estejam associados à contraparte inflamatória da doença neurológica, tais como *Listeria monocytogenes* ou mesmo *Chlamydophila* sp. ainda que, histologicamente, não tenha sido possível a observação de características etiológicas específicas, tais como microrganismos ou corpúsculos de inclusão intralesionais, impossibilitando o direcionamento do diagnóstico. A infecção pelo *Astrovirus* foi também incluída na lista de agentes virais possivelmente associados à encefalite neste caso, sendo um agente frequentemente reportado na Europa (Bouzalas et al., 2014; Selimovic-Hamza et al., 2016) e nos Estados Unidos (Li et al., 2013). Entretanto, ainda que nunca antes documentado no Brasil, com um único relato do agente causando doença neurológica em bovinos descrito no Uruguai (Giannitti et al., 2019).

Outros diferenciais, como intoxicação por plantas tóxicas, micotoxinas e metais pesados, foram prontamente descartados frente aos achados anatomopatológicos aqui apresentados. Adicionalmente, embora o histórico de outras mortes noticiadas dentro do mesmo período na propriedade possa sugerir a ocorrência de doenças infecciosas ou de importância para o rebanho, não foi possível fazer qualquer associação entre as mortes devido a não realização do exame cadavérico dos outros animais.

5 CONCLUSÕES

O diagnóstico da doença de Lafora em animais deve ser procedido com cautela, amparado não somente pela observação dos clássicos corpos de poliglucosanos no sistema nervoso central, mas também pela utilização de colorações especiais histoquímicas, salientando o padrão de distribuição, seguida por análise ultraestrutural e, principalmente, pelo estudo da correlação clínica e do seu aparecimento em animais jovens como etapas para confirmação da desordem.

Estudos adicionais fazem-se necessários para o entendimento da dinâmica epidemiológica da doença em bovinos, bem como para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos associados à doença clínica nesses animais, possibilitando comparações com outros modelos animais e com a doença em humanos.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, D. M.; ACKERLEY, C. A.; MINETT, T. S. C. et al. Skin biopsy in Lafora disease: genotype–phenotype correlations and diagnostic pitfalls. *Neurology*, v. 61, p. 1611-1614, 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14663053/>> Acesso em: 18 set. 2020.
- ANDRADE, D. M.; TURNBULL, J.; MINASSIAN, B. A. Lafora disease, seizures and sugars. *Acta Myol.*, v. 26, p. 83-86, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17915579/>> Acesso em: 27 set. 2020.
- BARROS, C. S. L.; DRIEMEIER, D.; DUTRA, I. et al. *Doenças do sistema nervoso de bovinos no Brasil*. 1. ed. Montes Claros, MG: Vallé, 2006. 207p.
- BAXTER, S. I. F.; POW, I.; BRIDGEN, A. et al. PCR detection of the sheep-associated agent of malignant catarrhal fever. *Arch. Virol.* v. 132, p. 145-159, 1993. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF01309849>> Acesso em: 25 out. 2020.
- BORRÀS, D.; FERRER, I.; PUMAROLA, M. Age-related changes in the brain of the dog. *Vet. Pathol.*, v. 36, p. 202-211, 1999. Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/10.1354/vp.36-3-202>> Acesso em: 14 set. 2020.
- BOUZALAS, I. G., WÜTHRICH, D., WALLAND, J. et al. Neurotropic astrovirus in cattle with nonsuppurative encephalitis in Europe. *J. Clin. Microbiol.*, v. 52, p. 3318-3324, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4313157/>> Acesso em: 30 out. 2020.
- CANTILE, C.; YOUSSEF, S. Nervous system. In: Maxie, MG, ed. *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. 6. ed. Philadelphia, PA: Elsevier, 2015. vol. 1, ch. 4, p. 250-406.
- CAVANAGH, J. B. Corpora-amyloidea and the family of polyglucosan diseases. *Brain Res. Rev.*, v. 29, p. 265-295, 1999. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S016501739900003X?via%3Di%3Dhub>> Acesso em: 28 out. 2020.
- CHAMBERS, J. K.; THONGTHARB, A.; SHIGA, T. et al. Accumulation of Laforin and other related proteins in canine Lafora disease with EPM2B repeat expansion. *Vet. Pathol.*, v. 55, n. 4, p. 543-551, 2018. Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/0300985818758471>> Acesso em: 6 out. 2020.

CIEPLOCH, A.; RUTKOWSKA, K.; OPRZADEK, J. et al. Genetic disorders in beef cattle: a review. *Genes Genom.*, v. 39, p. 461-471, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5387086/>> Acesso em: 20 out. 2020.

CLARKE, L. L.; HAWKINS, I. K.; RISSI, D. R. J. Central nervous system diseases of cattle in Georgia, 2001–2017. *Vet. Diagn. Invest.*, v. 31, n. 4, p. 588-593, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31179896/>> Acesso em: 15 out. 2020.

CUSICK, P. K.; CAMERON, A.M.; PARKER, A.J. Canine neuronal glycoproteinosis-Lafora's disease in the dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, v. 12, p. 518-521, 1998. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1939-1676.2002.tb02356.x>> Acesso em: 13 set. 2020.

DAVIS, K. E.; FINNIE, J. W.; HOOPER, P. T. Lafora's disease in a dog. *Aust. Vet. J.*, v. 67, n. 5, p. 192-193, 1990. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1751-0813.1990.tb07754.x>> Acesso em: 6 out. 2020.

DE LA FUENTE, J.; RUIZ-FONS, F.; NARANJO, V. et al. Evidence of Anaplasma infections in European roe deer (*Capreolus capreolus*) from southern Spain. *Res. Vet. Sci.*, v. 84, p. 382-386, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17655893/>> Acesso em: 22 out. 2020.

DESDENTADO, L.; ESPERT, R.; SANS, P. et al. Lafora disease: a review of the literature. *Ver. Neurol.*, v. 68, n. 2, p. 66-74, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6531605/pdf/nihms-1019494.pdf>> Acesso em: 9 set. 2020.

DORE, V.; SMITH, G. Cerebral Disorders of calves. *Vet. Clin. Food. Anim.*, v. 33, n. 1, p. 27-41, 2016. Disponível em: <[https://www.vetfood.theclinics.com/article/S0749-0720\(16\)30069-X/abstract](https://www.vetfood.theclinics.com/article/S0749-0720(16)30069-X/abstract)> Acesso em: 15 out. 2020.

DURAN, J.; GUINOVAR, J. J. Brain glycogen in health and disease. *Mol. Aspects Med.* v. 46, p. 70-77, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0098299715000540>> Acesso em: 25 out. 2020.

FITZMAURICE, S. N.; RUSBRIDGE, C.; SHELTON, G. D. et al. Familial myoclonic epilepsy in the Miniature Wirehaired Dachshund. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 15, n. 1, p. 72-73, 2008. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1939-1676.2001.tb02304.x>> Acesso em: 6 out. 2020.

FULOP, L.; BARETT, A. D. T.; PHILLPOTTS, R. et al. Rapid identification of flaviviruses based on conserved NS5 gene sequences. *J. Virol. Methods*, v. 44, 179-188, 1993. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S016609349390053T?via%3Dihub>> Acesso em: 24 out. 2020.

GALIZA, G. J. N.; SILVA, M. L. C. R.; DANTAS, A. F. M. Doenças do sistema nervoso de bovinos no semiárido nordestino. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 30, n. 3, p.267-276, 2010. Disponível em: <<https://www.scielo.br/pdf/pvb/v30n3/14.pdf>> Acesso em: 19 out. 2020.

GARMAN, R. H. Histology of the central nervous system. *Toxicol. Pathol.*, v. 39, n. 1, p. 22-35, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21119051/>> Acesso em: 30 out. 2020.

GAVIER-WIDEN, D.; WELLS, G. A. H. SIMMONS, M. M. et al. Histological Observations on the Brains of Symptomless 7-Year-old Cattle. *J. Comp. Path.*, v. 124, p. 52-59, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021997500904286>> Acesso em: 25 out. 2020.

GHOLAP, P. N.; KALE, D. S.; SIROTHIA, A. R. Genetic diseases in cattle: a review. *Res. J. Animal, Veterinary and Fishery Sci.*, v. 2, n. 2, p. 24-33, 2014. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/310479461_Genetic_diseases_in_cattle_A_review> Acesso em: 20 out. 2020.

GIANNITTI, F.; CAFFARENA, R. D.; PASAVENTO, P. et al. The first case of bovine astrovirus-associated encephalitis in the southern hemisphere (Uruguay), uncovers evidence of viral introduction to the Americas from Europe. *Front. Microbiol.*, v. 10, n. 1240, p. 1-8, 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.01240/full>> Acesso em: 30 out. 2020.

GREDAL, H.; BERENDT, M.; LEIFSSON, P. S. Progressive myoclonus epilepsy in a beagle. *J. Small Anim. Pract.*, v. 44, n. 11, p. 511-514, 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14635965/>> Acesso em: 11 out. 2020.

HAJEK, I.; KETTNER, F.; SIMERDOVA, V. et al. NHLRC1 repeat expansion in two Beagles with Lafora disease. *J. Small. Anim. Pract.*, v. 57, n. 11, p. 650-652, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5658008/>> Acesso em: 6 out. 2020.

HALL, D. G.; STEFFENS, W. L.; LASSITER, L. Lafora bodies associated with neurologic signs in a cat. *Vet. Pathol.*, v. 35, p. 218-220, 1998. Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/030098589803500307>> Acesso em: 13 set. 2020.

HOLLAND, J. M.; DAVIS, W. C.; PRIEUR, D. J. et al. Lafora's disease in the dog. *Am. J. Pathol.*, v.58, n. 3, p. 509-529, 1970. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2032841/>> Acesso em: 6 out. 2020.

HONNOLD, S. P.; SCHULMAN, F. Y.; BAUMAN, K. et al. Lafora's-like disease in a Fennec Fox (*Vulpes zerda*). *J. Zoo. Wildlife Med.*, v. 41, n. 3, p. 530-534, 2010. Disponível em: <<https://www.jstor.org/stable/40962260>> Acesso em: 6 out. 2020.

JAYARAJ, A. P. Polysaccharide accumulation in the central nervous system of D-penicillamine-treated rats. *Acta. Neuropathol. (Berl)*, v. 51, p.237-239, 1980. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF00687391>> Acesso em: 6 out. 2020.

JIAN, Z.; ALLEY, M. R.; CAYZER, J. et al. Lafora's disease in an epileptic Basset Hound. *N. Z. Vet. J.*, v. 38, n. 2, p. 75-79, 1990. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/7712804_Lafora's_disease_in_an_epileptic_Basset_Hound> Acesso em: 6 out. 2020.

KAISER, E.; KRAUSER, K.; SCHWARTZ-PORSCHKE, D. Lafora disease (progressive myoclonic epilepsy) in the Basset hound-possibility of early diagnosis using muscle biopsy? *Tierarztl. Prax.*, v. 19, n. 3, p. 290-295, 1991. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1653470/>> Acesso em: 11 out. 2020.

KAMIYA, S.; SUZUKI, Y.; SUGIMURA, M. Polyglucosan bodies in the digestive tract of the aged dog. *Acta neuropathol.* v. 60, n. 3-4, p. 297-300, 1983. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF00691880>> Acesso em: 25 out. 2020.

KREEGER, J. M.; FRAPPIER, D. C.; KENDALL, J. D. Systemic glycoproteinosis resembling Lafora's disease in a cow. *Cornell Vet.*, v. 81, n. 2, p. 215-221, 1990. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/2027/coo.31924051143075?urlappend=%3Bseq=237>> Acesso em: 6 out. 2020.

LAFORA, G., R.; GLUECK, B. Beitrag zur Histopathologie der myoklonischen Epilepsie [German]. *Z Gesamte. Neurol. Psychiatr.*, v. 6, p. 1-14, 1911. Disponível em: <<https://www.scienceopen.com/document?vid=43713d98-f63d-420a-89b4-e333121e9a08>> Acesso em: 18 set. 2020.

LESCA, G.; BOUTRY-KRIZA, N.; TOFFOL, B. et al. Novel mutations in EPM2A and NHLRC1 widen the spectrum of Lafora disease. *Epilepsia*, v. 51, p. 1691-1698, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20738377/>> Acesso em: 18 set. 2020.

LI, L., DIAB, S., MCGRAW, S. et al. Divergent astrovirus associated with neurologic disease in cattle. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 19, p. 1385-1392, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3810933/>> Acesso em: 30 out. 2020.

LIMA, A. P.; TESSIER, D. C.; THOMAS, D. Y. et al. Identification of new cysteine protease gene isoforms in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 67, p. 333-338, 1994. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0166685194001448>> Acesso em: 22 out. 2020.

LOHI, H.; YOUNG, E. J.; FITZMAURICE, S. N. et al. Expanded repeat in canine epilepsy. *Science*, v. 307, n. 5706, p. 81, 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15637270/>> Acesso em: 11 out. 2020.

LOUPAL, G. A storage disease in a parakeet (*Nymphicus hollandicus*) morphologically similar to the myoclonic systemic disease (Lafora's disease) of man and dog. *Zbl. Vet. Med.*, v. 32, p. 502-511, 1985. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2998123/>> Acesso em: 6 out. 2020.

LUNA, L. G. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3. ed. New York: McGraw-Hill, 1968, 258p.

MANNERS, D. J. Recent developments in our understanding of glycogen structure. *Carbohydr. Polym.*, v. 16, p. 37-82, 1991. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/014486179190071J>> Acesso em: 18 set. 2020.

MÁRQUEZ, M.; PÉREZ, L.; SERAFFÍN, A. et al. Characterisation of Lafora-like bodies and other polyglucosan bodies in two aged dogs with neurological disease. *Vet. J.*, v. 183, n. 2, p. 222-225. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1090023308003596?via%3Dihub>> Acesso em: 9 set. 2020.

MESLIN, F. M.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. *Laboratory Techniques in Rabies*. 14. ed. Geneva: World Health Organization, 1996, p. 80-103.

MINASSIAN, B. Lafora's disease: towards a clinical, pathologic, and molecular synthesis. *Pediatr. Neurol.*, v. 25, p. 21-29, 2001. Disponível em: <[https://www.pedneur.com/article/S0887-8994\(00\)00276-9/fulltext](https://www.pedneur.com/article/S0887-8994(00)00276-9/fulltext)> Acesso em: 21 set. 2020.

NANDURI, A. S.; KAUSHAL, N.; CLUSMANN, H. et al. The maestro don Gonzalo Rodríguez-Lafora. *Epilepsia*, v. 49, n. 6, p. 943-947, 2008. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1528-1167.2008.01543.x>> Acesso em: 21 out. 2020.

NAVARRO, P. P.; GENOUD, C.; CASTAÑO-DÍEZ, D. et al. Cerebral Corpora amylacea are dense membranous labyrinths containing structurally preserved cell organelles. *Sci. Rep.*, v. 8, n. 18046, p. 1-13, 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-018-36223-4>> Acesso em: 27 out. 2020.

NITSCHKE, F.; AHONEN, S. J.; NITSCHKE, S. et al. Lafora disease — from pathogenesis to treatment strategies. *Nat. Rev. Neurol.*, v. 14, p. 606-617, 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41582-018-0057-0>> Acesso em: 18 set. 2020.

OMANWAR, S.; RAO, J. R.; BASAGOUDANAVAR, S. H. et al. Direct and sensitive detection of *Trypanosoma evansi* by polymerase chain reaction. *Acta Vet. Hung.*, v. 47, p. 351-359, 1999. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10497829/>> Acesso em: 22 out. 2020.

RAVINDRAN, R.; RAO, J. R.; MISHRA, A. K. et al. *Trypanosoma evansi* in camels, donkeys and dogs in India: comparison of PCR and light microscopy for detection—short communication. *Vet. Arhiv.*, v. 78, p. 89-94, 2008. Disponível em: <<http://wwwi.vef.hr/vetarhiv/papers/2008-78-1-10.pdf>> Acesso em: 22 out. 2020.

RIBAS, N. L. K. S.; CARVALHO, R. I.; SANTOS, A. C. et al. Doenças do sistema nervoso de bovinos no Mato Grosso do Sul: 1082 casos. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 33, n. 10, p. 1183-1194, 2013. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2013001000003&script=sci_abstract&tlng=pt> Acesso em: 19 out. 2020.

RISSI, D. R.; PIEREZAN, F.; SILVA, M. S. et al. Neurological disease in cattle in southern Brazil associated with Bovine herpesvirus infection. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 20, p. 346-349, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18460624/>> Acesso em: 15 out. 2020.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. p.1124-1125.

SANCHES, A. W. D.; LANGOHR, I. M.; STIGGER, A. L. et al. Doenças do sistema nervoso central em bovinos no Sul do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 20, n. 3, p. 113-118, 2000. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2000000300005> Acesso em: 30 out. 2020.

SCHOEMAN, T.; WILLIAMS, J.; VAN WILPE, E. Polyglucosan storage disease in a dog resembling Lafora's disease. *J. Vet. Intern. Med.*, v.16, p. 201-207, 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11899039/>> Acesso em: 13 set. 2020.

SELIMOVIC-HAMZA, S., BOUZALAS, I. G., VANDEVELDE, M. et al. Detection of astrovirus in historical cases of European sporadic bovine encephalitis, Switzerland 1958-1976. *Front. Vet. Sci.*, v. 3, n. 91, p. 1-13, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5058262/pdf/fvets-03-00091.pdf>> Acesso em: 30 out. 2020.

SILVA, A. S. G.; MATOS, A. C. D.; CUNHA, M. A. C. R. et al. West Nile virus associated with equid encephalitis in Brazil, 2018. *Transbound. Emerg. Dis.*, v. 66, p. 445-453, 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/tbed.13043>> Acesso em: 23 out. 2020.

SILVEIRA, J. A. G.; RABELO, E. M. L.; RIBEIRO, M. F. B. Detection of *Theileria* and *Babesia* in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) and marsh deer (*Blastocerus*

dichotomus) in the State of Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol.*, v. 177, p. 61-66, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21354704/>> Acesso em: 22 out. 2020.

SIMMONS, M. M. Lafora disease in the cow? *J. Comp. Path.*, v. 110, p. 389-401, 1994. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8056873/>> Acesso em: 13 set. 2020.

STRIANO P, ZARA F, TURNBULL J, et al. Typical progression of myoclonic epilepsy of the Lafora type: a case report. *Nat. Clin. Pract. Neurol.*, v. 4, p. 106-111, 2008. SULLIVAN, M.; NITSCHKE, S.; STEUP, M. et al. F. Pathogenesis of Lafora disease: transition of soluble glycogen to insoluble polyglucosan. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 18, p. 1743, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5578133/pdf/ijms-18-01743.pdf>> Acesso em: 18 set. 2020.

SUZUKI, Y.; AKIYAMA, K.; SUU, S. Lafora-like inclusion bodies in the CNS of aged dogs. *Acta neuropathol.* v. 44, n. 3, p. 217-222, 1978. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/216221/>> Acesso em: 25 out. 2020.

SUZUKI, Y.; OHTA, K.; KAMIYA, S. et al. Topographic distribution pattern of Lafora-like bodies in the spinal cord of some animals. *Acta neuropathol.* v. 49, n. 2, p. 159-161, 1980. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF00690756>> Acesso em: 25 out. 2020.

SWAIN, L.; KEY, G.; TAURO, A. et al. Lafora disease in miniature Wirehaired Dachshunds. *Plos one.*, v. 12, n. 8, p. 1-13, 2017.

TERRA, J. P.; BLUME, G. R.; RABELO, R. E. et al. Neurological diseases of cattle in the state of Goiás, Brazil (2010-2017). *Pesq. Vet. Bras.*, v. 38, n. 9, p. 1752-1760, 2018. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2018000901752> Acesso em: 30 out. 2020.

TURNBULL, J.; TIBERIA, E.; STRIANO, P.; et al. Lafora disease. *Epileptic. Disord.*, v. 18, p. S38-S62, 2016. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1684/epd.2016.0842>> Acesso em: 14 set. 2020.

VALLI, V. E. O.; KIUPEL, M.; BIENZLE, D. Hematopoietic system. In: Maxie, MG, ed. *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. 6. ed. Philadelphia, PA: Elsevier, 2015. vol. 3, ch. 2, p. 102-268.

VAN ENGELBURG, F. A. C.; MAES, R. K.; VAN OIRSCHOT, J. T. et al. Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. *J. Clin. Microbiol.*, v. 31, p. 3129- 3135, 1993. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC266363/>> Acesso em: 30 out. 2020.

VANDEVELDE, M.; HIGGINS, R. J.; OEVERMANN, A. *Degenerative disorders*. In: Veterinary neuropathology: essentials of theory and practice. Wiley-Blackwell, 2012. 210p.

WOHLSEIN, P.; DESCHL, U.; BAUMGARTNER, W. Nonlesions, unusual cell types, and postmortem artifacts in the central nervous system of domestic animals. *Vet. Pathol.* v. 50, n. 1, p. 122-143, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22692622/>> Acesso em: 28 out. 2020.

YANAI, T.; MASEGI, T.; IWANAKA, M. et al. Polyglucosan bodies in the brain of a cow. *Acta. Neuropathol.*, v. 88, p. 75-77, 1994. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF00294362>> Acesso em: 6 out. 2020.

YAMANAMI, S.; ISHIHARA, T.; TAKAHASHI, M. et al. Comparative study of intraneuronal polyglucosan bodies in brains from patients with Lafora disease and aged dogs. *Acta. Pathol. Jpn.* v. 42, n. 11, p. 787-792, 1992. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1440-1827.1992.tb01879.x>> Acesso em: 25 out. 2020.

ZAHLER M, RINDER H, SCHEIN E. et al. Detection of a new pathogenic Babesia microti-like species in dogs. *Vet. Parasitol.*, v. 89, p. 241-248, 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10760414/>> Acesso em: 22 out. 2020.