

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

DETECÇÃO DE HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 (BoHV-1) E TIPO 5 (BoHV-5) EM AMOSTRAS DE SÊMEN & CONSTRUÇÃO DE UM BoHV-5 COM UMA DELEÇÃO DO GENE UL49.5

MARTHA TRINDADE OLIVEIRA
Bacharel em Biomedicina

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Fevereiro, 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

DETECÇÃO DE HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 (BoHV-1) E TIPO 5 (BoHV-5) EM AMOSTRAS DE SÊMEN & CONSTRUÇÃO DE UM BoHV-5 COM UMA DELEÇÃO DO GENE UL49.5

MARTHA TRINDADE OLIVEIRA
Bacharel em Biomedicina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente como um dos requisitos para a obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia do Ambiente.

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Fevereiro, 2011

Catálogo na Publicação
UFRGS/ICBS/Biblioteca Setorial

O48d Oliveira, Martha Trindade

Detecção de herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e tipo 5 (BoHV-5) em amostras de sêmen e construção de um BoVH-5 com uma deleção do gene UL49.5¹ / Martha Trindade Oliveira. – 2011.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, BR-RS, 2011.

Orientação : Prof. Ana Cláudia Franco

1. Herpesvírus bovino 1 2. Herpesvírus bovino 5 3. Sêmen 4. Reação em cadeia da polimerase I. Franco, Ana Cláudia, orient. II. Título.

MARTHA TRINDADE OLIVEIRA
BIOMÉDICA
UFRGS

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
Para obtenção do Grau de

MESTRE EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

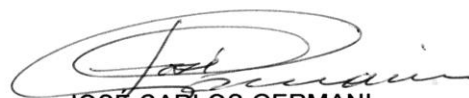
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre (RS), Brasil

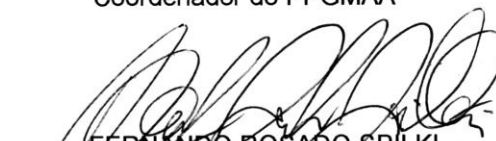
Aprovada em: 22/02 / 2011
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 01/04 / 2011
Por:


ANA CLÁUDIA FRANCO
Orientadora ICBS-UFRGS


JOSE CARLOS GERMANI
Coordenador do PPGMAA


ANA PAULA GUEDES FRAZZON
ICBS/UFRGS


FERNANDO ROSADO SPILKI
FEEVALE


LAURA ALMEIDA
FAVET/UFRGS

MARIA CRISTINA FACCIONI HEUSER
Diretora do ICBS - UFRGS

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que ele tem me dado e me permitido alcançar; pelo amor e pela fidelidade.

À minha família, por todo o apoio e paciência, especialmente ao meu pai e à minha mãe, por sempre me incentivarem a estudar e a prosseguir (mesmo não fazendo muita idéia do que eu faço...).

À professora Ana Cláudia, por ser uma orientadora na excelência da palavra e por ser a pessoa maravilhosa que é.

Ao Frans, por todos os ensinamentos, direcionamentos e ajudas, por sempre querer nos ajudar a crescer e pelas palavras positivas independentes dos bem ou mal sucedidos resultados.

Ao professor Paulo Roehe, “pai de todos nós da virologia”, pela oportunidade de fazer parte deste grupo de pesquisa e por sempre nos estimular e ajudar a desenvolver bons trabalhos.

Aos colegas de laboratório, não só pela ajuda, mas por fazer parecer que isso que fazemos não é trabalho, mas uma instrutiva diversão. Agradeço em especial ao apoio do Fabrício, da Thalita, do Esmale, da Hiran, da Ju, do Samuca e do Helton.

Às meninas do 209 (especialmente Tiane, Mica, Elis, Fran, Ana) pelo empréstimo do laboratório e pela amizade.

A todos os professores que me deram aula com paixão, fazendo nascer em mim esse mesmo sentimento pela ciência e pela academia;

À Instituição, pelo ensino gratuito e de qualidade que oferece;

Por fim, a toda e qualquer pessoa que, de alguma maneira, contribuiu para o resultado desse trabalho ou de minha jornada acadêmica, o meu muito obrigada.

DETECÇÃO DE HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 (BoHV-1) E TIPO 5 (BoHV-5) EM AMOSTRAS DE SÊMEN & CONSTRUÇÃO DE UM BoHV-5 COM UMA DELEÇÃO DO GENE UL49.5¹

Autora: Martha Trindade Oliveira
Orientadora: Ana Cláudia Franco

RESUMO

Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) são importantes patógenos que podem afetar os tratos respiratório e genital e o sistema nervoso central de bovinos. Visando iniciar um estudo sobre a distribuição destes vírus em sêmen de bovinos no Brasil, foi realizada a detecção de BoHV-1 e 5 em amostras de sêmen através de duas reações em cadeia da polimerase do tipo *nested* (nPCRs) espécie-específicas. Foram testadas 53 amostras de sêmen fresco e 23 amostras de sêmen em palheta coletados de touros de dois estados brasileiros. DNA de BoHV-5 foi detectado em todas as amostras e 34 dessas também foram positivas para BoHV-1. Em cinco amostras de sêmen fresco e em 13 amostras de sêmen em palheta foi possível isolar BoHV-1 e/ou BoHV-5 infeccioso. Demonstramos, assim, que ambos os tipos virais foram detectados em amostras de sêmen de bovinos brasileiros, destacando a importância de se monitorar a presença desses agentes em sêmen de touros, para reduzir o risco de transmissão dessas viroses.

Além disso, com o objetivo de contribuir com o controle destas infecções no território brasileiro, nesse estudo também se propôs a construção de um vírus recombinante com deleção do gene UL49.5, que codifica uma proteína de evasão imune, a partir de uma amostra de BoHV-5 gE⁻, gI⁻ e US9⁻. Para isso, foi construído um cassete de deleção contendo o gene UL49.5 mutado que foi co-transfectado com DNA viral em células eucarióticas de bovinos. Até o momento não foi possível isolar vírus recombinantes, entretanto, vários parâmetros de transfecção foram aqui otimizados, o que facilitará a futura obtenção deste recombinante.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Microbiologia do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (118 p.) Fevereiro, 2011.

DETECTION OF BOVINE HERPESVIRUS 1 AND 5 IN SEMEN FROM BRAZILIAN BULLS & CONTRUCTION OF A UL49.5 GENE DELETED BoHV-5 SAMPLE²

Author: Martha Trindade Oliveira
Supervisor: Ana Cláudia Franco

ABSTRACT

Bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) are important pathogens of the respiratory and genital tract of cattle and may also affect the central nervous system. Aiming begin the study of the distribution of these viruses in semen of Brazilian bulls, it was performed here the detection of BoHV-1 and 5 in semen samples by two species-specific nested polymerase chain reactions (nPCRs). Fifty three fresh semen samples and 23 frozen semen samples from two Brazilian states were tested. DNA of BoHV-5 was detected in all samples and 34 of these were positive for BoHV-1 as well. In addition, in 5 fresh semen samples and 13 frozen semen samples infectious BoHV-1 and /or BoHV-5 was isolated. Thus, we demonstrated that both viruses are detected in Brazilian semen samples, highlighting the importance of search for these agents in bull semen to reduce the risk of transmitting these viruses.

Moreover, in order to contribute with control of these infections in Brazilian territory, this study also aims to make a recombinant virus with a deletion in the UL49.5 gene, which codes for an immune evasion protein, in a BoHV-5 gE⁻, gI⁻ and US9⁻ sample. To achieve this, a deletion cassette with a mutated UL49.5 gene was built and co-transfected with viral DNA in eukaryotic bovine cells. Hitherto no recombinant virus was isolated; however, many transfection parameters were optimized, favoring the achievement of the recombinant.

²Master of Science dissertation in Environment Microbiology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (118 p.) February, 2011.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xii
1. Introdução	1
1.1 Objetivos Gerais:	4
1.1.1 Objetivos Específicos:	4
2. Revisão Bibliográfica.....	5
2.1 Ordem Herpesvirales	5
2.2 Morfologia dos herpesvírus.....	5
2.3 Genoma dos herpesvírus.....	8
2.3.1 Classificação & funções gênicas	11
2.3.2 Regulação da expressão gênica	13
2.4 Família Herpesviridae	14
2.4.1 Subfamília Alphaherpesvirinae	15
2.4.1.1 Replicação Viral	16
2.4.1.1.1 Adsorção e penetração	16
2.4.1.1.2 Expressão gênica e replicação do genoma	16
2.4.1.1.3 Morfogênese e liberação.....	18
2.4.1.2 Herpesvírus bovinos.....	20
2.4.1.2.1 Herpesvírus Bovino tipo 1 (BoHV-1)	21
2.4.1.2.2 Herpesvírus Bovino tipo 5 (BoHV-5)	22
2.4.1.2.3 Patogenia e Sinais Clínicos.....	23
a) Rinotraquite Infecciosa Bovina (IBR)	25
b) Infecções do Trato Genital e problemas reprodutivos	26
c) Encefalites.....	28
2.4.1.2.4 Importância Econômica da Infecção	30
2.5 Diagnóstico viral.....	31
2.5.1 Análise laboratorial	31
2.5.1.1 Isolamento Viral.....	32
2.5.1.2 Testes Sorológicos.....	33

2.5.1.3 Testes Moleculares	33
2.6 Controle	35
2.6.1 Vacinas contra BoHV-5	38
2.7 Evasão do sistema imunológico por herpesvírus.....	39
2.7.1 Apresentação de antígenos pelo MHC de classe I.....	41
2.7.2 Evasão da apresentação de antígenos por herpesvírus.....	44
2.7.2.1 Inibidores da TAP	46
2.7.2.1.1 Proteína UL49.5	47
a) UL49.5 de BoHV-1	48
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
3.1 Detecção de BoHV-1 e 5 em amostras de sêmen.....	51
3.1.1 Amostras de sêmen.....	51
3.1.2 Extração de DNA.....	51
3.1.3 Reações em cadeia da polimerase nested (nPCRs)	52
3.1.4 Cultivo celular	54
3.1.5 Isolamento viral	54
3.1.6 Purificação de DNA viral e análise de restrição enzimática.....	55
3.2 Mutação do gene UL49.5 em uma amostra recombinante de BoHV-5... 56	
3.2.1 Vírus e células	56
3.2.2 Vetores plasmideais	57
3.2.3 Extração de DNA viral	58
3.2.4 Construção do cassete de deleção	58
3.2.4.1 Clonagem do fragmento <i>Mlu</i> I contendo a região da UL49.5....	59
3.2.4.2 PCR de fusão	61
3.2.4.3 Inserção da mutação.....	63
3.2.4.4 Inserção do cassete de expressão da eGFP.....	64
3.2.5 Transfecções	65
3.2.5.1 Transfecção por fosfato de cálcio.....	66
3.2.5.2 Transfecção através do Kit Xfect®	68
3.2.6 Isolamento dos vírus recombinantes	69
3.2.7 Análise <i>in silico</i> da UL49.5.....	70
4. RESULTADOS.....	71

4.1 Detecção de BoHV-1 e 5 em amostras de sêmen.....	71
4.1.1 Detecção de DNA de BoHV-1 e de BoHV-5 em amostras de sêmen.....	71
4.1.2 Isolamento viral e análise por restrição enzimática	73
4.2 Mutação do gene UL49.5 em uma Amostra Recombinante de BoHV-5.	74
4.2.1 Construção do Cassete de Deleção	74
4.2.2 Transfecções	75
4.2.3 Isolamento dos Vírus Recombinantes	78
4.2.4 Análise <i>in silico</i> da UL49.5.....	78
5. DISCUSSÃO	80
5.1 Detecção de BoHV-1 e 5 em amostras de sêmen.....	80
5.2 Mutação do gene UL49.5 em uma amostra recombinante de BoHV-5... ..	84
6. CONCLUSÕES	87
7. REFERÊNCIAS.....	88
8. APÊNDICE	110
9. VITA	118

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 4.1 Detecção de DNA e isolamento viral em amostras de sêmen touros brasileiros.....	72

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 2.1 Morfologia dos herpesvírus.....	6
Figura 2.2 Diagrama esquemático da organização genômica dos herpesvírus, exemplificando os seis grupos existentes...	11
Figura 2.3 A montagem e o egresso de um herpesvírus respresentados esquematicamente.....	19
Figura 2.4 Principais sítio de latência em BoHV-1 e 5 em bovinos..	24
Figura 2.5 Via de apresentação de antígenos mediada por MHC I..	43
Figura 2.6 Interferência de herpesvírus na via de apresentação de antígenos mediada por MHC I.....	45
Figura 3.1 Representação das reações de amplificação da nPCR para detecção de DNA de BoHV-1 e 5.....	53
Figura 3.2 Construção do Cassete de Deleção 1.....	60
Figura 3.3 Representação das alterações produzidas com o oligonucleotídeo MUT na PCR de fusão.....	61
Figura 3.4 Construção do Cassete de Deleção2.....	64
Figura 4.1 Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR.....	72
Figura 4.2 Análise por restrição enzimática (REA) do DNA genômico de BoHV-1 ou 5 isolado de 7 amostras de sêmen bovino.....	74
Figura 4.3 Construção do cassete de deleção.....	76
Figura 4.4 Comparação <i>in silico</i> das proteínas UL49.5 de BoHV-1, de BoHV-5 e da UL49.5 mutada produzida por PCR de fusão.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%: porcentagem
µg: micrograma
µL: microlitro
3': região terminal do DNA que contém um grupo hidroxila livre
5': região terminal do DNA que contém um grupo fosfato livre
ABC: família de transportadores *ATP-binding cassette*
AIHV-1: *Alcelaphine herpesvirus 1* (antigo BoHV-3)
ATCC: *American Type Cells Collection*
ATP: trifosfato de adenosina
ATPase: ATP hidrolase
bICP0: *bovine infected cell protein 0* (proteína bovina de infecção celular 0)
Bluo-gal: 5-Bromo-3-Indolil-β-D-Galactopiranosídeo
BoHV: *Bovine herpesvirus* ou Herpesvírus bovino
BoHV-1: Herpesvírus bovino tipo 1
BoHV-2: Herpesvírus bovino tipo 2
BoHV-4: Herpesvírus bovino tipo 4
BoHV-5: Herpesvírus bovino tipo 5
BoHV-6: Herpesvírus bovino tipo 6 ou Herpesvírus bovino linfotrópico (BLHV)
bp: “base par” ou pares de base (pb)
BPIV-3: *Bovine parainfluenza virus 3*
BVDV: *Bovine viral diarrhea virus 1*
CaHV: *Canid herpesvirus*
CD8+: *cluster of differentiation 8*
CeHV-1: *Cercopithecine herpesvirus 1*
CeHV-9: *Cercopithecine herpesvirus 9*
CI: controle interno ou IC (*internal control*)
CIA: centro de inseminação artificial
CIAP: *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*
cm: centímetros
CpHV-1: *Caprine herpesvirus 1*
CRB: Complexo Respiratório de Bovinos
CRIB: células de rim de bovino Mardin Darby resistentes ao BVDV
C-terminal: extremidade carboxi-terminal de uma cadeia polipeptídica
CyHV-3: *Cyprinid herpesvirus 3*
DIVA: *Differentiating Infected from Vaccinated Animals*
DMSO: dimetilsulfóxido
DNA: ácido desoxirribonucléico
EBK: célula de cultivo primário de rim de embrião bovino
EBL: célula de cultivo primário de pulmão de embrião bovino

EBT: célula de cultivo primário de testículo de embrião bovino
EBTr: célula de cultivo primário de tráfego de embrião bovino
EBV: vírus Epstein Barr Humano ou *Human herpesvirus 4* (HHV-4)
ECP: efeito citopático
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
eGFP: *Enhanced Green Fluorescent Protein* (proteína verde fluorescente)
EHV: *Equid herpesvirus*
ELISA: *enzyme linked immunosorbent assay*
EMEM: meio mínimo essencial de Eagle
ERp57: proteína isomerase dissulfeto, membro 3, família A (*protein disulfide isomerase family A, member 3*)
EVI: equipe de virologia
g: força gravitacional
GaHV: *Gallid herpesvirus*
GC: guanina + citosina
GenBank: banco de dados do NCBI (“National Center for Biotechnology Information”)
GO: Estado de Goiás (Brasil)
GoHV-1: *Gorilline herpesvirus 1*
gX: glicoproteína X deletada
gX: glicoproteína X, por exemplo, gE: glicoproteína E
h: hora
HC: cadeia pesada da molécula de MHC
HCMV: citomegalovírus humano ou *Human herpesvirus 5* (HHV-5)
HHV-1: *Herpesvirus humano tipo 1* ou Herpes simplex virus 1 (HSV-1)
HHV-2: *Herpesvirus humano tipo 2* ou Herpes simplex virus 2 (HSV-2)
HSV: *host shutoff protein* (proteína de desligamento da síntese proteica do hospedeiro)
IBR: Rinotraqueíte infecciosa bovina
IcHV-1: *Ictalurid herpesvirus 1*
ICP0: gene da proteína de infecção celular 0
ICP0: *infected cellular protein 0* (proteína de infecção celular 0)
ICTV: International Committee of Taxonomy of Viruses
ICTVdb: banco de dados do “International Committee of Taxonomy of Viruses”
IF: imunofluorescência
INF- γ : interferon γ
IPB: balanopostite pustular infecciosa
IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo
IPV: vulvovaginite pustular infecciosa
IPX: imunoperoxidase
IR: repetição interna
Kb: kilobases

KSHV: Herpesvírus humano associado com sarcoma de Kaposi ou *Human herpesvirus 8* (HHV8)
LacZ α : gene da β -galactosidase que codifica o peptídeo α da enzima
LAT: genes de herpesvírus associados à latência
LAT: transcritos de herpesvírus relacionados à latência
LB: meio Luria Bertani
LIR-1: *leukocyte inhibitory receptor* (receptor inibidor de leucócitos) ou *leukocyte immunoglobulin-like receptor* (ILT)
LT: linfócitos T
LTC: linfócito T citotóxico ou Linfócitos T CD8+
LTR: repetição terminal direita
LTR: repetição terminal esquerda
M: marcador
M: molar
MchV: *Macacine herpesvirus*
MCMV: citomegalovírus de murino ou *Murid herpesvirus 1* (MuHV-1)
MDBK: células renais de bovino Madin-Darby (ATCC CCL-22)
MHC I: complexo principal de histocompatibilidade de classe I
MICB: *MHC class I polypeptide-related sequence B*
min.: minutos
miRNA: micro RNA
mL: mililitros
mM: milimolar
MOI: *multiplicity of infection* (multiplicidade de infecção)
mRNA: RNA mensageiro
MuHV: *Murid herpesvirus*
Mut F: oligonucleotídeo mutado *forward*
Mut R: oligonucleotídeo mutado *reverse*
n: número amostral
ng: nanogramas
NK: célula *natural killer*
nm: nanômetro
nPCR: nested reação em cadeia da polimerase
N-terminal: extremidade amino-terminal de uma cadeia polipeptídica
°C : graus Celsius
OIE: organização mundial de sanidade animal
ORF: fase aberta de leitura
OsHV-1: *Ostreid herpesvirus 1*
p.: página
pb: pares de bases
PBS: *phosphate buffered saline* (tampão salina fosfato)
PCR: *polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

PCR-RFLP: *restriction fragment length polymorphism*
PF: oligonucleotídeo *forward*
pH: potencial de hidrogênio iônico
PLC: complexo de carregamento de peptídeos
pMol: picomol
PnHV-1: *Panine herpesvirus 1*
PnHV-2: *Panine herpesvirus 2*
PR: oligonucleotídeo *reverse*
PRRs: receptores de reconhecimento de padrões
q.s.p.: quantidade suficiente para
RE: retículo endoplasmático
REA: análise com enzima de restrição
Rn: repetições internas do grupo genômico C dos herpesvírus
RNA: ácido ribonucleico
RNase: ribonuclease
RS: Estado do Rio Grande do Sul (Brasil)
SaHV-1: *Saimiriine herpesvirus 1*
SDS: dodecil sulfato de sódio
SFB: soro fetal bovino
SN: soroneutralização
SNC: sistema nervoso central
SuHV-1: *Herpesvírus suíno tipo 1*
TAP: proteína transportadora associada com a apresentação de antígenos
TATA Box: sequência regulatória de regiões promotoras de um gene
TCR: receptor de linfócito T
TE: tampão Tris-EDTA
TEN: tampão Tris-EDTA-NaCl
TR: repetição terminal
TRIS: 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
U: unidade Weiss
UI ou UL: componente único longo
ULnn: gene de um herpesvírus localizado no componente único longo
UniProt: Universal Protein Resource, um banco de sequência e anotações de proteínas
Us: componente único curto
USnn: gene de herpesvírus localizado no componente único curto
v.: volume
V: voltagem
VERO: célula de linhagem de rim de macaco verde (ATCC CCL-81)
VHS: “*virion host shutoff*”
VP: “*virion protein*”
VZV: vírus Varicella-Zoster humano ou *Human herpesvirus 3* (HHV-3)

α -TIF: "*trans-inducing factor*"
 β 2m: β 2-microglobulina

1. Introdução

Os herpesvírus bovinos (BoHV) são patógenos de importância veterinária, sendo responsáveis por grandes prejuízos econômicos na bovinocultura (Turin et al., 1999; Weiblen et al., 1992; Silva et al., 2000). O herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) está mais associado com doenças nos tratos genital e respiratório em bovinos, enquanto que o herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) é o principal causador de meningoencefalites nesses animais, embora também possa infectar o trato genital. Ambos os vírus ainda estão relacionados com falhas reprodutivas, como retorno ao estro e abortos, manifestações que são responsáveis pelas perdas mais significativas associadas aos herpesvírus (Engels & Ackermann, 1996; Dejuçq & Jegou, 2001; Thiry et al., 2006).

Os vírus BoHV-1 e 5 apresentam uma alta reatividade cruzada em métodos sorológicos padrões, devido à sua estreita relação antigênica, consequência do alto grau de similaridade molecular entre os dois. Sendo assim, a prevalência tipo-específica ainda não foi determinada (Teixeira et al., 1998; Esteves, 2001). Como outros alfa herpesvírus, esses vírus podem causar infecções latentes nos gânglios trigêmeos e paravertebrais, de onde eles podem eventualmente ser reativados, voltando a causar uma infecção

produtiva (Davies & Duncan, 1974; Ackerman & Wyler, 1984). Durante episódios de reativação viral de gânglios paravertebrais, a excreção de vírus infeccioso pode levar à contaminação do sêmen, o que contribui para a disseminação viral através da monta natural e/ou inseminação artificial e, potencialmente, leva a falhas reprodutivas e consequentes prejuízos econômicos (Roizman & Sear, 1987; van Engelenburg et al., 1993; Engels & Ackermann, 1996).

Em virtude dos significantes danos que estes agentes causam na indústria de bovinos, muitos países vêm estabelecendo campanhas de controle e erradicação da doença (Alegre et al., 2001). Em países com criações grandes e com alta prevalência de animais soropositivos, como ocorre no caso do Brasil, a erradicação em nível nacional torna-se inviável e muito cara (Cerqueira et al., 2000; Médici et al., 2000; Vieira et al., 2003; Barbosa et al., 2005; Quincozes, 2005; Holz et al., 2009; Campos et al., 2009). Por isso, a alternativa que vem sendo tomada nesses casos, como forma de controle da disseminação da doença, é a vacinação (Castrucci et al., 2002; Jones & Chowdhury, 2008). Entretanto, a maioria das vacinas disponíveis no mercado são contra BoHV-1 e não há consenso na literatura a respeito da proteção cruzada que essas vacinas confeririam contra BoHV-5 (Del Médico Zajac et al., 2006; Silva et al., 2006; Spilki et al., 2004). Dessa forma, faz-se necessário o desenvolvimento de vacinas que protejam contra infecções por BoHV-5, que possam produzir uma resposta imunológica significativa e que, preferencialmente, sejam passíveis de diferenciação da resposta produzida pelo vírus selvagem.

Como forma de adaptação ao seu hospedeiro, muitos vírus desenvolveram diversas estratégias para escapar da resposta imune específica – nesse caso, evasão da resposta citotóxica por linfócitos T CD8+. Um desses mecanismos afeta a apresentação de antígenos no contexto do Complexo Maior de Histocompatibilidade de Classe I (MHC I), através do bloqueio da translocação e do carregamento de antígenos pela proteína Transportadora Associada ao Processamento de Antígeno (TAP) (Nataraj et al., 1997; Koppers-Lalic et al., 2001; Ambagala et al., 2003). Com base em estudos recentes, acredita-se que a UL49.5 seja a proteína responsável pelo bloqueio da TAP em células infectadas pelo BoHV-1, diminuindo drasticamente a expressão de MHC I na superfície celular durante momentos da replicação viral (Koppers-Lalic et al., 2008). Assim, a expressão da UL49.5 apresenta um importante papel na adaptação à resposta imunológica dos hospedeiros e, portanto, é um alvo potencial de manipulação no desenvolvimento de vacinas atenuadas.

Dessa forma, dada a importância econômica dos herpesvírus bovinos em nosso meio, é preciso que haja um controle em relação à presença desse vírus em material biológico utilizado em práticas reprodutivas na bovinocultura, bem como também se faz imperativo um controle da meningoencefalite herpética através do desenvolvimento de vacinas específicas. Os métodos de detecção molecular, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), representam uma alternativa interessante para a detecção desses agentes, uma vez que eles permitem não apenas diferenciação, mas também são capazes de diagnosticar a presença de vírus mesmo quando há um baixo número de cópias dos mesmos. Como forma de controle, ainda se

faz necessário o desenvolvimento de uma vacina contra BoHV-5. Uma vacina diferencial com uma deleção do gene UL49.5 poderia produzir uma resposta imunológica de maior magnitude no hospedeiro, aumentando as chances de sucesso na formação de uma proteção específica contra o vírus.

1.1 Objetivos Gerais:

Demonstrar a presença de BoHV-1 e 5 em amostras de sêmen;

Construir um vírus recombinante, a partir de uma amostra de BoHV-5 gE⁻, gI⁻ e US9⁻, que possua uma deleção do gene UL49.5.

1.1.1 Objetivos Específicos:

Padronizar um método de extração de DNA em amostras de sêmen fresco e de palheta;

Detectar BoHV-1 e 5 em amostras de sêmen através do isolamento viral;

Detectar BoHV-1 e 5 em amostras de sêmen através da aplicação de uma reação em cadeia da polimerase tipo *nested* (nPCR);

Construir um cassete de deleção do gene UL49.5;

Otimizar a técnica de transfecção, determinando o método mais eficiente e células mais susceptíveis à técnica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ordem Herpesvirales

Os herpesvírus estão entre os maiores e mais complexos vírus existentes na natureza (Davison, 2002). O número de herpesvírus descritos é crescente: atualmente são conhecidos herpesvírus para a maioria das espécies de animais vertebrados, e até mesmo já há descrito um herpesvírus que infecta hospedeiros invertebrados (Davison et al. 2005; McGeoch et al., 2006). Assim, com o objetivo de abrigar adequadamente o vasto número de herpesvírus conhecidos, foi criada em 2009 a ordem *Herpesvirales*. Essa ordem é composta por três famílias (*Alloherpesviridae* – que compreende vírus de peixes e anfíbios -, *Herpesviridae* – que permaneceu com os vírus de mamíferos, aves e répteis - e *Malacoherpesviridae* – até o momento com um único constituinte, um vírus de moluscos bivalves), 3 subfamílias (todas pertencentes à Família *Herpesviridae*), 17 gêneros, 30 espécies de vírus e outros 48 possíveis espécies virais ainda não classificadas (Davison et al., 2009; Davison, 2010).

2.2 Morfologia dos herpesvírus

Os herpesvírus são um grupo de grandes vírus de DNA, que possuem vírions com uma arquitetura muito particular. Dessa forma, historicamente, entre os anos 60 e 80, a designação de um herpesvírus era

feita primeiramente com base na morfologia da partícula viral (McGeoch et al., 2006). Embora esse fator tenha sido atualmente suplantado pelas sequências protéicas e nucleotídicas (Davison, 2002), ele ainda é um fator determinante para a classificação dos herpesvírus. Tipicamente, um vírion é formado por quatro partes: o envelope viral, o tegumento, o capsídeo e o “core”. A Figura 2.1 mostra um esquema com os principais componentes e uma eletromicrofotografia de um herpesvírus.

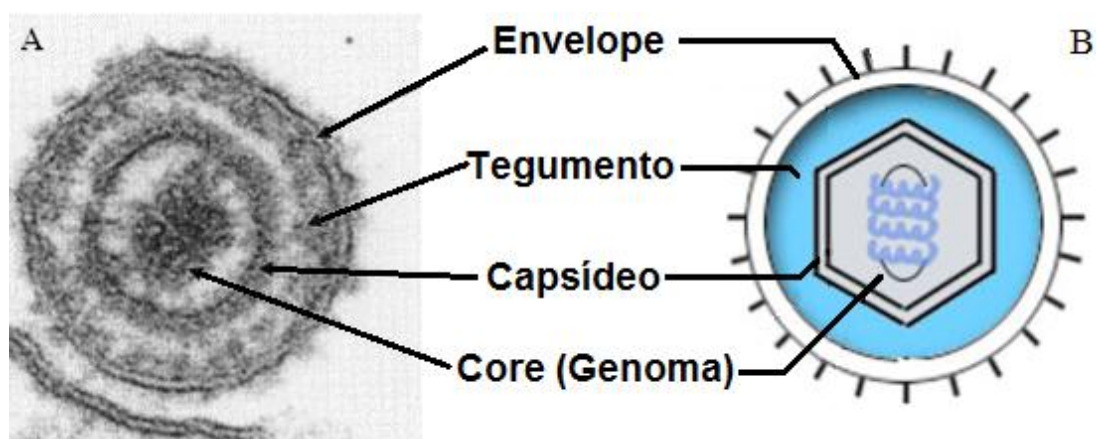


Figura 2.1. Morfologia dos herpesvírus. Em A, uma microeletrofotografia e, em B, um desenho esquemático das principais estruturas (indicadas pelas setas) dos herpesvírus (adaptado de Mettenleiter et al., 2003 e c.f. Northwestern).

O envelope viral é uma camada lipídica derivada de membranas celulares, com aparência trilaminar, que recobre a partícula viral, encontrando-se frouxamente ligada ao capsídeo (c.f. ICTVdB^a). O tamanho dos herpesvírus – estimado por coloração negativa em microscopia eletrônica – varia entre 120 e 300 nm de diâmetro. Uma possível explicação para essa variabilidade é a espessura do tegumento. Quando o envelope viral está íntegro, os herpesvírus apresentam um formato quase esférico; quando o envelope está rompido, os

herpesvírus adquirem uma forma semelhante a de um ovo frito (Roizman et al., 1992). Atravessam o envelope e ficam expostas na superfície do vírion muitas glicoproteínas. Algumas dessas são importantes alvos da resposta imunológica do hospedeiro (Roizman & Pellett, 2001). Outras dessas glicoproteínas desempenham um papel importante em vários processos da infecção viral, como a UL49.5 (ou glicoproteína N), que está envolvida com a maturação da partícula viral (em conjunto com a glicoproteína M) e , em alguns herpesvírus, com a evasão da resposta imunológica do hospedeiro (Jöns et al., 1996; Lipińska et al., 2006).

O capsídeo é uma estrutura protéica de simetria icosaédrica com diâmetro entre 100 a 110 nm. Essa estrutura é formada por várias subunidades, chamadas de capsômeros (c.f. ICTVdB^a). O capsídeo é formado no total por 162 dessas subunidades, sendo 12 capsômeros pentaméricos, localizados nos 12 vértices dos triângulos, e 150 capsômeros hexaméricos, que compõe as faces do icosaedro (Franco & Roehle, 2007). O capsídeo é composto por apenas cinco proteínas altamente conservadas (pUL19, pUL18, pUL38, pUL35 e pUL6), cada uma com uma função específica. Como muitas das proteínas estruturais, as proteínas do capsídeo parecem não estar associadas à membrana, presume-se que esses componentes estruturais residam voltados para o tegumento (Mettenleiter et al., 2006). É no capsídeo em que as glicoproteínas do envelope estão ancoradas. Já foram descritas pelo menos dez glicoproteínas virais, estando a maioria envolvida no processo de entrada ou dispersão viral (Roizman & Pellet, 2001).

Preenchendo o espaço entre o envelope e o capsídeo, há o tegumento. Trata-se de um material globular, cuja quantidade presente pode variar, possibilitando a variação na morfologia encontrada nos herpesvírus (c.f. ICTVdB^a). Ele é composto por proteínas, algumas com funções muito importantes na replicação viral, como a ativação da transcrição dos genes alvos (proteína VP16 ou α TIF) e na supressão da síntese protéica celular (VHS). Entretanto, na ausência de um subconjunto de proteínas virais do tegumento, a incorporação de proteínas celulares, como a actina, é reforçada. Dados indicam que deleções de proteínas específicas do tegumento influenciam na incorporação de proteínas do hospedeiro no vírion. Assim, além da sua importância estrutural, ligando o envelope e o capsídeo, o tegumento poderia funcionar como um compartimento de partículas, permitindo o transporte das mesmas (Mettenleiter et al., 2006).

Por fim, há o “core” – também chamado de núcleo –, dentro do qual está localizado o genoma viral. Nessa estrutura há ainda algumas proteínas codificadas pelo próprio vírus dentro desse núcleo (c.f. ICTVdB^a).

2.3 Genoma dos herpesvírus

Atualmente há 122 sequências completas (ou quase completas) de genomas de herpesvírus disponíveis, oriundas de 51 espécies de herpesvírus, para as quais pelo menos um vírus foi sequenciado, conforme a base de dados NCBI. Há também sequências parciais de praticamente todos os outros herpesvírus com classificação taxonômica formal – uma vez que, de fato, esse é um pré-requisito para a classificação viral (Davison, 2010). O genoma dos

herpesvírus consiste de uma fita dupla linear de DNA, que pode diferir em tamanho de acordo com a Família. Na Família *Herpesviridae* o tamanho do genoma varia entre 124 Kb (*Cercopithecine herpesvirus 9*, CeHV9, um varicelovírus de símio) e 241 Kb (*Panine herpesvirus 2*, PnHV2, um citomegalovírus de chimpanzé). Da mesma forma, a composição nucleotídica possui uma ampla divergência, variando de 32 a 75 % de conteúdo de GC, porém essa diferença pode estar presente mesmo entre vírus do mesmo gênero (McGeoch et al., 2006).

No caso do herpesvírus humano tipo 1 (HHV-1), e considerando-o como regra geral, o DNA circulariza-se imediatamente após a liberação do capsídeo no núcleo das células infectadas (Roizman et al., 1992). Os genomas de herpesvírus parecem ter uma única extensão nucleotídica 3', ou seja, um nucleotídeo desemparelhado em cada terminação; porém, eles não são complementares entre si (McGeoch et al., 2006). Os genomas de todos os herpesvírus estudados também contêm sinais para o empacotamento nas regiões terminais do DNA no capsídeo (Roizman & Pellett, 2001). O tamanho do genoma viral, característico de cada espécie, não é um reflexo de polimorfismos. As diferenças de tamanho dos genomas de isolados de um mesmo vírus podem ser tão grandes quanto 10 Kb e frequentemente espelham a existência de sequências repetidas ou a ocorrência de deleções espontâneas (Roizman et al., 1992). Os genomas dos herpesvírus apresentam entre 70 e 200 genes, de acordo com o tamanho do genoma viral.

Uma característica intrigante do genoma dos herpesvírus é a estrutura (arranjo) das sequências. A Figura 2.2 enfatiza as sequências

repetidas terminais maiores que 100 pb. Os herpesvírus podem ser divididos em seis grupos, designados de A a F. Nos genomas dos vírus do grupo A, exemplificado pelo ICHV-1, uma grande sequência terminal é diretamente repetida na outra terminação. No grupo B, ao qual o pertence o vírus de sagui *Saimiriine herpesvirus 1* (SaHV-1), a sequência terminal é diretamente repetida diversas e por um número variável de vezes nas duas extremidades. No grupo C, representado pelo vírus Epstein-Barr Humano (HHV-4), o número de repetições terminais diretas é menor, mas pode haver outras sequências não-relacionadas, superiores a 100 pb, que são diretamente repetidas e que subdividem a sequência única (ou quase única) do genoma em diversos trechos. No grupo D, do qual o vírus humano Varicella-Zoster (HHV-3) faz parte, a sequência em uma das pontas é repetida com a orientação invertida internamente, formando dois domínios, uma região única longa (componente L ou longo) e uma região única curta (componente S ou curto). Curiosamente, nestes genomas, o componente S – que consiste no trecho de sequência única flanqueada por repetições invertidas – pode se inverter em relação ao componente longo, de modo que o DNA viral em geral consiste de duas populações equimolares, cuja única diferença é na orientação do componente S (em relação à orientação fixa do componente L). No grupo E, que abriga o HHV-1, sequências das duas extremidades são repetidas internamente em orientação invertida e justaposta, dividindo o genoma em dois componentes (L e S). Nesse caso, podem ser encontradas quatro populações de DNA, pois os dois componentes podem se inverter um em relação ao outro. Por fim, o grupo F, do qual o citomegalovírus de camundongo *Murid herpesvirus 1* é membro,

não há sequências terminais idênticas ou repetidas (Roizman et al., 1992). Embora as sequências repetidas possam causar inversão e expansão de genes, o papel dessas repetições e a vantagem que elas confeririam à replicação viral ainda não são entendidos (Roizman & Pellett, 2001).

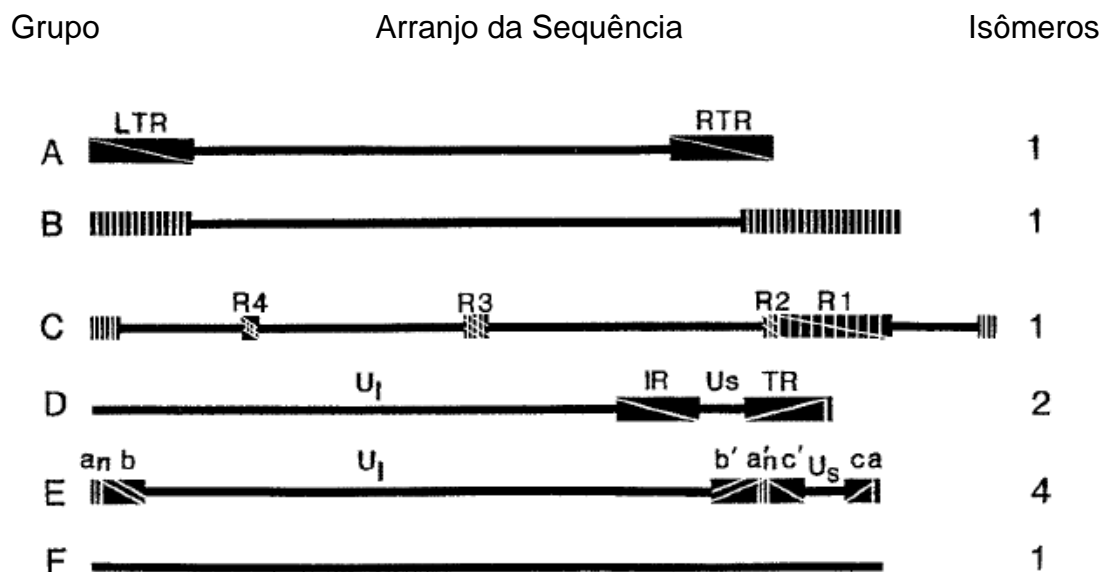


Figura 2.2. Diagrama esquemático da organização genômica dos herpesvírus, exemplificando os seis grupos existentes (coluna central). À esquerda, na figura, está a designação do grupo de arranjo do genoma; à direita, o número de isômeros de DNA possivelmente encontrados (em razão da inversão dos componentes). As linhas horizontais representam regiões únicas ou quase únicas do genoma. As regiões repetidas são mostradas como retângulos e estão designadas como repetições terminais esquerdas ou direitas (respectivamente, LTR ou RTR) para o grupo A, repetições R1 a R4 para repetições internas do grupo C e repetições internas e terminais (IR e TR) para o grupo D. As terminações do grupo E consistem de dois elementos: uma terminação contendo n cópias de uma sequência a ao lado de uma sequência maior b ; a outra terminação tem uma cópia da repetição direta da sequência a ao lado de uma sequência c . As terminações ab e ca estão inseridas internamente em uma orientação invertida, separando os domínios único longo (U_l) e único curto (U_s). No grupo B, sequências são repetidas numerosas vezes nas duas terminações (Adaptado de Roizman & Pellett, 2001).

2.3.1 Classificação & funções gênicas

Os genes de herpesvírus podem ser divididos em duas categorias: “genes fundamentais” (genes *core*), que foram herdados de um ancestral comum e, por conseguinte, constituem os sistemas fundamentais para a

replicação; e os “genes acessórios” (genes *non-core*), que se desenvolveram mais recentemente e, assim, representam o sistema auxiliar responsável por ajustar o vírus a um nicho biológico particular. Os genes fundamentais estão envolvidos principalmente na estrutura e montagem do capsídeo viral, no egresso do capsídeo do núcleo, na replicação e empacotamento do DNA e, em menor proporção, na bioquímica periférica para a replicação do DNA. Há outros tipos de produtos codificados por genes fundamentais, como componentes menores do tegumento ou do envelope viral e proteínas que controlam processos na regulação pós-transcricional e na fosforilação de proteínas. A conservação desses sistemas em toda a família *Herpesviridae* implica que esses genes já existiam no herpesvírus ancestral de vertebrados há 200 milhões de anos. Apesar disso, muitos genes, pertencentes às categorias de tegumento, de proteína de superfície e de controle, não são considerados genes fundamentais, pois foram evolucionariamente adquiridos recentemente (Davison et al., 2002).

Os genes acessórios podem ser divididos em quatro categorias, de acordo com a função desempenhada. A primeira categoria consiste em genes que fornecem aos vírus um tropismo celular específico. Diferentes herpesvírus têm uma gama distinta de hospedeiros, e herpesvírus que conseguem infectar o mesmo hospedeiro podem penetrar em diferentes tipos de células desse hospedeiro. A segunda categoria confere aos vírus graus de controle dos processos celulares. Nessa categoria estão incluídas proteínas que afetam a transcrição de genes e a tradução das proteínas (virais ou não) em detrimento dos interesses do hospedeiro. A terceira categoria, na qual a sofisticação dos

herpesvírus é cada vez mais evidente, é sua capacidade de manipular ou evadir o sistema imunológico dos hospedeiros (Davison et al., 2002). Por fim, a quarta categoria do sistema acessório é formada pelos genes relacionados com a latência. Parece que o sistema molecular da latência usado pelos herpesvírus difere de vírus para vírus, indicando alterações de estratégias durante a evolução. Entretanto, ainda é pouco entendido sobre como a latência funciona a nível molecular (Davison et al., 2002; Jones et al., 2006).

Uma característica dos produtos gênicos dos herpesvírus é a multifuncionalidade das suas proteínas – funções estas que podem ou não estar relacionadas. Por exemplo, a proteína de infecção celular 0 (ICP0) do HSV atua como um transativador promíscuo. Ela se localiza primeiro no núcleo e, mais tarde, no citoplasma e interage com várias proteínas do hospedeiro nesses dois compartimentos (Roizman & Pellet, 2001).

2.3.2 Regulação da expressão gênica

Quanto mais são estudados, mais complexos parecem ser os sistemas que regulam as expressões dos genes dos herpesvírus. Em células com infecção produtiva por HSV, genes virais formam pelo menos quatro grupos que diferem em relação à ordem de expressão e ao mecanismo que a dirige (Roizman & Pellet, 2001). Há os genes α (também chamados de genes *immediate early* ou de transcrição imediata), que não necessitam de síntese viral prévia para sua expressão. Os genes β (genes *early* ou iniciais) são aqueles que a expressão é totalmente dependente da síntese de DNA viral. Os genes γ (genes *late* ou tardios) podem ser divididos em genes parcialmente

tardios (γ_1), cuja expressão é aumentada com o começo da síntese do DNA viral, e verdadeiramente tardios (γ_2), cuja expressão é totalmente depende da síntese do DNA viral. A expressão gênica dos herpesvírus durante uma infecção produtiva apresenta uma cascata regulatória clássica, com características básicas conservadas ao longo da ordem. Alguns dos primeiros genes a ser expressos durante a infecção (genes de transcrição imediata) codificam proteínas que regulam a expressão dos demais genes (iniciais e tardios). Em linhas gerais, os genes iniciais codificam enzimas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos e na replicação do DNA e varias glicoproteínas do envelope, enquanto os genes tardios são responsáveis por codificar proteínas estruturais do vírion (Roizman & Pellet, 2001).

2.4 Família Herpesviridae

A Família *Herpesviridae* é dividida em três subfamílias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae*. Essa divisão é baseada em diferenças biológicas entre os vírus que as compõem (Franco & Roehle, 2007).

Os membros da subfamília *Alphaherpesvirinae* foram classificados com base na variada gama de hospedeiros, no ciclo reprodutivo relativamente pequeno e na capacidade de estabelecer infecções latentes primariamente, mas não exclusivamente, em gânglios sensoriais. Os alfaherpesvírus disseminam-se rapidamente em cultivo celular e produzem uma eficiente destruição nas células infectadas (Roizman & Pellett, 2001). Essa subfamília

abriga os gêneros *Simplexvirus*, *Varicellovirus*, *Mardivirus* e *Iltovirus* (Davison, 2010).

2.4.1 Subfamília Alphaherpesvirinae

A principal característica dos alfaherpesvírus é sua capacidade de estabelecer, após a infecção aguda, uma infecção latente nos neurônios dos gânglios que inervam a região associada à primoinfecção em seu hospedeiro (Pastoret & Thiry, 1985; Jones, 1998). A filogenia dos alfaherpesvírus espelha a de seus hospedeiros, sustentando a visão de que os herpesvírus evoluíram com seus hospedeiros e não se estabeleceram frequentemente em novas espécies através de transmissão vertical. Essa correlação permite uma estimativa da taxa evolucionária dos alfaherpesvírus, a qual mostra-se ser aproximadamente 30 vezes mais rápida que a dos seus hospedeiros. Extrapolando-se essa informação, pode-se inferir que os herpesvírus de mamíferos e de aves evoluíram de um ancestral comum que existiu há cerca de 200 milhões de anos, período quando os primeiros mamíferos estavam se desenvolvendo. Esse ancestral comum contribuiu com 43 genes (genes *core*) para os herpesvírus atuais (McGeoch & Davison, 1999; Davison et al., 2002). Os membros dessa subfamília estão entre os herpesvírus mais conhecidos, tendo entre seus componentes o vírus do herpes labial e genital humano (HHV-1 e HHV-2, respectivamente), o vírus da catapora (VZV ou HHV-3), vírus de suínos (SuHV-1), de caninos (CaHV-1), de caprinos (CpHV-1), de cervídeos (CeHV-1), de galináceos (GaHV-1, 2 e 3), de equinos (EHV-1, 3, 4, 8 e 9) e três dos herpesvírus bovinos (BoHV-1, 2 e 5) (Davison et al., 2009; c.f. ICTVdB^b).

2.4.1.1 Replicação Viral

O processo de replicação se inicia com o encontro do vírus com uma célula com receptores de superfície apropriados, que após interagirem com as glicoproteínas do envelope viral, permitem a fusão desse com a membrana plasmática celular. O capsídeo é então transportado ao poro nuclear, onde é liberado o genoma viral. Em neurônios sensoriais, o resultado da entrada no núcleo é a repressão da expressão do genoma viral, com exceção dos genes relacionados com a latência (genes LAT). Nas demais células, uma série de eventos conduz à transcrição sequencial dos genes virais, à supressão das respostas imunológicas do hospedeiro à infecção viral e, por fim, à síntese e montagem da progênie viral (Roizman et al., 2005).

2.4.1.1.1 Adsorção e penetração

Para a entrada do vírus na célula é necessário primeiramente que haja uma ligação entre certos receptores celulares e glicoproteínas do envelope viral – esse processo é chamado de adsorção. Essa interação permite que ocorra uma fusão entre o envelope e a membrana plasmática da célula e, subseqüentemente, uma invaginação e uma perfuração da membrana, que é a penetração (Wild et al., 1998).

2.4.1.1.2 Expressão gênica e replicação do genoma

Uma vez dentro da célula, acredita-se que o vírus seja transportado pelo citoesqueleto até o centro organizador de microtúbulos, o qual fica localizado próximo do núcleo da célula (Wild et al., 1998). Então o nucleocapsídeo viral associa-se a poros da membrana nuclear, e ocorre a

liberação do DNA viral para dentro do núcleo celular através da desintegração do capsídeo. A transcrição começa em seguida, através da ação da RNA polimerase II celular e de fatores de transcrição celulares e virais (Cann, 2005). Pouco se sabe em relação a fatores celulares específicos, que permitem a replicação dos herpesvírus em hospedeiros ou tipos celulares específicos, porém sabe-se que eles são capazes de alterar o ambiente celular para servir às suas necessidades, o que inclui o desligamento ou a estimulação da síntese de macromoléculas na célula hospedeira (Roizman & Pellett, 2001).

A transcrição do genoma tem a sua sequência regulada sob a forma de uma cascata, graças à expressão de fatores que controlam a expressão dos genes virais, determinando as fases da infecção. Os genes α são expressos logo após a entrada do genoma no núcleo. Entretanto, para dar início à expressão desses genes, é necessário que o fator iniciador de transcrição dos genes α (α -TIF), uma proteína do tegumento, se conjugue com fatores celulares para estimular a transcrição. As proteínas sintetizadas a partir desses genes têm como principal função estimular a transcrição dos genes β (Cann, 2005). Os genes β codificam, em sua maior parte, proteínas responsáveis pelo metabolismo de nucleotídeos e pela replicação do DNA, incluindo a polimerase viral. Assim, depois da expressão dos genes β , começa a intensa replicação do genoma viral, sob a forma de concatâmeros, que se acumulam em compartimentos replicativos no núcleo e são posteriormente clivadas, dando origem a genomas individuais. Quando muitas cópias do genoma viral já estão presentes na célula, ocorre a expressão dos genes γ . A maioria das proteínas transcritas por esse grupo é necessária para a morfogênese da partícula viral,

isto é, são proteínas estruturais que constituem os vírions. Enquanto essa expressão de proteínas ocorre, a transcrição e algumas das vias metabólicas da célula passam a ser inibidas por ação de certas proteínas virais. Dessa maneira, a maquinaria celular fica à disposição das necessidades virais, permitindo o livre processamento, transporte de seus mRNAs e síntese proteica (Franco & Roehle, 2007).

2.4.1.1.3 Morfogênese e liberação

Após a expressão dos componentes da partícula viral, pode iniciar-se o processo de montagem do capsídeo no citoplasma. Dessa forma, as proteínas estruturais sintetizadas no citoplasma se pré-associam e são transportadas para o núcleo. Lá, ocorre a finalização da montagem, que culmina com a inserção do genoma viral na estrutura em formação (White & Fenner, 1994). Começa então uma complexa fase de finalização de montagem da partícula viral e egresso do vírion da célula.

O nucleocapsídeo deixa o núcleo brotando através da membrana interna da carioteca, adquirindo, assim, um envelope primário. Para sair do espaço perinuclear e chegar ao citoplasma, o vírus sofre um novo processo de perda de envelope, através de uma fusão com a membrana externa do núcleo. É importante ressaltar que essa fusão é diferente da fusão pela qual o vírus passa para penetrar na célula, pois as proteínas envolvidas nesses processos são diferentes: as proteínas encontradas e necessárias para o vírion penetrar em uma célula não estão envolvidas na liberação viral; da mesma forma, as proteínas, presentes nessa partícula viral intermediária, que atuam no egresso

do núcleo, são de origem tegumentar e parecem não estar presentes no vírion (Mettenleiter, 2003).

Já no citoplasma, o capsídeo adquire o restante das proteínas do tegumento e o envelope final, através de brotamentos com vesículas do sistema trans-Golgi. Essas vesículas agora contêm vírions completos e são transportadas para a membrana plasmática. Por fim, ocorre a liberação dos vírus, principalmente através da fusão das vesículas com a membrana plasmática, podendo levar à lise celular (Granzow et al., 2001; Mettenleiter et al., 2006) (Figura 2.3). Estudos indicam a ocorrência de um processo de maturação mais finamente ajustado nos neurônios, para a obtenção de um transporte seguro de subconjuntos virais inócuos em virtude das longas distâncias celulares. O capsídeo e as proteínas do envelope seriam

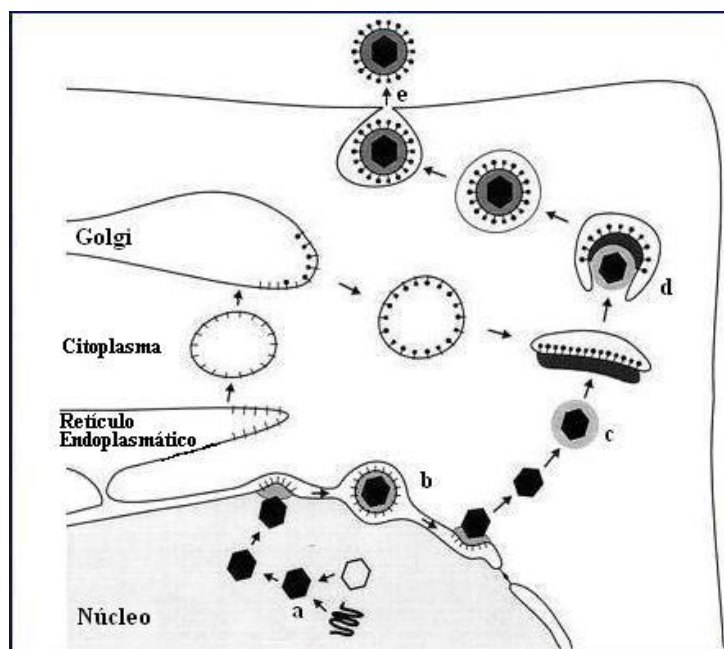


Figura 2.3. A montagem e o egresso de um herpesvírus representados esquematicamente. No núcleo, ocorre a montagem do nucleocapsídeo (a), que brota através da carioteca, com a formação e perda de um envelope temporário (b). Então, já no citoplasma, as proteínas tegumentares juntam-se ao nucleocapsídeo (c). Em seguida, esse conjunto brota em uma vesícula do Golgi, a qual contém proteínas do envelope (d). Por fim, o vírus já formado se dirige à membrana plasmática, por onde irá deixar a célula, provavelmente através de um processo de fusão com a membrana (e) (adaptado de Mettenleiter, 2002).

transportados separadamente, por proteínas distintas, através do axônio e a montagem só ocorreria no terminal axonal (Mettenleiter, 2002).

2.4.1.2 Herpesvírus bovinos

Até o momento estão descritos 5 tipos diferentes de herpesvírus bovinos. Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) pertence ao gênero *Varicellovirus* e é o protótipo dos alfaherpesvírus bovinos. Ele é o agente da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), vulvovaginite pustular infecciosa (IPV) e balanopostite infecciosa (IBP). O BoHV-2 é um vírus do gênero *Simplexvirus* e é o principal causador de mamilites herpéticas em bovinos e de uma doença de pele conhecida como “Pseudo-lumpy skin disease”. O BoHV-4, diferentemente dos outros vírus já mencionados, não pertence à subfamília *Alfaherpesvirinae*, mas sim à subfamília *Gammaherpesvirinae* e ao gênero *Citomegalovirus*. Ele não está claramente associado a nenhuma doença até o momento. O BoHV-5 é um alfaherpesvírus do gênero *Varicellovirus*, como o BoHV-1, e trata-se de um agente com maior neurovirulência, sendo um dos principais causadores de encefalites herpéticas virais em bovinos (Staczec, 1990; Trapp et al., 2003). O BoHV-6 é um gammaherpesvírus do gênero *Macavirus* e é também conhecido como Herpesvírus bovino linfotrópico (BLHV), para o qual não há nenhuma doença relacionada até o momento. Outros herpesvírus podem eventualmente infectar bovinos, como o herpesvírus suíno 1 (SuHV-1), agente da doença de Aujeszky (Muylkens et al., 2007). O vírus outrora denominado BoHV-3, o vírus da Febre Catarral Maligna, foi relocado como *Ovine herpesvirus 2* (OvHV-2) ou *Alcelaphine herpesvirus 1* (AIHV1) (Davison, 2010).

2.4.1.2.1 Herpesvírus Bovino tipo 1 (BoHV-1)

O BoHV-1 é um vírus mundialmente distribuído, sendo o agente etiológico de muitas doenças de importância veterinária. Sua infecção apresenta altos níveis de morbidade, porém baixos níveis de mortalidade (Weiblen et al., 1992). No Brasil, grande parte das propriedades rurais apresenta animais sorologicamente positivos para o BoHV-1. Estudos sorológicos demonstram que exposição dos animais ao vírus varia em rebanhos brasileiros, encontrando-se de 22,2 % a 83,0 % de animais positivos (Cerqueira et al., 2000; Médici et al., 2000; Takiuchi et al., 2001; Vieira et al., 2003; Barbosa et al., 2005; Quincozes, 2005; Dias, 2006; Del Fava et al., 2007).

O BoHV-1 pode ser dividido em subtipos (BoHV-1.1, BoHV-1.2a e BoHV-1.2b), embora eles apresentem extensa reatividade sorológica cruzada entre si. Essas divisões são baseadas nos perfis obtidos a partir da digestão com enzimas de restrição ou de reações antigênicas frente a painéis de anticorpos monoclonais (Rijsewijk et al., 1999; D'Arce et al., 2002; Souza et al., 2002). Associações entre quadros clínicos apresentados pelos animais e os subtipos virais têm sido realizadas (Bulach & Studdert, 1990), embora estudos indiquem que talvez essa correlação não seja verdadeira (Spilki et al., 2005). O BoHV-1.1 é prevalente em muitos países da Europa e da Américas. Entre as manifestações clínicas ligadas a ele estão a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) e abortos (Gibbs & Rweyemamu, 1977; Muylkens et al., 2007). O subtipo BoHV-1.2a tem sido associado a uma variedade de manifestações clínicas, incluindo Balanopostite Pustular Infecciosa (IPB), Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IPV) - doenças do trato genital -, abortos e também IBR (Edwards et

al., 1991). No Brasil, este é o subtipo mais frequentemente isolado, enquanto que, em países da Europa, tornou-se raro depois dos anos 1970 (Franco & Roehe, 2007). Por fim, o BoHV-1.2b é responsável ou está envolvido com doença respiratória leve, de IPV e de IPB, mas não foi associado a abortos, mesmo em infecções experimentais (Miller et al., 1991). O subtipo 2b é mais prevalente na Austrália e nos países europeus. Outras manifestações clínicas menos comuns, mas que também podem ser atribuídas ao BoHV-1, são perdas na produção do leite, problemas reprodutivos e mortalidade neonatal (Franco & Roehe, 2007).

2.4.1.2.2 Herpesvírus Bovino tipo 5 (BoHV-5)

O BoHV-5 é o agente etiológico da encefalite herpética bovina e das meningoencefalites fatais em terneiros de até 8 meses de idade e, ocasionalmente, em bovinos com até dois anos. Essas formas de apresentação da doença podem apresentar uma taxa de mortalidade de 100 % dos casos (Ashbaugh et al., 1997). O BoHV-5, assim como o BoHV-1, pode ser subdividido (BoHV-5a, BoHV-5b e BoHV-5 “não-a/não-b”), com base no perfil antigênico e genômico (D’Arce et al., 2002).

As encefalites causadas pelo BoHV-5 foram identificadas pela primeira vez na Argentina e na Austrália (Johnston et al. 1962; Hall et al. 1966; Carrillo et al., 1983). Desde então outros países também têm registrado casos, incluindo o Brasil. Tanto através das evidências clínicas, como pelo isolamento do agente nos casos, tem sido demonstrada a presença desse agente no país. Surto de meningoencefalite têm sido detectados no Brasil, Argentina e

Uruguai (Schudel et al., 1986; Salvador et al., 1998; Pidone et al., 1999; Silva, et al., 2007b). No Rio Grande do Sul, o vírus também tem causado surtos esporádicos de meningoencefalites (Riet-Correa et al., 1989; Weiblen et al., 1989). Algo intrigante em relação à epidemiologia desse vírus é o fato dele parecer ser causa de morbidade e mortalidade importante somente em países do Hemisfério Sul (Franco & Roehle, 2007). Embora ainda se desconheça a real prevalência desse agente no país, principalmente devido à reatividade sorológica cruzada com BoHV-1, estudos vêm revelando uma alta prevalência no Rio Grande do Sul (Campos et al., 2009; Holz et al., 2009).

2.4.1.2.3 Patogenia e Sinais Clínicos

As infecções por herpesvírus são transmitidas através de aerossóis ou pelo contato direto entre um hospedeiro infectado e um suscetível. Após o contato com a mucosa de um animal suscetível, os herpesvírus estabelecem uma replicação inicial em células epiteliais locais. Essa replicação causa a lise dessas células, levando ao surgimento dos primeiros sinais clínicos da infecção: congestão local, presença de secreção e lesões na mucosa, que variam na gravidade entre vesiculares e erosivas (Vogel et al., 2003).

Após a replicação primária, o vírus invade as terminações nervosas. Ele é transportado ao longo dos axônios até os corpos neuronais dos gânglios sensoriais ou autônomos para o estabelecimento da latência (Figura 2.4). Sabe-se que os gânglios em que o vírus estabelece latência são os trigeminiais e os paravertebrais lombares e sacrais – nesse último caso, especialmente no terceiro par sacral (Van Engelenburg et al., 1995).

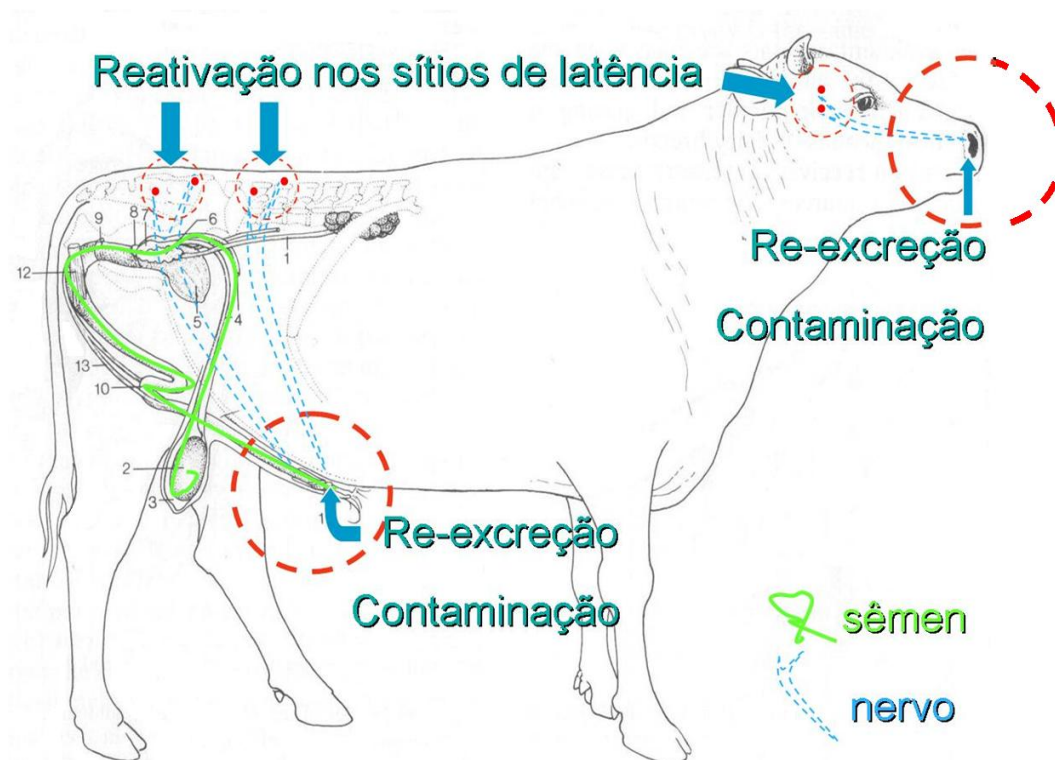


Figura 2.4. Principais sítio de latência em BoHV-1 e 5 em bovinos. O esquema ilustra os principais sítios de latências em bovinos de BoHV-1 e 5 (indicados pelas setas azuis e representados pelos pontos vermelhos) e o trajeto de reativação dos mesmos através dos gânglios (tracejado em azul). Em verde, o trajeto que o sêmen percorre para ser ejaculado (cortesia de F.A.M. Rijsewijk).

Durante a fase aguda da doença, elevados títulos virais são produzidos e excretados através das secreções – nasofaríngeal, ocular ou genital, de acordo com o local da infecção. Nos períodos de reativação, o vírus volta a estabelecer uma infecção aguda, embora a excreção viral costume ser mais moderada. Ainda assim, esse mecanismo de disseminação viral torna o animal infectado uma fonte de infecção para outros animais, tanto direta, como indiretamente (Wyler et al., 1989). É importante ressaltar que a excreção através das secreções não ocorre de forma uniforme ou contínua. Entretanto, como o vírus pode estar presente no sêmen de touros infectados, tanto a monta natural quanto a inseminação artificial possam transmitir o vírus. O sêmen é contaminado durante a ejaculação, uma vez que o vírus está sendo

excretado pelas células da mucosa prepucial, peniana e, talvez, do tecido epitelial da uretra distal. Logo, embora todos os touros soropositivos sejam potenciais transmissores da infecção a fêmeas suscetíveis, nem todas as amostras de sêmen coletadas terão vírus ou uma carga viral suficiente para infectar uma fêmea (Wrathalla et al., 2006; Van Engelenburg et al., 1993).

a) Rinotraquite Infeciosa Bovina (IBR)

O agente foi isolado pela primeira vez nos Estados Unidos em 1956 (Madin et al., 1956). A IBR trata-se de uma infecção no trato respiratório inferior do animal pelo BoHV-1. A IBR pode apresentar-se de forma subclínica, leve ou severa, apresentando alta morbidade, porém baixa mortalidade - menor do que 5 % dos casos (Ackermann & Engels, 2006). Os sinais clínicos incluem febre, depressão, inapetência, secreção nasal inicialmente serosa com evolução para uma apresentação mucopurulenta. No início da doença, a mucosa nasal torna-se hiperêmica. Ocorre o aparecimento de lesões que podem ser a princípio de difícil visualização, mas que vão evoluindo para pústulas locais e, finalmente, para grandes áreas superficiais hemorrágicas, cobertas por uma membrana diftérica. Os animais afetados podem, ainda, às vezes, apresentar como único sinal clínico uma conjuntivite (uni ou bilateral). Casos agudos podem durar de 5 a 10 dias (Esteves, 2001).

Surtos da doença são mais freqüentes em animais jovens e estão comumente associados a situações de estresse e de aglomeração de animais, como durante o transporte ou o confinamento. Os episódios da doença podem ser acompanhados por infecções secundárias de bactérias - *Mannheimia*

haemolytica, *Pasteurella multocida* e *Haemophilus somnus* - e vírus - vírus da Diarréia viral bovina (BVDV), vírus Parainfluenza bovino 3 (bPI-3V) e o vírus respiratório sincicial bovino (BRSV). Esses quadros recebem o nome de Complexo Respiratório dos Bovinos (CRB). O BoHV-1 pode desencadear CRB por suprimir transitoriamente o sistema imune de animais infectados, especialmente a resposta celular. Essa supressão leva a uma maior susceptibilidade a infecções bacterianas secundárias e, até mesmo, à pneumonia (Franco & Roehe, 2007; Jones & Chowdhury, 2008).

b) Infecções do Trato Genital e problemas reprodutivos

A Balanopostite Pustular Infeciosa (IPB) e a Vulvovaginite Pustular Infeciosa (IPV) são as principais patologias causadas por BoHV-1 no trato genital de bovinos. A maioria dessas infecções está associada com o subtipo 2b. A infecção do trato genital da fêmea costuma ocorrer devido ao contato da mucosa com secreções contaminadas com o vírus, usualmente em virtude da cobertura ou da inseminação artificial. As manifestações clínicas, que aparecem logo após um curto período de incubação, são vulva hiperêmica e edemaciada e a presença de vesículas pela mucosa da mesma. Essas vesículas rapidamente evoluem para pústulas e podem coalescer, formando úlceras (Franco & Roehe, 2007).

Em touros infectados com o vírus, os sinais clínicos são semelhantes, porém acometem o pênis e o prepúcio. Infecções bacterianas secundárias, resultando em secreção prepucial purulenta, podem ocorrer. Em casos graves, hemorragias podem acometer a mucosa desse órgão. Durante a

fase aguda, o animal se recusa a montar, frequentemente exterioriza o pênis e apresenta corrimento prepucial (Franco & Roehe, 2007). Ocorre também uma diminuição da qualidade do sêmen desses animais, devido à redução da mobilidade e a presença de anormalidades morfológicas dos espermatozóides (Turin et al., 1999). Em ambos os casos, até o oitavo dia depois do começo da infecção, a doença começa a regredir. Muitos casos apresentam-se sob a forma subclínica (Franco & Roehe, 2007). É possível também que o BoHV-5 possa produzir infecções genitais, pois o vírus já foi isolado de sêmen de touros e há relato da identificação de BoHV-5 recuperado de casos de aborto (Schudel et al., 1986).

Outras manifestações dependem das estruturas envolvidas e da presença de gestação. As infecções podem ocasionar quadros de endometriose, ooforite, absorção embrionária com retorno ao cio, mortalidade fetal, natimorto, mortalidade neonatal e nascimento de animais fracos (Miller & van der Maaten, 1984; Rocha et al., 1998; Alfieri, 1999; Kahrs, 2001). Esses vírus também podem causar uma viremia transitória, podendo ser a causa de infecções fetais e abortos. Embora o BoHV-1 tenha sido apontado como causa vírica frequente de abortos (Miller et al., 1995), há também relatos demonstrando a existência de BoHV-5 em órgãos internos – baço e fígado – de fetos abortados (Heinlein et al., 1993). Tanto útero, ovário, quanto embrião podem sofrer conseqüências diretas da infecção pelo vírus. Os vírus podem atingir estes órgãos através da viremia (posterior a primoinfecção ou através de reativação) ou através de sêmen contaminado (Ludwig, 1983). No entanto,

estudos para definir a patogenia desse tipo de quadro ainda não foram realizados (Franco & Roehe, 2007).

Os problemas associados à fertilização estão relacionados principalmente à presença do vírus do esperma. O vírus tende a se ligar na membrana plasmática dos espermatozoides, inibindo sua capacidade de penetrar no oócito - embora que, teoricamente, seja possível, mas pouco provável, que esse “espermatozoide infectado” se ligue a zona pelúcida do oócito e o fertilize (Wrathalla et al., 2006).

c) Encefalites

Embora haja na literatura relatos de encefalites causadas por BoHV-1 (Belknap et al., 1994; Ely et al., 1996; Roels et al., 2000, Silva et al., 2007), o BoHV-5 é considerado o principal agente responsável por meningoencefalites induzidas por herpesvírus em bovinos (Roels et al., 2000). O BoHV-5 apresenta um caráter neuroinvasivo, isto é, ele possui a capacidade de invadir, de replicar e de se disseminar no sistema nervoso central (SNC). Ele também é um vírus neurovirulento, podendo, portanto, provocar lesões no SNC, devido a sua capacidade de se replicar ativamente nos corpos neuronais, e vir a produzir, conseqüentemente, sinais neurológicos nos animais (Meyer et al., 2001). . Ambas as características apresentam variações de intensidade de acordo com a amostra de vírus (Meyer et al., 2001; Caron et al., 2002; Chowdhury et al., 2006). Assim, apesar de reativações de infecções por herpesvírus serem acompanhadas de sinais clínicos em uma fração de episódios, os fatores que levam à neurovirulência do BoHV-5 são ainda desconhecidos, e a despeito de

evidências apontarem para funções relacionadas a diferentes glicoproteínas, nem uma delas determina sozinha a neurovirulência (Thiry et al. 2006).

Para estabelecer uma encefalite, o agente precisa replicar-se no gânglio trigêmeo e seguir para o encéfalo, atingir os neurônios de segunda ordem nos núcleos da ponte e do bulbo. A partir desses sítios, o vírus consegue disseminar-se ao cerebelo e ao tálamo, podendo então alcançar o córtex cerebral. Experimentos demonstram que o BoHV-5 distribui-se de forma heterogênea pelo encéfalo, podendo causar uma infecção disseminada ou infecções locais no bulbo, na ponte, no mesencéfalo e nos córtices olfatório ou frontal (Franco & Roehe, 2007). Estudos de patogenia da infecção pelo BoHV-5, tendo coelhos como modelo, sugerem ainda que o sistema olfatório é a principal via de acesso ao SNC, após a replicação primária na mucosa nasal (Chowdhury et al., 1997; Beltrão et al., 2000). Embora de forma menos eficiente quando comparada com a via olfatória, ainda assim, as vias nervosas ligadas ao gânglio trigêmeo também são utilizadas pelo BoHV-5 e têm um caráter importante, uma vez que são o caminho que o vírus percorre para poder estabelecer a infecção latente (Diel et al., 2005).

Esse tipo de quadro pode variar entre episódios moderados e passageiros a progressivos e fatais. Os sintomas podem variar, de acordo com a região do encéfalo afetada. Às vezes, uma depressão profunda é o único sinal evidente. Outras manifestações observadas são andar cambaleante, bruxismo, protusão da língua, salivação, flexionamento do pescoço, cegueira, pressionamento da cabeça contra anteparos, ataxia e sinais respiratórios (hiperemia, corrimento nasal, dificuldade respiratória). Por fim, a doença

culmina com decúbito, convulsões e morte do animal (Franco & Roehe, 2007). A principal alteração histológica observada é uma meningoencefalite não supurativa necrosante no córtex cerebral (Perez et al., 2002; Lemos, 2005; Rissi et al., 2008).

2.4.1.2.4 Importância Econômica da Infecção

Os BoHV-1 e 5 são agentes etiológicos primários de doenças, que causam grande impacto na pecuária, levando a significativo detrimento econômico para a bovinocultura de corte e de leite em todo o mundo (Fauquet et al., 2004). Por exemplo, até 25 % das fêmeas em gestação de um rebanho podem abortar durante um surto de BoHV, demonstrando ser uma importante causa de prejuízo nas criações de bovinos (Franco & Roehe, 2007). Da mesma forma, a mortalidade neonatal, os problemas reprodutivos e a diminuição na produção de leite também representam perdas (Wellenberg et al., 2002). Nos episódios de mastites, assim como nos quadros de CRB, infecções secundárias representam gastos adicionais ao criador (Wellenberg et al., 2002; Jones & Chowdhury, 2008). O vírus pode também estar presente no sêmen de animais infectados e ser transmitido tanto através da monta natural, como da inseminação artificial. Dessa forma, a infecção faz com que não apenas o sêmen desse reprodutor perca a qualidade, mas também pode fazer com que o reprodutor perca seu valor (Turin et al., 1999; Silva et al., 2000).

Assim, dada às importantes consequências desses vírus na bovinocultura, os Estados Unidos e muitos países da Europa têm imposto barreiras na comercialização de animais vivos, de sêmen e de embriões. Esses

países também vêm estabelecendo campanhas de controle e erradicação da doença (Alegre et al., 2001). Alguns países da União Européia (Dinamarca, Finlândia, Suécia, Suíça, Noruega e Áustria) e a Austrália têm promovido a erradicação do BoHV-1, eliminando os animais soropositivos (Ackermann & Engels, 2006). Em países com alta prevalência de animais soropositivos, esse tipo de abordagem torna-se inviável e muito cara. Por isso, a alternativa que vem sendo tomada, como controle da disseminação da doença, é a vacinação (Castrucci et al., 2002; Jones & Chowdhury, 2008).

2.5 Diagnóstico viral

O diagnóstico de uma virose é importante para a determinação da prevalência da infecção e para o estabelecimento de alternativas de controle e erradicação da mesma. Há dois tipos de diagnóstico de uma virose. O primeiro é o diagnóstico clínico da doença, no qual é observada a sintomatologia do animal. O outro tipo teste é o laboratorial, no qual se tenta isolar ou identificar o agente etiológico da doença.

2.5.1 Análise laboratorial

Há três métodos principais de detecção laboratorial para vírus: 1) técnicas sorológicas, nas quais se detecta a presença de anticorpos contra o vírus ou de antígenos virais; 2) isolamento de vírus em cultivos celulares; 3) métodos moleculares (Roehle et al., 1997a).

As amostras geralmente utilizadas para a detecção de vírus são suabes de secreções, sejam elas nasais, oculares, vaginais, de prepúcio ou de áreas com lesões evidentes. Elas podem também ser tecidos com suspeita de

infecção. Para o isolamento do agente, as amostras devem ser mantidas refrigeradas e não é recomendado o congelamento das mesmas a -20 °C, pois esta temperatura pode inativar o vírus. Outro tipo possível de amostra é o soro do animal, utilizado para detecção de anticorpos, (Franco & Roehe, 2007).

2.5.1.1 Isolamento Viral

O isolamento viral é a técnica padrão para a detecção de BoHV-1 e BoHV-5 (Roehe et al., 1997b). Para a sua execução, suspensões de tecidos ou secreções são colocadas sobre cultivos de células e, após um período variável de incubação, a presença de vírus é detectada pelo efeito citopático (Weiblen et al., 1992). Esse é um procedimento laborioso, que apresenta uma demora na visualização do resultado (de 1 a 5 dias) e que requer o processamento das amostras em até vinte e quatro horas após a coleta. Ainda alguns tecidos – por exemplo, o sêmen – contêm enzimas, que são tóxicas para o cultivo celular ou que são inibidoras virais, interferindo no procedimento. Outra desvantagem desse tipo de diagnóstico é que não se pode fazer qualquer diferenciação entre os vírus, isto é, não é possível determinar se o vírus presente na amostra é BoHV-1 ou BoHV-5, assim como também não é possível fazer uma diferenciação entre uma amostra vacinal e uma amostra selvagem de um vírus. Na realidade, o resultado é baseado na presença ou ausência de um efeito citopático típico na monocamada celular. A identificação precisa do agente realmente ocorre através da associação de outras técnicas, como imunofluorescência (IF) ou imunoperoxidase (IPX). Esses testes utilizam anticorpos monoclonais, que detectam antígenos específicos de um vírus, podendo, assim, diferenciar as viroses. Essa associação ainda aumenta a

sensibilidade da técnica e diminui o tempo de obtenção de um resultado (Roehe et al., 1997b).

2.5.1.2 Testes Sorológicos

Na maioria dos laboratórios no Brasil, o diagnóstico sorológico de infecções por BoHV-1 ou BoHV-5 baseia-se em testes de soroneutralização (SN), teste considerado padrão em virologia pelo Manual da OIE. O resultado da prova é obtido geralmente entre 3 e 5 dias após a aplicação das células (Esteves, 2001). A SN apresenta uma baixa sensibilidade e não permite uma diferenciação precisa entre animais infectados com BoHV-1 ou BoHV-5 (Teixeira et al., 1998; Varela et al., 2009). Outro ensaio utilizado é o ELISA (Osório et al., 1989; Takiuchi et al., 2001; Spilki et al., 2005; Cárdenas et al., 2006). Atualmente existem vários tipos de ELISA disponíveis para BoHV-1 e alguns para BoHV-5 (Esteves, 2001). Assim como a SN, que possibilita a quantificação dos anticorpos neutralizantes – esse dado permite a verificação de uma infecção aguda, em geral, em aumentos maiores ou iguais a quatro vezes nos títulos de anticorpos em coletas pareadas –, o teste do tipo ELISA é qualitativo e quantitativo (Franco & Roehe, 2007). Também há relatos na literatura que indicam que mesmo esses testes apresentam reações cruzadas entre os vírus (Teixeira et al., 1998; Esteves et al., 1999; Wellenberg et al., 2001).

2.5.1.3 Testes Moleculares

A dificuldade em se diferenciar as infecções por BoHV-1 das infecções por BoHV-5 é em virtude da grande semelhança antigênica e

genômica entre os dois vírus. Essa grande semelhança reatividade cruzada, que dificultam a diferenciação pelos testes de rotina (Roizman et al., 1992; Chowdhury, 1995). Procedimentos mais específicos, baseados em vários tipos de provas de DNA, apresentam grande vantagem nesse contexto, pois conseguem diferenciar entre BoHV-1 e 5 e, em certos casos, podem ser muito sensíveis.

Técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido os métodos de diagnóstico mais explorado nos últimos anos. O desenvolvimento dessa abordagem tem alcançado grande sucesso principalmente graças à demonstração da alta sensibilidade, especificidade e rapidez de execução do método em análises de infecções latentes e em detecção viral no sêmen. Diferentes estratégias têm sido aplicadas para amplificar regiões alvo do genoma dos herpesvírus (Turin et al., 1999). A PCR tem como objetivo a amplificação de uma região alvo no DNA viral. Podem ser utilizados tanto tecidos como secreções para a extração de DNA (Dieffenbach & Dveksler, 1995). Outra linha de diagnóstico seria a combinação de diferentes provas moleculares (PCR-RFLP, Nested PCR, hibridizações *in situ*) que também podem ser capazes de diferenciar os vírus, o que é importante para a confirmação de tropismos e conhecimento da patogenia e epidemiologia das viroses (Turin et al., 1999). Por exemplo, o uso de enzimas de restrição após a amplificação de determinada região do genoma (PCR-RFLP) é um teste que pode ser usado para se subtipar tanto BoHV-1 e como BoHV-5 (Engels et al., 1981; Misra e tal., 1983).

2.6 Controle

Vários países da Europa têm implementado programas de controle e erradicação de BoHV-1. A principal medida adotada tem sido o estabelecimento de programas de vacinação. Embora a vacinação não seja capaz de prevenir as infecções por BoHV-1 (ou BoHV-5), seu uso atenua a severidade da doença e a excreção viral. Dessa forma, a vacinação diminui significativamente a disseminação, uma vez que a circulação viral nos rebanhos vacinados apresenta-se reduzida (Ackermann & Engels, 2006). Entretanto o uso de vacinas convencionais, vivas atenuadas ou inativadas, induz uma resposta humoral que não pode ser diferenciada da resposta imune apresentada por animais naturalmente infectados. Animais soropositivos para herpesvírus são potenciais disseminadores, devido à infecção latente que esses vírus estabelecem. A impossibilidade de se diferenciar animais vacinados de animais infectados com o vírus selvagem compromete a identificação de potenciais portadores do vírus e, conseqüentemente, o controle dessas infecções.

O uso de vacinas diferenciais (DIVA, do inglês *Differentiating infected from vaccinated*) contorna o problema acima mencionado (van Oirschot et al., 1990; van Oirschot, 1999). As DIVAs contém amostras virais atenuadas através da deleção de genes estruturais que codificam proteínas consideradas não essenciais à replicação viral (Flores et al., 1993; Kaashoek et al., 1994; van Engelenburg et al., 1994; Kaashoek et al., 1998). Essas proteínas podem ser um alvo potencial para uma DIVA, desde que, quando

ausentes, resultem na atenuação da infecção viral e sejam alvo dos anticorpos do hospedeiro após infecções naturais. Essa última característica é fundamental, pois é desta forma que se diferenciam animais vacinados de naturalmente infectados: através da detecção de anticorpos contra o vírus vacinal, porém com a ausência de um anticorpos específico – cujo gene que codifica a proteína foi deletado na DIVA –, que só é encontrado em animais infectados com o vírus selvagem. Assim, o uso de DIVAs permite que se estabeleçam estratégias de controle ou erradicação. Na realidade, o desenho de DIVAs permite também a alteração de proteínas que não produzam resposta humoral, mas que reduzam a patogenicidade do vírus ou que aumentem a qualidade da resposta imunológica do hospedeiro. Entretanto, não é possível contruir uma DIVA exclusivamente com alterações nesse tipo de proteína, uma vez que elas não poderão ser marcadoras de que aquele animal entrou em contato com uma amostra vacinal (van Oirschot et al., 1996; van Oirschot et al., 1997; van Oirschot et al., 1999; Mars et al., 2001; Lehmann et al., 2002).

A primeira DIVA produzida contra um herpesvírus foi desenvolvida para controlar o vírus da pseudorraiva, doença causada pelo herpesvírus de suínos tipo 1 (SuHV-1), a qual possuía uma deleção do gene que codifica a glicoproteína E (gE) (van Oirschot et al., 1986; Quint et al., 1987). Sua utilização diminuiu significativamente a circulação de vírus selvagem e, dessa maneira, as perdas econômicas decorrentes à infecção (Kimman et al., 1992; de Jong et al., 1994). O método de controle de infecções pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) em países europeus ocorre através da vacinação

compulsória de rebanhos com um vírus, do qual a gE foi removida, e o abate de animais positivos. Esta vacina foi extensivamente avaliada no que diz respeito à biossegurança e eficácia (Kaashoek et al., 1994; Kaashoek et al., 1995; Strube et al., 1996; Bosch et al., 1998; Mars et al., 2000; Mars et al., 2001). Estudos similares realizados no Brasil com uma amostra gE negativa (gE⁻) construída a partir de uma amostra autóctone de BoHV-1, levaram a resultados similares (Franco et al., 2002a; Franco et al., 2002b).

A alternativa de controle mais adequada para a situação brasileira seria a implementação de um programa de vacinação, contudo, nenhuma abordagem nesse sentido é posta em prática no Brasil (Franco et al., 2002b).. No Brasil, assim como em outros países da América do Sul, existem diversas vacinas comerciais contra BoHV-1. Entretanto, a maioria das vacinas disponíveis na América do Sul são vacinas convencionais – isto é, amostras inativadas ou uma amostra viva termo-sensível – contra BoHV-1 (Silva et al. 2007a). A falta de outras medidas de controle e ampla disseminação de BoHV-1 e BoHV-5 nos bovinos , favorece a manutenção e a disseminação desses vírus na população (Metzler et al., 1986; Silva et al., 2007b; Campos et al., 2009). Porém, como o BoHV-1 e o BoHV-5 apresentam características biológicas e epidemiológicas similares, as mesmas medidas podem ser adotadas para controlar ambos os vírus (Meyer et al., 2001). É importante ressaltar que não somente o uso de vacinas, mas também a vigilância organizada por testes sorológicos são necessários para o controle de herpesvírus bovinos. O comércio de bovinos soropositivos e de sêmen positivo para BoHV-1 ou 5 devem ser evitados, pois são o principal meio de

reintrodução do vírus em rebanhos livres (Kupferschmied et al., 1986; Six et al., 2001; Kahrs, 2001).

2.6.1 Vacinas contra BoHV-5

Apesar de existirem no mercado muitas vacinas contra infecções pelo BoHV-1, até o presente existem poucas vacinas contra infecções pelo BoHV-5 (Campos, 2009). O nível de proteção cruzada fornecido por vacinas contra BoHV-1 parece não ser suficiente para conferir proteção clínica satisfatória para BoHV-5. Em trabalhos que analisaram a proteção conferida por uma vacina de BoHV-1 gE-, ficou demonstrado que não foi alcançada proteção satisfatória em coelhos nem em bovinos frente ao desafio com BoHV-5 (Spilki et al., 2004; Silva et al., 2006). Da mesma forma, outros estudos demonstraram uma redução do período de excreção viral e no título viral, porém esses trabalhos não conseguiram reproduzir a enfermidade clínica (encefalite) nos animais durante o desafio, o que compromete a interpretação dos resultados (Bratanich et al., 1991; Cascio et al., 1999). Del Médico Zajac et al. (2006) analisaram a imunogenicidade e a eficácia de vacinas inativadas de BoHV-1 e de BoHV-5 frente um desafio com BoHV-5. Ambas as vacinas induziram uma resposta imune humoral e celular similares. Entretanto, apesar dos animais apresentarem uma proteção parcial – evidenciada pela redução na excreção viral –, um terço deles apresentaram sinais clínicos de encefalite, demonstrando que a proteção conferida por tais vacinas foi insatisfatória. Estes achados ressaltam a necessidade de se continuar buscando vacinas eficazes contra infecções por BoHV-5, seja através da proteção cruzada de vacinas anti-

BoHV-1, seja pelo desenvolvimento de vacinas específicas anti-BoHV-5, para viabilizar alternativas de controle mais eficazes em áreas endêmicas.

Dessa forma, amostras virais com alterações gênicas, sejam recombinantes espontâneos ou manipulados geneticamente, têm sido usadas no desenvolvimento de vacinas (Franco et al., 2007; Brum et al., 2010; Kalthoff et al., *in press*; Campos et al., 2011), tanto como vacinas vivas, quanto como vacinas inativadas (van Oirschot et al., 1996). Foi demonstrado que herpesvírus gE negativos podem ser utilizados em vacinas diferenciais (Chowdhury et al., 1999; Van Engelenburg et al., 1994). Foi produzida recentemente uma amostra de BoHV-5 com uma alteração na região US do vírus, da qual foram deletados os genes que codificam as glicoproteína gE e gI e a proteína de membrana US9 (Franco et al., 2007). Ao ser testado em coelhos, esse vírus recombinante apresentou uma redução, porém não abolição completa, de neurovirulência (Silva et al., 2009). Como forma de aprimorar esses resultados, foi proposta a produção de um vírus recombinante a partir dessa amostra de BoHV-5, na qual seria inserida uma alteração no gene UL49.5. É esperado que um vírus com essas alterações seja um bom candidato vacinal, pois além de incorporar um marcador sorológico, deverá produzir uma melhor resposta imune celular no hospedeiro (Jones & Chowdhry, 2010),

2.7 Evasão do sistema imunológico por herpesvírus

Vertebrados desenvolveram defesas baseadas em barreiras físicas e em um sistema de resposta ao ataque altamente específico, o qual pode ser

divido em duas frentes: imunidade inata – composta por macrófagos, granulócitos, células “Natural Killer” (NK) e fatores humorais, como a lisozima e a proteína C reativa – e imunidade adaptativa – formada por linfócitos T (LT) e B (LB), células capazes de efetuar uma resposta antígeno-específica e de sofrer uma expansão clonal. Para completar as defesas, ainda são produzidas, durante uma infecção, células de memória que permitem respostas rápidas em episódio de infecção recorrente (Schölz & Tampé, 2005).

A presença das partículas dos herpesvírus é percebida pelo sistema imune dos mamíferos através dos receptores de reconhecimento de padrões patogêno-associados (PRRs), que reconhecem proteínas essenciais e ácidos nucleicos específicos de vírus (Akira et al., 2006). A detecção de padrões moleculares patogêno-associados aciona as rotas de sinalização do sistema imune inato intracelular (Honda e Taniguchi, 2006; Moynagh, 2005). Essas modulam as respostas subsequentes através da produção de citocinas e de quimiocinas – moléculas cuja função é recrutar e ativar células do sistema imunológico –, e também de moléculas co-estimulatórias de LT (Griffin et al, 2010).

Os mecanismos utilizados para a evasão viral foram desenvolvidos baseados nas respostas à infecção promovidas pelo hospedeiro. Grandes quantidades do genoma dos herpesvírus são destinadas a codificar proteínas que bloqueiam o sistema imune inato e adaptativo do hospedeiro, em diversas instâncias. Uma gama de funções virais é codificado pelos herpesvírus para desviar reações, tanto a nível celular quanto sistêmico, à presença e expressão dos genes virais. Na célula, por exemplo, os vírus bloqueiam a indução de

morte programada, subvertem a ativação da via de sinalização do PRR, inibem a ativação da via do interferon e de quimiocinas. Todos essas são importantes mecanismos celulares responsáveis por impedir a disseminação de uma infecção. Muitos vírus ainda expressam “viroquinas”, isto é, moléculas que agem como citocinas virais (como a Interleucina 10), contra-atacando o estado antiviral da célula (Roizman & Pellet, 2001; Griffin et al., 2010).

No organismo, a resposta é altamente variável, especialmente de acordo com as células, nas quais o vírus se replica. Nesse ponto a resposta varia de um bloqueio na apresentação de antígenos na superfície das células antigênicas ao mimetismo molecular, no qual proteínas virais executam algumas funções de imunorreguladores celulares. Uma consequência comum é o atraso na eliminação de células infectadas – tempo suficiente para permitir a replicação viral, a colonização do hospedeiro e a transmissão de vírus para outro indivíduo. A diversidade de abordagens é um testemunho marcante tanto da profundidade quanto da complexidade das defesas do hospedeiro e da destreza adaptativa dos vírus (Roizman & Pellet, 2001; Griffin et al., 2010).

2.7.1 Apresentação de antígenos pelo MHC de classe I

A característica fundamental da resposta antiviral é o recrutamento de LT citotóxicos (LTC, também chamados de Linfócitos T CD8+), que possuem um papel chave na resposta imune adaptativa. Essas células reconhecem epitópos virais, expostos na superfície de células infectadas, por moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC I). As moléculas de MHC I são glicoproteínas de superfície presente em todas as células

nucleadas. Elas se ligam a peptídeos intracelulares e os expõem na superfície celular para reconhecimento dos LTC. É importante ressaltar que a via de apresentação de antígenos pelo MHC I é um importante ponto de defesa celular, que reconhece não apenas a presença de patógenos intracelulares, mas também alterações na própria célula. A Figura 2.5 ilustra os principais pontos dessa via (Chaplin, 2010).

A produção desses peptídeos começa no citosol. Durante a síntese proteica, parte da população de proteínas formadas é ubiquitinada e dirigida ao proteossoma, como forma de controle celular. O proteossoma é um complexo enzimático multicatalítico, responsável por clivar as proteínas em pequenos peptídeos. Ele tem sua atividade aumentada, quando a célula encontra-se em um estado antiviral, por estimulação do interferon γ (INF- γ), passando a chamar-se de imunoproteossoma. Os peptídeos formados são então transportados para o retículo endoplasmático (RE) (Griffin et al., 2010).

Para que os peptídeos sejam translocados para o lúmen do RE é necessária a ação da proteína transportadora associada com a apresentação de antígenos (TAP). A TAP pertence à família de transportadores ABC, isto é, proteínas que translocam uma variedade de substratos através de membranas por meio de hidrólise de ATP (transporte ativo). A TAP é formada por dois heterodímeros (TAP1 e TAP2), que são compostos por dois domínios transmembrana e dois domínios citosólicos de ligação nucleotídica. O mecanismo de ação desse transportador pode ser dividido em dois passos: (1) a ligação do peptídeo e (2) a translocação dependente de ATP do mesmo. A associação da TAP e do peptídeo é uma reação biomolecular inicial rápida,

seguida de uma lenta reorganização estrutural do complexo, durante a qual ocorre a translocação do peptídeo. A liberação do peptídeo induz à hidrólise de ATP nas duas subunidades da proteína. A TAP liga e transporta mais eficientemente peptídeos com tamanhos entre 8–16 e 8–12 aminoácidos, respectivamente, e com resíduo C-terminal básico ou hidrofóbico. Esse transportador fica localizado na membrana do RE e faz parte do complexo de carregamento de peptídeos (PLC) (Schölz & Tampé, 2005; Abele & Tampé, 2006).

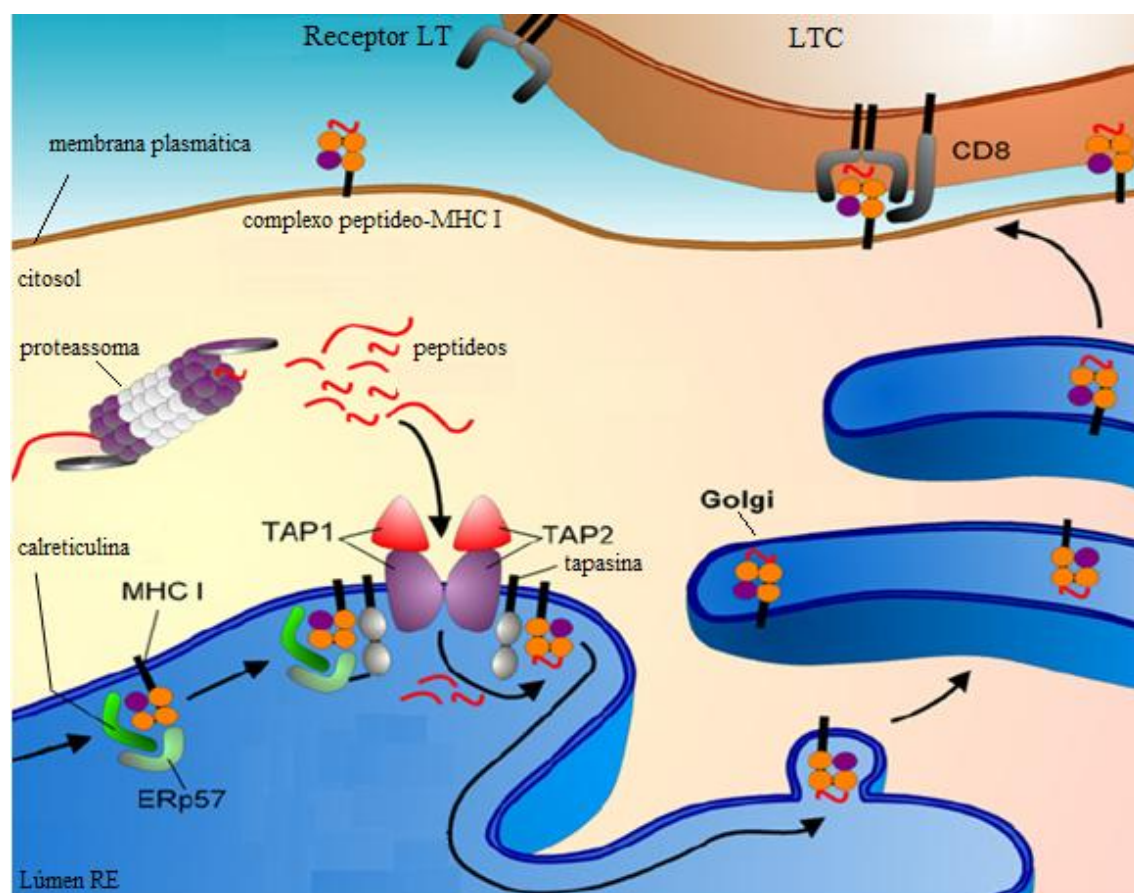


Figura 2.5. Via de apresentação de antígenos mediada por MHC I. Moléculas de MHC I são recrutadas pelo complexo de carregamento de peptídeos. Os peptídeos formados por degradação proteossomal são translocados do citosol para o lúmen do RE pela TAP. Lá, eles se ligam a molécula de MHC I (estabilizada pelas proteínas chaperonas tapasina, calreticulina e ERp57), tornando-a estável. O complexo peptídeo-MHC I é transportado através do Golgi para a superfície celular, onde o LTC pode fazer o reconhecimento do peptídeo. Abreviações: MHC-I, complexo principal de histocompatibilidade de classe I; TAP, transportador associado com apresentação de antígeno; RE, retículo endoplasmático; LTC, Línfocito T citotóxico (Adaptado de Abele & Tampé, 2006)

Uma vez dentro do lúmen do retículo endoplasmático (RE), moléculas novas de MHC I, compostas por uma cadeia pesada (HC) e β 2-microglobulina (β 2m), podem agora se ligar ao peptídeo. Essa reação é dirigida pelas proteínas chaperonas clareticulina, tapasina e Erp57 (que, em conjunto com a molécula de MHC e a TAP, formam o PLC) (Peaper & Cresswell, 2008). Com essa ligação, o complexo peptídeo-MHC I torna-se estável e pode ser transportado para a superfície celular, através da rede de vesículas do complexo de Golgi, onde será examinado pelos LTC (Griffin et al., 2010)

2.7.2 Evasão da apresentação de antígenos por herpesvírus

A via de apresentação de antígenos é um dos principais alvos de proteínas virais de evasão do sistema imunológico. Moléculas expressas por herpesvírus afetam, direta ou indiretamente, virtualmente todos os pontos dessa via. Um mesmo tipo viral possui, em geral, diversas moléculas que interferem na apresentação dos antígenos virais, assegurando, dessa forma, o sucesso da infecção viral (Loch & Tampé, 2005; Hansen & Bouvier, 2006, Griffin et al., 2010).

São muitos os exemplos de proteínas de herpesvírus que comprometem a apresentação de antígenos virais pelas células infectadas (Figura 2.6). A proteína M27 do MCMV interfere a sinalização do INF- γ , bloqueando a formação do imunoproteossoma. As proteínas EBNA1 e a LANA-1, respectivamente do EBV e do KSHV, previnem sua própria degradação proteossomal e, assim, também limitam a geração de antígenos virais. As proteínas de desligamento da síntese protéica do hospedeiro (*host shutoff*

proteins – UL41 do HSV, BGLF5 do EBV e SOX do KSHV) degradam mRNAs do hospedeiro, incluindo o mRNA da molécula de MHC I. Essa molécula também é o alvo das proteínas US2, US11 (HCMV) e mK3 do (MCMV), que dirigem o MHC para o citosol, onde ele é degradado (Griffin et al., 2010).

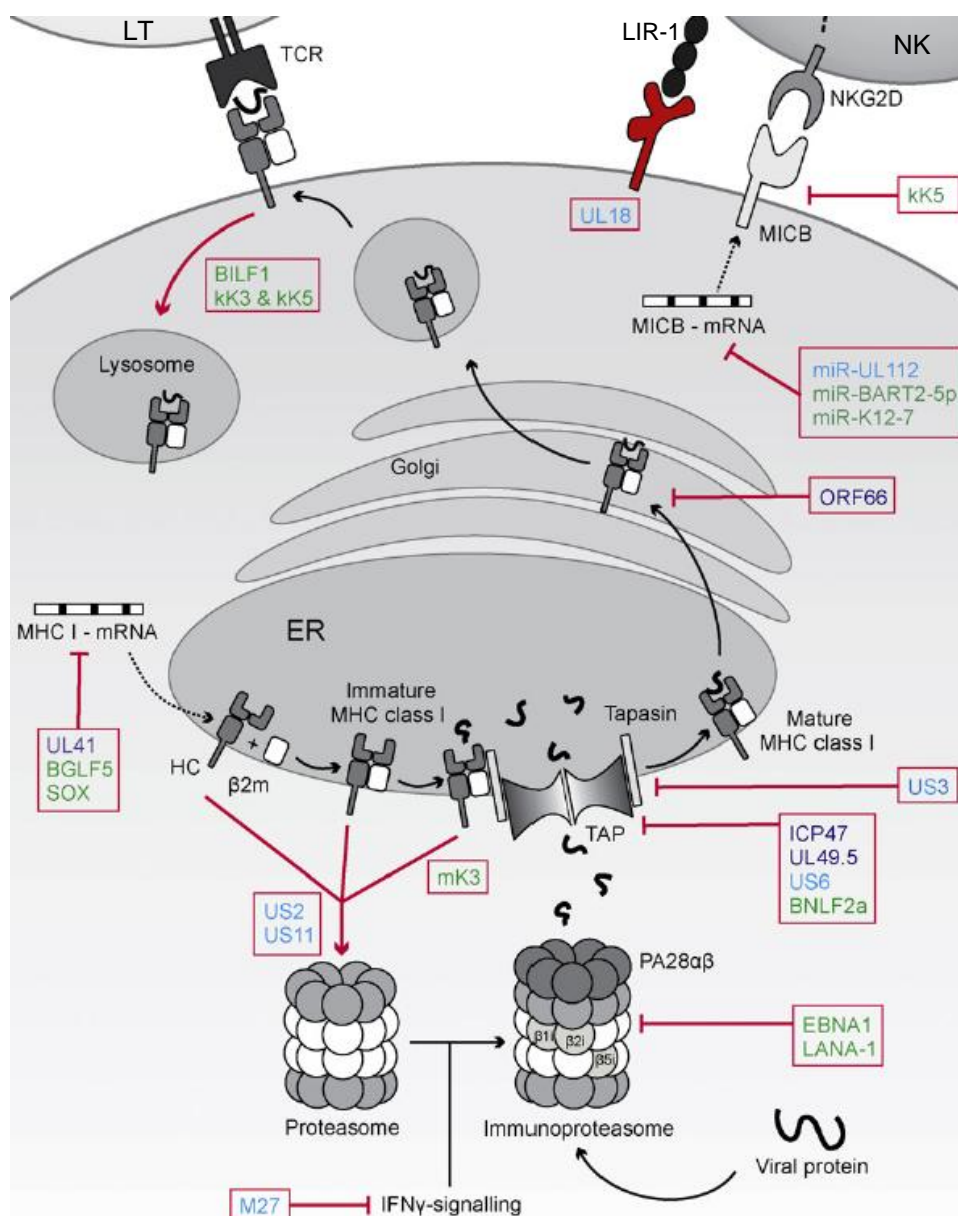


Figura 2.6 Interferência de herpesvírus na via de apresentação de antígenos mediada por MHC I. Produtos de genes de herpesvírus inibem todos os pontos da apresentação de antígeno na célula hospedeira, desde a sinalização por interferon- γ , que induz à formação do imunoproteossoma ao transporte do complexo maduro peptídeo-MHC I à superfície celular. Sinais inibitórios: traços vermelhos. Os nomes das proteínas virais estão representados em roxo (α -herpesvíruses), azul (β -herpesvíruses) e verde (γ -herpesvíruses). Abreviações: INF- γ , interferon γ ; HC, cadeia pesada; β 2m, β 2-microglobulina; TAP, transportador associado com apresentação de antígeno; ER, retículo endoplasmático; LT, Linfócito T citotóxico; TCR, receptor do Linfócito T; NK, natural killer (Adaptado de Griffin et al., 2010)

A proteína transportadora TAP é alvo de muitas proteínas de herpesvírus, incluindo a ICP47 (HSV), a UL49.5 (varicelovirus), US6 (HCMV) e BNLF2a (EBV). O bloqueio da tapasina é realizado pela US3 (HCMV), provocando um bloqueio no controle de qualidade de carregamento dos peptídeos. A ORF66 (VZV) retém o complexo maturo do MHC I na rede cis/medial do complexo de Golgi. As moléculas de MHC I que alcançam a superfície celular podem ser direcionadas ao lisossomo pelas proteínas BILF1 (EBV), kK3 e kK5 (KSHV). A proteína kK5 pode também direcionar, para degradação proteossomal, o receptor celular MICB, que é reconhecido pelas células NK. Outra forma de impedir a ação das células NK, empregada por diversos herpesvírus (HCMV, EBV, KSHV), é a expressão de microRNAs que silenciam a expressão do receptor MICB ou de ligantes para o receptor LIR-1 da própria NK, impedindo sua ativação (Griffin et al., 2010).

2.7.2.1 Inibidores da TAP

Células com a TAP inibida, ou não funcional, apresentam uma drástica redução da expressão de moléculas de MHC I na superfície celular, que causa uma diminuição transitória da sensibilidade dos LTC em identificar alterações nessa célula. Os herpesvírus desenvolveram uma gama de proteínas que interferem diretamente no funcionamento da TAP. Já foram descritas a presença de inibidores da TAP em diversos vírus, entre os quais HSV, EBV, HCMV, BoHV-1, EHV-1 e 4 (*Equid herpesvirus* 1 e 4, herpesvírus de cavalos), SuHV-1 (*Suid herpesvirus* 1, o vírus da pseudorraiva), MuHV-4 (*Murid herpesvirus* 4), McHV-3 (citomegalovírus de Rhesus, *Macacine herpesvirus* 3), McHV-4, GoHV-1 (herpesvírus de gorila, *Gorilline herpesvirus*

1), e PnHV-1 (herpesvírus de chimpanzé, Panine herpesvirus 1) (Koppers-Lalić et al., 2005; Griffin et al., 2010). É interessante observar que essas moléculas utilizam diferentes estratégias para impedir o funcionamento da TAP, mesmo entre moléculas da mesma família e em vírus proximamente relacionados.

2.7.2.1.1 Proteína UL49.5

A UL49.5, também chamada de glicoproteína N, está virtualmente presente em todos os herpesvírus – seu gene pertence ao grupo de genes fundamentais. É uma proteína transmembrana tipo I, presente no envelope da partícula viral. Ela está envolvida no processo de fusão de membranas, durante o processo de maturação da partícula viral, ação esta que exerce em conjunto com a glicoproteína M (UL10). Entretanto, nos últimos anos, caracterizou-se uma segunda função para a UL49.5 (Koppers-Lilac et al., 2005; Koppers-Lilac et al., 2008).

Em alguns vírus do gênero *Varicellovirus*, a UL49.5 age também como uma proteína de evasão do sistema imune do hospedeiro, inibindo a função da TAP e, assim, diminuindo a expressão de moléculas de MHC na superfície celular. É possível que essa função tenha sido adquirida por todos os varicelovírus, mas alguns perderam essa capacidade durante a evolução. Através de uma reação de dois passos, que impede a importação de peptídeos para o RE, as UL49.5 dos varicelovírus mantêm a TAP em um estado de translocação incompetente. Notavelmente, o mecanismo de ação entre as proteínas que compartilham essa função não é conservado, mas vírus dependente. A UL49.5 de BoHV-5 desestabiliza a TAP e reduz os níveis da

mesma, enquanto que a do EHV-1 inibe a ligação do ATP na proteína transportadora. Já em SuHV-1 foi demonstrado que a UL49.5 pode agir de diferentes maneiras de acordo com a célula (Koppers-Lilac et al., 2008; Deruelle et al., 2009). Outros varicelovírus que compartilham a função de inibição da TAP pela UL49.5 são os herpesvírus de búfalo, de cervídeo, de felino e de canino parcialmente (Verweij et al., 2010b).

Devido ao importante ponto de adaptação à resposta imunológica em que a UL49.5 interfere, ela abre um leque de possibilidades de aplicações. Ela pode ser desde uma boa candidata para vacinas diferenciais, até um excelente agente quimioterápico para cânceres ou doenças auto-imunes. (Verweij et al., 2008).

a) UL49.5 de BoHV-1

A UL49.5 de BoHV-1 foi identificada por Liang et al. (1993), durante um estudo de identificação de outro gene viral, como uma proteína não essencial para o crescimento do vírus em cultivo celular. Foi descrita como uma proteína de membrana tipo I, não glicosilada, que é expressa no envelope viral e em células infectadas como monômeros, homodímeros ligados por ponte dissulfeto e heterodímeros ligados por ponte dissulfeto com a proteína viral de membrana glicoproteína M (gM) (Liang et al, 1993; Wu et al.,1998). Ela é composta por 96 aminoácidos e pode ser dividida em quatro regiões: um peptídeo sinal N-terminal de 22 aminoácidos, que é clivado; um domínio luminal do retículo endoplasmático com 32 aminoácidos; uma região transmembrana de 25 aminoácidos; e uma cauda citosólica C-terminal de 17

aminácidos (Liang et al., 1996). A localização celular da UL49.5 varia de acordo com a função exercida. Ela pode estar associada ao RE, onde age como inibidora da TAP. Ela pode estar interagindo com a gM, guiando sua maturação, ou associada ao Golgi, onde provavelmente é adicionada a partícula viral nascente, uma vez que ela é encontrada no envelope viral (c.f.UniProt^a).

A UL49.5 mantém a função de evasão do sistema imune, mesmo na presença da gM. Para a maturação da gM, é necessário que ocorra uma interação com a UL49.5. A ligação entre as duas proteínas impede que a UL49.5 exerça sua função de inibição da TAP. Entretanto, durante a infecção parece haver proteínas o suficiente para manutenção das duas funções. Além disso, a cinética de expressão das duas proteínas difere amplamente durante a infecção. Enquanto que a gM é uma proteína tardia, a UL49.5 é uma inicial (*early*) e continua sendo expressa ao longo da infecção (Lipinska et al., 2006).

A inibição do carregamento de peptídios no MCH I pela UL49.5 de BoHV-1 é devida exclusivamente a interação da UL49.5 com a TAP (Verweij et al., 2008). A expressão da UL49.5 reduz os níveis da TAP em um estado estável. A UL49.5 age através de dois mecanismos: ela impede o transporte de peptídeos pela TAP e ela marca a TAP para degradação proteossomal. Para a primeira função, o domínio da luminal do RE e o domínio transmembrana interagem com o complexo da TAP e impedem a conformação transicional da TAP, isto é, a abertura do poro, a translocação do peptídeo e o fechamento do poro. Esse ciclo é fundamental para reação ATP-dependente de translocação do peptídeo. De fato, esses dois são responsáveis por uma eficiente interação

entre UL49.5 e TAP (Verweij et al., 2010a). Na função de degradação, a região determinante é a cauda citosólica C-terminal da proteína, especificamente os últimos dois aminoácidos. A cauda citoplasmática da UL49.5 vincula o complexo UL49.5-TAP à via de degradação proteossomal por ubiquitinação, dessa forma, a UL49.5 acaba também sendo degradada. A mesma sequência motivo da cauda envolvida na degradação, também é requerida para uma inibição eficiente da TAP, e uma região luminal da proteína também exerce um papel crucial nesse processo de degradação, indicando que a UL49.5 age de uma forma completa sobre a TAP (Koppers-Lilac et al., 2005; Loch et al., 2008; Verweij et al., 2010a). A UL49.5 de BoHV-1 não bloqueia a ligação de peptídeos nem de ATP na TAP (Koppers-Lilac et al., 2005).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Detecção de BoHV-1 e 5 em amostras de sêmen

3.1.1 Amostras de sêmen

Foram obtidas 53 amostras de sêmen fresco, provenientes de touros de duas propriedades: uma propriedade da cidade de Rio Pardo (Rio Grande do Sul, Brasil) (n=34) e uma propriedade próxima à cidade de Goianópolis (Goiás, Brasil) (n=19). Também obteve-se 23 amostras de sêmen em palheta de um centro de inseminação artificial no estado Rio Grande do Sul. Os touros do centro de inseminação artificial tinham idades entre três e sete anos, enquanto que a idade dos animais das outras duas propriedades variava entre dois e três anos. Os touros da propriedade gaúcha eram de raças europeias (Angus, Hereford e Holstein); já os touros da propriedade do estado de Goiás eram da raça Nelore (zebuínos). Não estavam disponíveis dados sorológicos de nenhum dos touros, dos quais se obtiveram as amostras de sêmen; entretanto, nenhum deles apresentava sinais clínicos de infecção por BoHV.

3.1.2 Extração de DNA

A extração de DNA do sêmen fresco e em palheta foi realizada segundo van Engelenburg et al. (1993) e Smits et al. (2000) com pequenas modificações. Brevemente, 50 µL de sêmen foram centrifugados (Centrífuga

Eppendorf 5415C) a 8500 x g por 10 min. Ao sobrenadante de cada amostra foram adicionados 150 µL de TE [Tris 10 mM, pH 7,5 (Invitrogen); EDTA 1 mM (Invitrogen)] e uma solução de lise, contendo 22 µL dodecilsulfato de sódio (SDS 10 %, Promega), 0,5 µL de RNA transportador (10,3 mg/mL, Sigma), 1 µL de proteinase K (20 mg/mL, USB Corporation) e 200 moléculas de controle interno (CI) plasmidial (Campos et al., 2009). Os tubos foram incubados a 37 °C por 1 h. A extração de DNA foi realizada pela adição de um volume de fenol tamponado (pH 8,0, Invitrogen) e 13 µL de NaCl (5 M, Nuclear), seguida de uma incubação à temperatura ambiente por 30 min. Subsequentemente, foi realizada uma centrifugação a 8500 x g por 12 min e 0,6 volumes de isopropanol (Pro-Analysis) foram adicionados ao sobrenadante. Após uma incubação a -20 °C durante 30 min, as amostras foram novamente centrifugadas a 8500 x g por 20 min. Os sedimentos de cada amostra foram ressuspensos em 100 µL de TE e 1 mL de n-butanol (Vetec) foi adicionado. Depois de agitação vigorosa, as amostras foram centrifugadas a 8500 x g por 10 min. Deixou-se o álcool evaporar à temperatura ambiente e o *pellet* foi ressuspensionado em 50 µL de TE.

3.1.3 Reações em cadeia da polimerase nested (nPCRs)

As nPCRs foram realizadas como descrito por Campos et al. (2009). Na Figura 3.1 há uma representação esquemática das reações. Em resumo, para a primeira PCR, foram utilizados oligonucleotídeos que reconhecem tanto o gene UL44 de BoHV-1 quanto o de BoHV-5, produzindo fragmentos, respectivamente, de 575 pares de base (pb) e 572 pb. Em cada reação, foram adicionadas 200 moléculas de CI, para detecção de reações falso-negativas. O

CI é um plasmídeo, que contém a região alvo de amplificação de BoHV-1 com uma deleção interna de 135 pb, mas que permanece com sítios de anelamento dos oligonucleotídeos intacto. O CI resulta em um produto com tamanho de 440 pb. Para identificar reações falso-positivas, três controles negativos foram adicionados a cada conjunto de 12 reações. Os controles negativos foram utilizados como amostras, isto é, eram amostras com 50 ng de DNA total de bovino negativo para BoHV. As PCRs foram realizadas no termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf), e os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5 % (Invitrogen), corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL, Promega) e comparados com pUC19 clivado com *Hinf*I (New England Biolabs) como marcador de peso molecular.

Para diferenciar amostras positivas para BoHV-1 e/ou para BoHV-5, os produtos da primeira PCR foram utilizados em duas nPCRs espécie-específicas, como descrito por Campos et al. (2009). Essas nPCRs amplificam fragmentos de 161 pb para BoHV-1 e de 236 pb para BoHV-5.

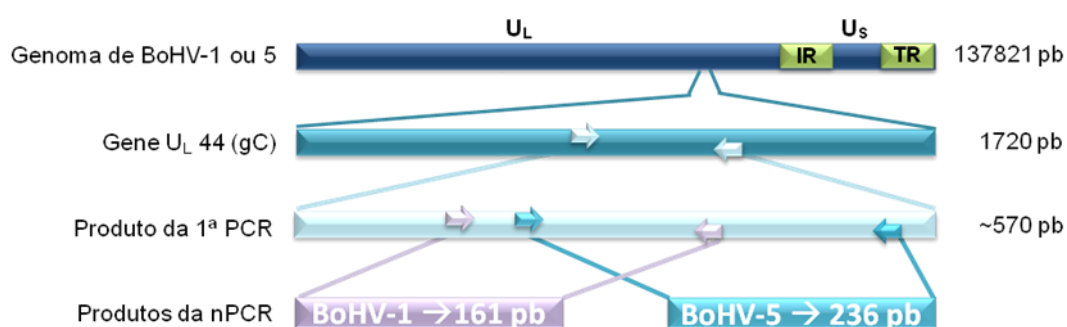


Figura 3.1. Representação das reações de amplificação da nPCR para detecção de DNA BoHV-1 e 5. A primeira reação amplifica parte do gene *UL44* de BoHV-1 ou 5, produzindo um fragmento de aproximadamente 570 pb para ambos os vírus. Para a diferenciação dos tipos virais, são realizadas reações independentes, com oligonucleotídeos específicos para cada tipo viral, utilizando como DNA molde o produto da primeira PCR. As setas simbolizam os oligonucleotídeos utilizados. Abreviações: UL, Componente L do genoma; Us, Componente S; IR, região invertida repetida; TR, região terminal repetida; gC, Glicoproteína C; (n)PCR, (nested) reação em cadeia da polimerase; pb, pares de base.

3.1.4 Cultivo celular

Células de rim de bovino Madin Darby resistentes a BVDV (CRIB) (Flores & Donis, 1995) foram mantidas em Meio Essencial Mínimo de Eagle (EMEM, Gibco), suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB, Gibco) e antibióticos [anfotericina B, 2,0 µg/mL, (Cristália); enrofloxacina, 10 µg/mL (Baytril®, Bayer); e gentamicina, 50 µg/mL (Gentamax®, Marcolab)], em uma atmosfera úmida a 37 °C com 5% de CO₂.

3.1.5 Isolamento viral

O isolamento viral foi realizado seguindo o protocolo estabelecido pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE – World Organization for Animal Health). As amostras de sêmen foram diluídas em 90 % SFB (Gibco), suplementado com anfotericina B (2,0 µg/mL, Cristália), enrofloxacina (10 µg/mL, Baytril®, Bayer) e gentamicina (50 µg/mL Gentamax®, Marcolab). Amostras previamente preparadas foram adicionadas em quadruplicata em placas de cultivo celular de 96 poços preparadas, com 24 h de antecedência, com células CRIB. De cada amostra, 50 µL foram adicionados por poço. As placas foram incubadas por 1 h a 37 °C para adsorção viral. Subsequentemente, as monocamadas foram gentilmente lavadas duas vezes com 100 µL de Meio Essencial Mínimo de Eagle (EMEM, Gibco), suplementado com 5 % de SFB e antibióticos, como descrito anteriormente. Por fim, para a manutenção das células, foram adicionados 100 µL de meio novo por poço. As placas foram então incubadas por 72 h a 37 °C em uma atmosfera com 5 % de CO₂ (Forma Scientific). Poços falsamente inoculados – utilizando apenas

EMEM – foram usados como controles negativos, seguindo o mesmo protocolo. As monocamadas de células CRIB inoculadas foram examinadas e comparadas com as células do controle negativo para a presença de efeito citopático (ECP). Quando não era possível visualizar o ECP, as placas eram congeladas e descongeladas e o meio de cultivo celular era coletado e inoculado em novas placas de cultura celular. Se nenhum ECP era observado depois de três passagens cegas, a amostra era considerada negativa.

3.1.6 Purificação de DNA viral e análise de restrição enzimática

As sete primeiras amostras que apresentaram ECP foram submetidas à purificação do DNA viral, para confirmar a presença de BoHV e determinar a espécie através da análise de restrição enzimática (REA) do DNA viral (BoHV-1 ou BoHV-5). A recuperação do DNA viral de BoHV-1 ou 5 a partir de células infectadas foi realizada como descrito por Green et al. (1971) e Pignatti et al. (1979), com modificações. Cada amostra foi inoculada em uma monocamada confluyente de células CRIB em uma garrafa de cultivo celular de 75 cm² (TPP). Quando o ECP era evidente em cerca de 90 % da monocamada, o sobrenadante foi removido e o restante das células infectadas foi tratado com 5 mL de 2,5 % de tripsina (Gibco) e incubado a 37 °C por 5 min. A tripsina foi então coletada cuidadosamente de maneira que as células não se rompessem. A seguir, 5 mL de tampão salina fosfato [PBS (8,55 g de NaCl (Nuclear), 1,84 g de Na₂HPO₄·2H₂O (Vetec), 0,26 g de NaH₂PO₄·H₂O (Nuclear), H₂O q.s.p.1000 mL, pH 7.2)] foram adicionados à garrafa de cultura celular para remover células residuais. Os dez mililitros de células (5 ml de tripsina e 5 ml de PBS) foram centrifugados por 10 min a 1000 x g (Cintec CT 5000) e os *pellets*

resultantes foram tratados com dois mL de tampão de lise [Tris-Cl 100 mM (Invitrogen) pH 7,9; EDTA 100 mM (Invitrogen); Triton X-100 0,25 % (Roche Diagnostics Brasil Ltda.)]. Então essa solução foi gentilmente misturada e incubada por 10 min à temperatura ambiente e NaCl (0,2 M) foi adicionado. Após, essa solução foi centrifugada por 10 min a 1000 x g para que os núcleos celulares formassem um sedimento. Ao sobrenadante, foram adicionados 5 µL de proteinase K (20 mg/mL, USB Corporation) e 40 µL de SDS 10 %, alcançando uma concentração final de 50 µg/mL e 0,2 % respectivamente. O material foi incubado por 1 h a 56 °C e procedeu-se depois a extração de DNA com fenol e precipitação do DNA com isopropanol. O sedimento obtido foi ressuspenso em 10 µL de TE pH 7,4 e foram adicionados 3 µL de RNase (20 mg/mL, Qiagen Inc.). Após uma incubação a 37 °C por 15 min, 1 µg foi utilizada para a clivagem com a enzima *HindIII* (New England Biolabs), segundo as instruções do fabricante. As clivagens foram analisadas por meio de uma eletroforese de 18 h a 20 V em gel de agarose 0,7 % (Invitrogen), corado com brometo de etídio (0,5 µL/mL). Lambda DNA (Promega) clivado com *HindIII* foi utilizado como marcador de peso molecular.

3.2 Mutação do gene UL49.5 em uma amostra recombinante de BoHV-5

3.2.1 Vírus e células

Células Mardin-Darby de rim de bovino (MDBK, ATCC CCL-22) ou células CRIB foram utilizadas para multiplicação e titulação viral. Outros cultivos primários de embrião de bovino – células de testículo (EBT), células de

pulmão (EBL), células de rim (EBK) e células de traquéia (EBTr) – e uma linhagem celular – células de rim de macaco verde (VERO, ATCC CCL-81) – foram utilizadas para a realização das transfecções. As culturas celulares foram mantidas em EMEM, suplementado com SFB e antibióticos (anfotericina B, 2,0 µg/mL; enrofloxacina, 10 µg/mL; e gentamicina, 50 µg/mL), em uma atmosfera úmida a 37 °C com 5 % de CO₂. O vírus BoHV-5 EVI88/95 gE⁻, gI⁻ e US9⁻ (Franco et al., 2007) foi utilizado como linhagem parental para a construção do vírus recombinante.

3.2.2 Vetores plasmídeos

Foram utilizados quatro plasmídeos no presente trabalho: pBR322_BoHV-5*Bam*HIA, pVR1012+eGFP, pVBIC e pCR2.1. O pBR322 é um plasmídeo de 4,3 Kb e de baixo número de cópias, que contém os genes de resistência aos antibióticos ampicilina e tetraciclina. Nesse plasmídeo, foi inserido o fragmento A de BoHV-5 EVI88/95 clivado com de *Bam*HI (18 Kb), sendo chamado a partir de então de pBR322_BoHV-5*Bam*HIA. O plasmídeo pVR1012 contém o promotor *immediate early* do citomegalovírus humano (CMV ie1/2) , um sítio múltiplo de clonagem, seguido da região de terminação de transcrição do gene do hormônio de crescimento bovino (Schrijver et al., 1998). O plasmídeo pVR1012+eGFP contém o gene da eGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) no sítio múltiplo de clonagem, enquanto o plasmídeo pVBIC contém o gene *bICP0* de BoHV-1 nessa mesma região. O pCR2.1 (Invitrogen) é um vetor comercial de 3,9 Kb e contém os genes de resistência à ampicilina e à canamicina e também um sítio múltiplo de clonagem no meio do gene *LacZα*.

3.2.3 Extração de DNA viral

Células MDBK, cultivadas em garrafas de 125 cm², apresentando 90 % de confluência, foram infectadas com o vírus BoHV-5 EVI 88/95 gE⁻, gI⁻ e US9⁻ (Franco et al., 2007). Quando o ECP típico de herpesvírus estava presente em 90 % da monocamada celular, o sobrenadante foi clarificado a 1411 x g por 20 min e ultracentrifugado a 100.000 x g por 2 h a 4 °C (Sorvall *AH 629, rotor OTD Combi*). O sedimento viral foi ressuscitado em 200 µL de TE e tratado com 1 µL de RNase (20 mg/mL) por 30 min a 37 °C. Após, foi adicionado 200 µL de TEN 2x [Tris-HCl 20 mM, pH 7,4; EDTA 2 mM, pH 8,0; NaCl 300 mM (Nuclear)], 2 µL de proteinase K (20 mg/mL) e 40 µL de SDS 10 % e deixou-se o material sob agitação por 1 h a 37 °C. O DNA viral foi extraído com um volume de fenol tamponado e NaCl em uma concentração final de 0,3 M. Após o material ficar 1 h sob agitação a 37 °C, realizou-se uma centrifugação por 30 min a 16162 x g e, à fase aquosa, foi adicionado 0,6 volumes de isopropanol (Pro-Analysis). Depois de uma incubação *overnight* a -20 °C, a solução foi centrifugada por 30 min a 16162 x g e o sedimento foi ressuscitado em 30 µL de TE.

3.2.4 Construção do cassete de deleção

A região do genoma de BoHV-5, que contém o gene UL49.5, foi clonada em um plamídeo para a construção do cassete de deleção, utilizando-se métodos padrões (Sambrook & Russel, 2001). A estratégia de deleção escolhida foi a inserção de uma mutação no gene alvo, através de uma PCR de fusão, que acarreta em uma tradução errada da proteína. Para a seleção dos

vírus recombinantes, foi adicionado ao cassete de deleção, como gene repórter, o cassete de expressão da proteína verde fluorescente (eGFP), que está sob o domínio do promotor CMV ie1/2 e da região terminadora do hormônio de crescimento bovino. As Figuras 3.2 e 3.4 mostram uma representação geral da estratégia utilizada para construção do cassete de deleção.

3.2.4.1 Clonagem do fragmento *Mlu*E contendo a região da UL49.5

O plasmídeo pBR322 contendo o fragmento *Bam*HIA do DNA de BoHV-5 EVI 88/95 (Franco et al., 2007) foi clivado com a endonuclease de restrição *Mlu*I (New England Biolabs) a 37 °C, conforme as instruções do fabricante. O fragmento *Mlu*E de 1,9 Kb foi purificado, após eletroforese em gel de agarose a 0,7 % (Invitrogen), com o Kit Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Kit GFX, GE Healthcare) e submetido a um tratamento com Klenow (Amersham) a 37 °C, como indicado pelo fabricante. A reação foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 0,7 % e purificada (com Kit GFX). O fragmento com extremidades cegas de 1,9 Kb resultante foi clonado no plasmídeo pCR 2.1 (Invitrogen), utilizando-se a enzima T4 DNA Ligase (New England Biolabs), conforme orientações do fabricante. O plasmídeo utilizado na ligação, pCR2.1 (Invitrogen), foi previamente linearizado no sítio da endonuclease de restrição *Eco*RV (Invitrogen) e tratado diretamente com Fosfatase Alcalina (CIAP, Promega), seguindo o protocolo do fabricante para desfosforilação de pontas cegas de DNA. A ligação foi transformada em células *Escherichia coli* DH5α competentes por choque térmico (42 °C por 1 min e 30

segundos). Após crescimento sob agitação a 37 °C por 1 h em caldo Luria Bertani [LB: 10 g de Triptona (Biobrás), 5 g de NaCl, 5 g de Extrato de Levedura (Biobrás), H₂O destilada - 1000 ml), a suspensão de bactérias foi semeada em Ágar LB com ampicilina (50 µg/mL, Invitrogen), contendo também 40 µL de Bluo-gal (20 mg/mL, Invitrogen) e 4 µL de IPTG (200 mg/mL, Invitrogen), e incubada por 18 h a 37 °C. A extração de DNA plasmidial das colônias brancas foi realizada pelo método de Lise Alcalina, como descrito por Sambrook & Russel (2001). Para determinar a orientação do fragmento clonado, os plasmídeos foram clivados com a endonuclease de restrição *Xho*I (New England Biolabs).

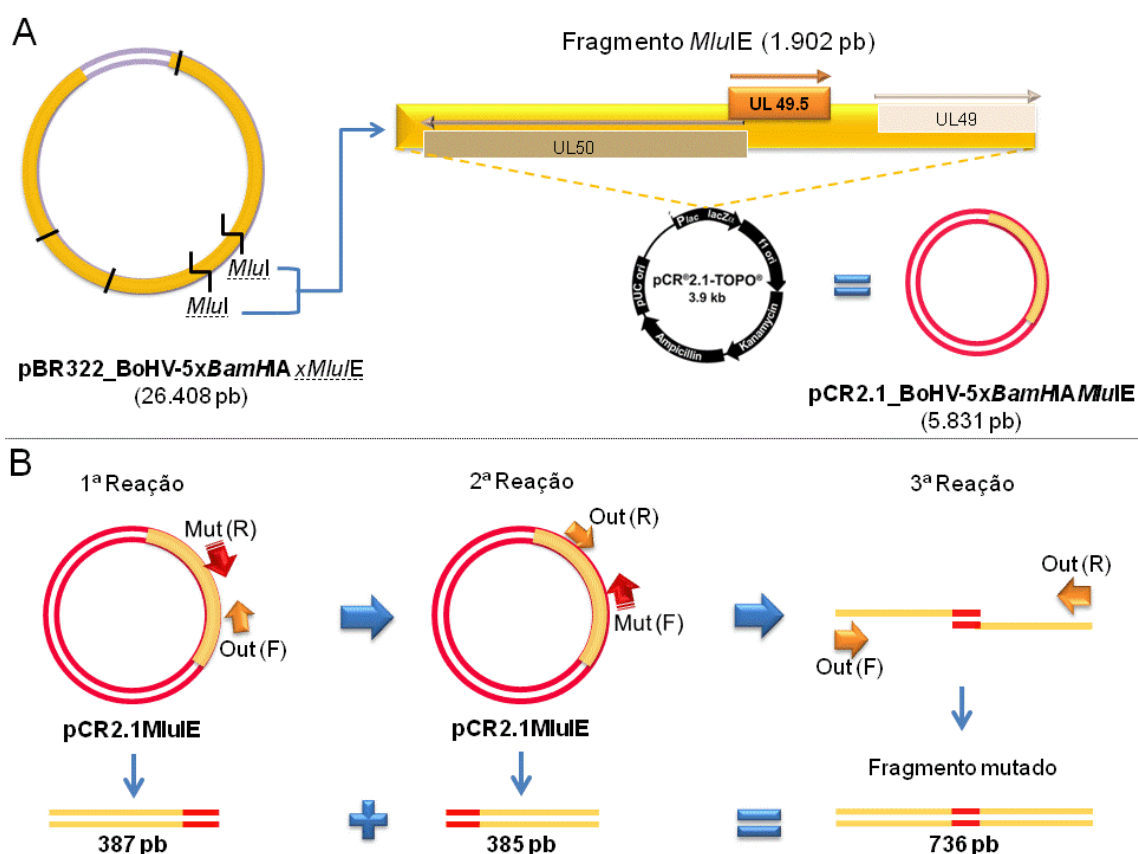


Figura 3.2 Construção do Cassete de Deleção 1: (A) clonagem do fragmento *MluIE*, em PCR 2.1 (B) PCR de fusão. Legenda: em negrito, os nomes dos plasmídeos; nomes das enzimas de restrição estão indicados com tracejado; as reações de clivagens estão indicadas por um “x” na frente do nome da enzima; traços pretos indicam sítios de restrição; retângulos UL50, UL49.5 e UL49 representam os genes de BoHV-5 e suas posições; setas em cima dos genes indicam o sentido de transcrição.

3.2.4.2 PCR de fusão

Para a o PCR de Fusão, oligonucleotídeos foram desenhados com base nas sequências de BoHV-5 disponíveis no GeneBank (Accession NC_005261). Através do uso de oligonucleotídeos que continham uma sequência diferente da original de BoHV-5, essa técnica permitiu a inserção de duas alterações na sequência do gene UL49.5. A primeira alteração foi a criação de um sítio de restrição enzimática de *EcoRV*, através da substituição de três citosinas por duas timinas e uma adenosina (9268C>T, 9269C>A e 9270C>A) – que também acarreta na alteração de um aminoácido na sequência da proteína (P23I) – e foi utilizado como alteração marcadora da presença da mutação. A segunda foi a inserção de uma guanina (9286-9287insG), ocasionando em uma alteração da fase de leitura durante a tradução da proteína UL49.5 (Figura 3.3).

- 1 ATGGTGCGCGGCCTTGA **CCC**CTTGCTGGACGCGAT (sequência original)
 - 2 ATGGTGCGCGGCCTTGA **TAT**CTTGCTGGACGCGAT **G** (iniciador mutado)
- 
- 3 MSRSLLVVLATAALFAMVRGLD **PLLDAMRREEAMDFWSAGCYARGVPLSEPPQA LV...(original)**
 - 4 MSRSLLVVLATAALFAMVRGLD **I LLDAMAARGSDGL L ERGVLRARGAALGAPA GPG...(mutado)**

Figura 3.3 Representação das alterações produzidas com o oligonucleotídeo MUT na PCR de fusão. (1) Parte da sequência nucleotídica da UL49.5 selvagem de BoHV-5. (2) Sequência do iniciador mutado usado na PCR. Em destaque, as três citosinas selvagens (CCC, em verde) trocadas por duas timinas e uma adenosina (TAT, em vermelho), formando o sítio de restrição GATATC (sublinhado em vermelho) da endonuclease *EcoRV*. A guanina (G, em vermelho) inserida na sequência através do iniciador mutado (2), responsável pela troca na fase de leitura da proteína selvagem (3). A partir da inserção da G, ocorrem trocas de aminoácidos (em vermelho) na proteína mutada (4) em relação aos aminoácidos (em verde) da proteína selvagens (3).

Para isso, foi utilizado na primeira reação um oligonucleotídeo que flanqueia o gene UL49.5, anelando do início do gene UL49 (Oligonucleotídeo Antisenso – 22 pb – PR OUT UL49.5 5'- AGGACCTGTGGAACCGGGCCAT - 3') e um que contém a alteração (mutado) e anela no início do gene da UL49.5

(Oligonucleotídeo Senso – 36 pb – PF MUT UL49.5 5'-ATGGTGCGCGGCCTTGATATCTTGCTGGACGCGATG -3'). A PCR foi realizada em reações de PCR de 25 µL, que utilizavam como DNA molde o plasmídeo pCR2.1 contendo o fragmento *Bam*HIA x *Mlu*IE de BoHV-5 e que continham 10 pMol de cada oligonucleotídeo (IDT), 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO, Acros Organics), 1 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 10 % do tampão de PCR (Invitrogen), 0,6 mM de deoxinucleosídeos trifosfatados (dNTPs – ABgene) e diferentes concentrações de MgCl₂ (0,5 mM; 1 mM; 1,5 mM; e 2 mM), para determinar a melhor condição de amplificação. As amplificações deram origem a um produto de 385 pb e foram executadas no termociclador Eppendorf, conforme as seguintes condições: 5 min a 94 °C; 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 65 °C e 30 segundos a 72 °C; 5 min a 72 °C. A segunda reação foi executada com um oligonucleotídeo que anela no terço iniciador do gene UL50 (Oligonucleotídeo Senso – 23 pb – PF OUT UL49.5 5'-ACAACGGCGCGCAGTTTTCCCTG -3') e o oligonucleotídeo mutado, porém no sentido antisenso (Inicador Antisenso – 36 pb – PR MUT UL49.5 5'-CATCGCGTCCAGCAAGATATCAAGGCCGCGCACCAT -3'). Foram realizadas reações de 25 µL, que utilizavam como DNA molde o plasmídeo pCR2.1 contendo o fragmento *Bam*HIA x *Mlu*IE de BoHV-5 e que continham 10 pMol de cada oligonucleotídeo (IDT), 10 % de DMSO, 1 U de Taq DNA Polimerase, 10 % do tampão de PCR, 0,6 mM de dNTPs e diferentes concentrações de MgCl₂ (0,5 mM; 1 mM; 1,5 mM; e 2 mM), para determinar a melhor condição de amplificação. Um produto de 387 pb foi amplificado executado as seguintes condições: 5 min a 94 °C; 30 ciclos de 30 segundos a

94 °C, 30 segundos a 65,4 °C e 30 segundos a 72 °C; 5 min a 72 °C. Por fim, foi realizada uma terceira reação, seguindo as mesmas condições da primeira PCR, porém utilizando como DNA molde os produtos amplificados nas duas reações anteriores e os oligonucleotídeos senso e antisenso OUT. Essa terceira PCR deu origem a um produto de 736 pb. Em cada PCR, os produtos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5 %, corado com brometo de etídeo, usando DNA 100 pb Ladder (Fermentas) como marcador de peso molecular.

3.2.4.3 Inserção da mutação

Para a substituição do fragmento original de BoHV-5 pelo produzido pelo PCR de Fusão, o produto amplificado na terceira reação e o pCR2.1 *Bam*HIA x *Mlu*IE foram clivados com a endonuclease de restrição *Hinc*II (New England Biolabs) a 37 °C, seguindo as instruções do fabricante (Figura 3.3A). Então foi realizada uma eletroforese em gel de agarose, para separação e purificação usando o Kit GFX (G.E., USA) dos fragmentos de interesse: o plasmídeo ao ser clivado com essa enzima libera um fragmento de 661 pb; já o produto de PCR, um fragmento de 662 pb. O vetor purificado, já com o inserto removido, foi submetido a uma reação com CIAP, seguindo o protocolo do fabricante para desfosforilação de pontas cegas de DNA. Foi procedida então a ligação entre produto de PCR mutado clivado e o vetor desfosforilado (com T4 DNA Ligase, conforme indicado pelo fabricante). A reação foi transformada em células de *E.coli* DH5 α competentes por choque térmico e, após crescimento sob agitação a 37 °C por 1 h em caldo LB, as células foram semeadas em Ágar LB com ampicilina (50 μ g/mL) e incubadas overnight a 37 °C. A extração de

DNA plasmidial das colônias foi realizada pelo método de Lise Alcalina (Sambrook & Russel, 2001). Para confirmar a presença do fragmento mutado (plasmídeo pCR2.1*Mlu*E_Mut), os clones foram submetido a clivagens com a enzima *Eco*RV e para confirmar que a orientação do fragmento permanecia igual à original, foram realizadas separadamente reações com as enzimas *Alu*I e *Hin*fl.

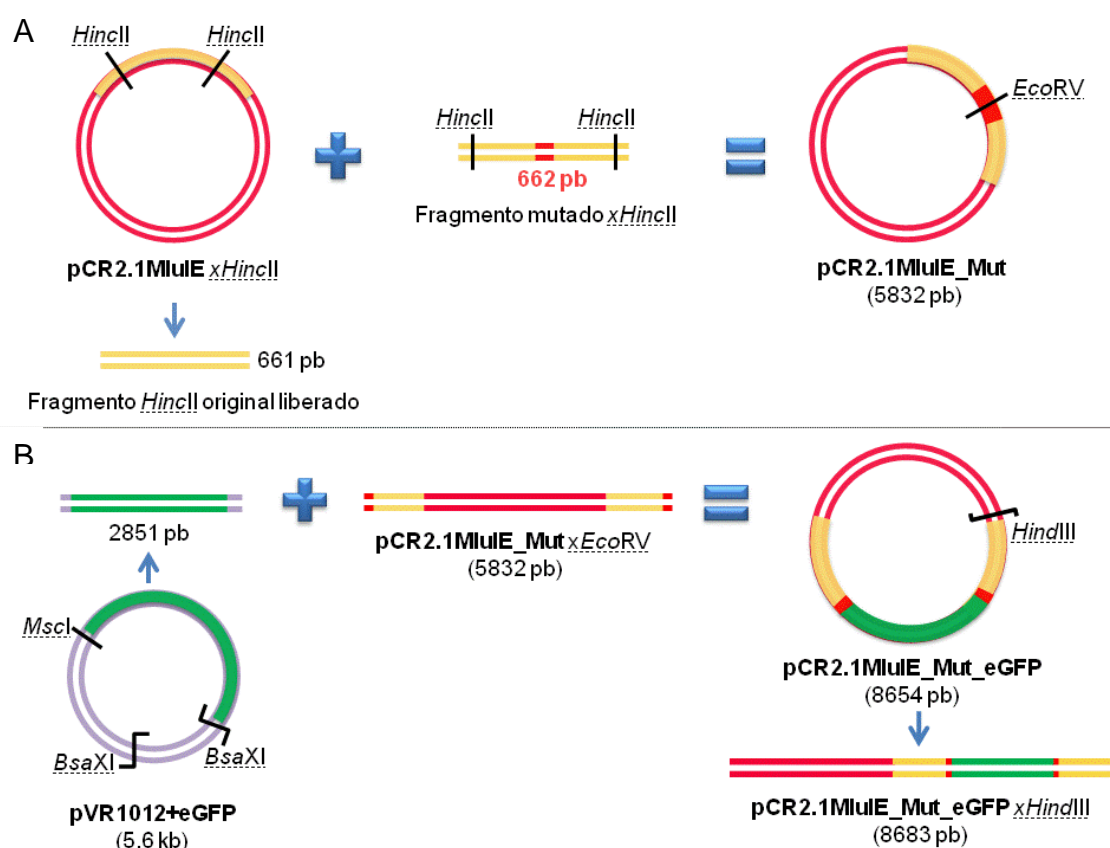


Figura 3.4 Construção do Cassete de Deleção 2: (A) inserção do fragmento mutado no PCR 2.1 *Mlu*E, (B) inserção do gene repórter e linearização do plasmídeo. Legenda: em negrito, os nomes dos plasmídeos; nomes das enzimas de restrição estão indicados com tracejado; as reações de clivagens estão indicadas por um “x” na frente do nome da enzima; traços pretos indicam sítios de restrição; ligações estão indicadas pelo símbolo “+”.

3.2.4.4 Inserção do cassete de expressão da eGFP

Para a inserção do cassete de expressão foi realizada uma clivagem dupla com as endonuclease de restrição *Bsa*XI e *Msc*I (New England Biolabs),

a 37 °C, segundo as instruções do fabricante, do plasmídeo pVR1012eGFP. Após eletroforese em gel de agarose 0,7 %, o fragmento de interesse de aproximadamente 2.8 Kb foi purificado (com Kit GFX) e tratado com Klenow (Fermentas), de acordo com as instruções do fabricante. O vetor pCR2.1MluE_Mut foi clivado com a enzima de corte cego *EcoRV* e tratado com CIAP (seguindo as instruções do fabricante). Com esses dois fragmentos de DNA foi realizada uma ligação *overnight* com a enzima T4 DNA Ligase (Promega) a 16 °C. A reação foi transformada em células *E.coli* DH5 α competentes por choque térmico e, após crescimento sob agitação a 37 °C por 1 h em caldo LB, as células foram semeadas em Ágar LB com ampicilina (50 μ g/mL) e incubadas *overnight* a 37 °C. A extração de DNA plasmidial das colônias foi realizada pelo método de Lise Alcalina (Sambrook & Russel, 2001). A presença do cassete de expressão da eGFP foi determinada por diferença de tamanho do DNA em eletroforese em gel de agarose 0,7 %. Para confirmar que a orientação da eGFP estava igual a do gene UL49.5, foi realizada uma clivagem com a endonuclease de restrição *SpeI* (New England Biolabs). Por fim, para realizar a linearização - necessária para as transfecções - do cassete de deleção, o plasmídeo foi clivado com a endonuclease de restrição *HindIII* (Promega) a 37 °C, como indicado pelo fabricante.

3.2.5 Transfecções

Duas técnicas de transfecção foram testadas: transfecção por Fosfato de Cálcio e o Kit Xfect™ Transfection Reagent (Clontech). Foram realizadas diversas variações de protocolo do método por Fosfato de Cálcio, a fim de se estabelecer uma melhor eficiência da técnica. Os testes de eficiência

e padronização foram realizados com o plasmídeo pVR1012, contendo o cassete de expressão da eGFP. Quando a técnica se mostrou eficiente para plasmídeos, de co-transfecções passaram a ser realizados com DNA de BoHV-5 EVI 88/95 e DNA plasmidial linearizado. DNA de Esperma de Salmão (Invitrogen) foi utilizado como DNA carreador nos testes. Para a obtenção do vírus recombinante, foram transfectados somente o DNA do BoHV-5 EVI 88/95 gE⁻, gI⁻ e US9⁻ e o cassete de deleção linearizado. Nas transfecções, foram sempre usadas células semeadas, em placas de seis poços, com 24 h de antecedência.

3.2.5.1 Transfecção por fosfato de cálcio

Primeiramente foram testadas três concentrações de DNA plasmidial (1 µg, 2 µg e 3 µg), para verificar a influência da concentração de DNA na eficiência da transfecção. Em cada um dos tubos de centrífuga de 1,5 mL foram adicionados 62,5 µL de 2 M CaCl₂ (Sigma – para obter uma concentração final de 125 mM), DNA de Esperma de Salmão (Invitrogen) (respectivamente, em relação a concentração de DNA plasmidial, 19 µg, 18 µg e 17 µg) e água destilada tamponada q.s.p. 500 µL. Para plena homogeneização, cada solução foi pipetada dez vezes. A mistura de DNA e CaCl₂ foi gotejada em tubos de centrífuga de 15 mL, contendo 500 µL de HBS 2x [1,4 mM Na₂HPO₄ (Vetec), 5 mM de Hepes (Sigma), 280 mM de NaCl (J.T.Baker)] sob moderada agitação. Os tubos ficaram incubados, no escuro, por 5 min à temperatura ambiente. Sobre os poços, cujo meio de cultivo celular havia sido trocado quatro horas antes por meio novo (EMEM, suplementado com 10 % de SFB e antibióticos), 166 µL da solução foram gotejados. Um poço

foi utilizado como controle negativo, no qual não se realizou transfecção, e as concentrações de 2 µg e 3 µg DNA plasmidial foram testadas em duplicata. Após 4 h de incubação a 37 °C (em uma atmosfera úmida com 5 % de CO₂), o meio dos cultivos foi retirado. Então foram adicionados 1,5 mL de glicerol a 15 % em HBS [7,85 mL de H₂O destilada tamponada, 1 mL de HBS 10x (7 mM Na₂HPO₄, 125 mM de Hepes, 0,7 M de NaCl) e 1,15 mL de Glicerol 87 % (Sigma)] e imediatamente retirados. Os poços foram lavados duas vezes com meio de cultivo, e 3 mL de meio de cultivo celular foram adicionados. As placas foram mantidas a 37 °C em uma atmosfera úmida com 5 % de CO₂ por 72 h, período durante o qual o aparecimento de células verdes fluorescentes foi examinado através de microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse E400).

Novas transfecções foram realizadas, alterando-se um fator por teste. A cada transfecção eram adicionados os parâmetros mais bem sucedidos da transfecção anterior. A primeira alteração foi a co-transfecção de DNA viral, DNA plasmidial e DNA carreador. Como controle, um poço permaneceu sendo transfectando apenas com DNA plasmidial contendo eGFP. Após os resultados dessa transfecção, foram comparados três tempos de incubação da solução de DNA e CaCl₂: 1, 5 e 15 min. Depois foi testada a retirada do meio de cultivo celular para a adição da solução de CaCl₂, HBS e DNA diretamente sobre o cultivo celular, sobre o qual, somente depois de 20 min de adsorção, foi adicionado 3 mL de meio. Para que a solução pudesse cobrir todo o poço, foi utilizado um volume maior de solução (500 µL), porém mantendo as mesmas concentrações finais dos reagentes. Posteriormente, foi também feita uma comparação de eficiência entre diferentes choques

osmóticos, utilizando-se glicerol em diferentes concentrações (10 e 15 %) e DMSO (10 %), e a ausência de choque.

Até este ponto, todas as transfeções haviam sido realizadas em células de cultivo primário de traquéia de embrião de bovino (EBTr). Foram então verificados outros tipos de cultivo primário de embrião de bovino: primeiramente células de testículo (EBT), células de rim (EBK) e células de pulmão (EBL). Por fim, também se testou a transfeção do DNA plasmidial associado à infecção das células com BoHV-5: 5 h ou 18 h após o choque de glicerol, as células eram infectadas com 1 MOI (multiplicidade de infecção) por poço, os inóculos ficaram adsorvendo por 1 h e, depois, 3 mL de meio de cultivo celular foram adicionados. As placas ficaram sob observação até o aparecimento de ECP em 50 % do cultivo celular, quando foram então congeladas a -70 °C.

3.2.5.2 Transfeção através do Kit Xfect[®]

Nas transfeções realizadas com o Kit Xfect (Clontech), foram testados apenas dois parâmetros, utilizando-se o plasmídeo pVR1012eGFP. Primeiramente transfectaram-se diferentes concentrações de DNA plasmidial (2,5; 5; 7,5; e 10 µg). O segundo teste de eficiência foi em relação à eficiência de diferentes tipos celulares: primeiro foram comparados os resultados entre células EBTr e VERO e EBL. As transfeções foram executadas seguindo as instruções do fabricante. Após essa etapa, passou-se a executar transfeções utilizando DNA de BoHV-5 EVI 88/95 gE⁻, gI⁻ e US9⁻, o cassete de deleção linearizado e o plasmídeo pVBIC. Brevemente, as transfeções com o cassete

de deleção foram realizadas como segue. Células em placas de seis poços tiveram o meio de cultura trocado 4 h antes das transfecção. Foram adicionados 1,5 µg de DNA viral, 500 ng cassete de deleção e 500 ng de um plasmídeo pVBIC ao tampão de reação do Kit (Xfect reaction buffer, Clontech) q.s.p. 100 µL. Uma segunda solução foi preparada, contendo 0,75 µL de polímero (Xfect Polymer, 0,3 µL/µg de DNA, Clontech) e 99,25 µL de tampão de reação. O conteúdo dos tubos foi homogeneizado em vortex, e toda a solução contendo o polímero foi adicionada à solução contendo DNA. Após mais um passo de agitação com vortex, a solução ficou a temperatura ambiente por 10 min e todo o volume da reação foi adicionado a um poço da placa. Essa reação foi feita em quintuplicata – o poço restante da placa foi transfectado sem o plasmídeo contendo o gene bICP0, sendo feito os ajustes necessários em relação as quantidades de tampão e de polímero. A placa foi então encubada 37 °C e, depois de quatro horas, o meio de cultivo celular de cada poço foi trocado por 3 mL de meio fresco com soro. As células foram observadas por até 72 h à procura de placas virais verdes em microscópio de fluorescência.

3.2.6 Isolamento dos vírus recombinantes

Nas co-transfecções realizadas com DNA viral, o sobrenadante de cada poço com ECP foi submetido a diluições seriadas e transferido para uma placa de 150 cm² de cultivo celular contendo células MDBK com 90 % de confluência.

Quando o vírus foi inoculado nas placas previamente transfectadas, o sobrenadante dos poços foi diluído 100 vezes, antes de ser inoculado nas células. Em ambos os casos, depois de 2 h de adsorção, o sobrenadante foi retirado e foram adicionados 40 mL de meio semi-sólido, meio de cultivo celular suplementado com antibióticos e SFB, adicionado de Agarose Low Melting Point (Invitrogen) na concentração final de 1 %. Um cultivo controle, isto é, sem adição de sobrenadante da transfecção, sempre foi realizado concomitantemente. Os cultivos foram mantidos sob observação por 72 h à procura de placas virais verdes.

3.2.7 Análise *in silico* da UL49.5

A identidade da sequência de aminoácidos da proteína UL49.5 de BoHV-1 (GeneBank Acession: NC_CAA90919.1) , de BoHV-5 (GeneBank Acession: NC_AAR86112.1) e da sequência putativa produzida pelo PCR de fusão foi analisada por alinhamento múltiplo ClustalW. Também foi realizada uma análise do perfil de hidrofobicidade das proteínas, através da escala de Kyte & Doolittle, utilizando janelas de 7 e 21 aminoácidos *degapped*. Todas as análises foram feitas utilizando o programa BioEdit versão 7.0.9.0.

4. RESULTADOS

4.1 Detecção de BoHV-1 e 5 em amostras de sêmen

4.1.1 Detecção de DNA de BoHV-1 e de BoHV-5 em amostras de sêmen

As 76 amostras foram submetidas à amplificação pela primeira PCR. Os produtos dessa reação, entretanto, não foram sempre visíveis em gel de agarose, devido talvez a pequena quantidade de DNA viral presentes nas amostras (Figura 4.1A). Os produtos da primeira PCR foram submetidos a duas nPCR tipo-específicas. Todas as 76 amostras de sêmen foram positivas para a presença de DNA de BoHV-5, e 34 (44,7%) dessas também foram positivas para BoHV-1 (Tabela 4.1 e Figura 4.1B). Das 57 amostras coletadas de touros de raças européias no estado do Rio Grande do Sul (RS), 25 (43,8 %) foram positivas para os dois tipos virais. Entre as amostras do CIA, apenas 5 (21,7 %) das 23 amostras de sêmen em palheta mostraram-se positivas para BoHV-1 e BoHV-5. Por outro lado, das 34 amostras de sêmen fresco do RS, 20 (58,8 %) foram positivas para ambos os vírus. Entre as 19 amostras coletadas de touros da raça Nelore no estado de Goiás, nove (47,3 %) foram positivas para BoHV-1 e 5.

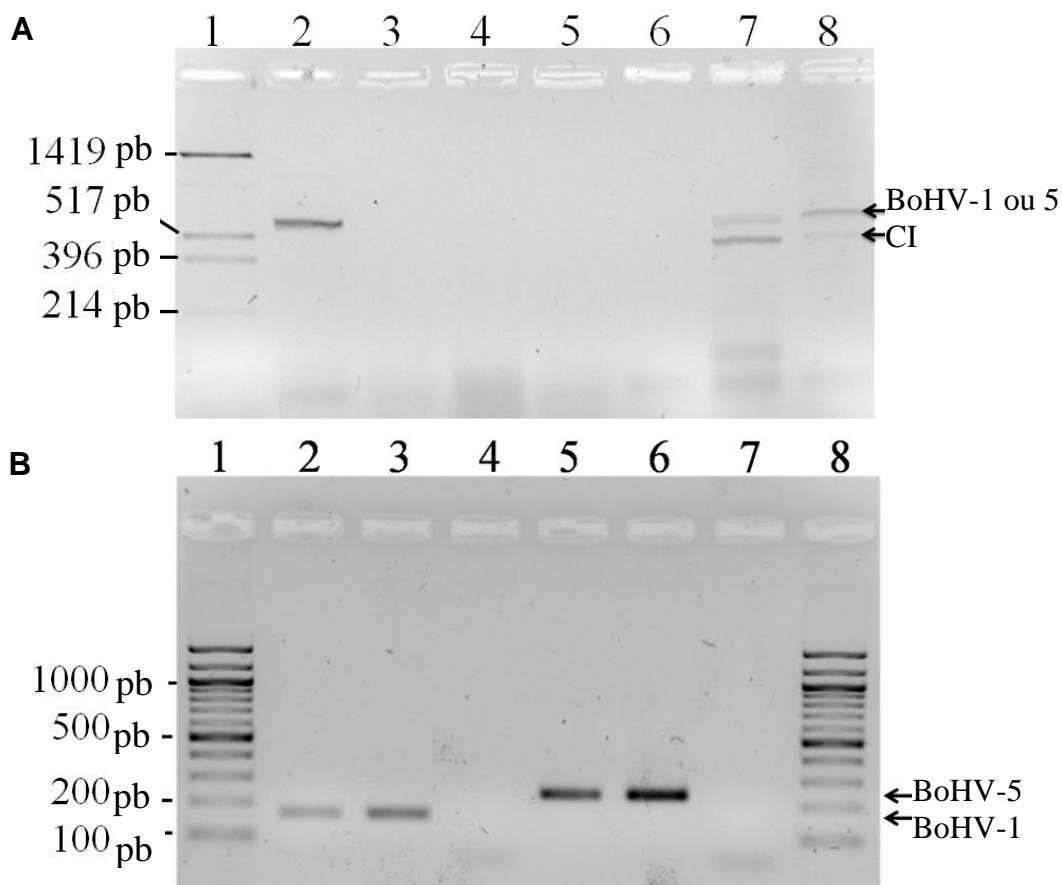


Figura 4.1. Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR. (A) Produtos da primeira reação, utilizando DNA de sêmen bovino como molde. Setas indicam a localização dos produtos de BoHV (de aproximadamente 570 pb) e do CI (Controle Interno, 440 pb). Linha 1: marcador de peso molecular pUC19 x *Hinf*I. Linhas 2, 3, 4, 6, 7 e 8: produtos de PCR de amostras. Linhas 2, 4 e 6 foram negativas, enquanto linhas 2, 7 e 8 foram positivas. Linha 5: controle negativo. (B) Produtos de duas amostras amplificadas pelas nPCR espécie-específicas, dando origem a fragmentos de 161 pb para BoHV-1 (linha 2 = amostra 1265 e linha 3 = amostra 1350) e de 236 pb para BoHV-5 (linha 5 = amostra 1265 e linha 6 = amostra 1350). Linhas 1 e 8: DNA Ladder 100 pb (New England Biolabs). Linhas 4 e 7: controles negativos.

Tabela 4.1. Detecção de DNA e isolamento viral em amostras de sêmen touros brasileiros.

	Amostras RS	Amostras GO	Total (%)
Detecção de DNA Viral			
BoHV-5	57/57	19/19	76/76 (100)
BoHV-1	25/57	9/19	34/76 (44,7)
BoHV-5 + BoHV-1	25/57	9/19	34/76 (44,7)
Isolamento Viral			
Amostras Positivas	13/30	5/10	18/40 ^a (45,0)

RS, Estado do Rio Grande do Sul; GO, Estado de Goiás.

^a Trinta e seis amostras não puderam ser testadas devido à falta de volume suficiente (16) ou à citotoxicidade (20).

4.1.2 Isolamento viral e análise por restrição enzimática

Para determinar se as amostras de sêmen continham partículas de vírus infeccioso, foi realizado isolamento viral das mesmas. Entretanto, 36 amostras não puderam ser testadas devido a quantidade insuficiente para realização do teste (n=16) ou porque mostraram-se citotóxicas ao cultivo celular (n=20). Das 40 restantes testadas, 18 produziram um efeito citopático (ECP) típico de herpesvírus e foram consideradas positivas (45 %) (Tabela 4.1). Treze (72,2 %) das 18 amostras de sêmen com BoHV infeccioso pertenciam ao grupo de amostras em palheta do CIA do Rio Grande do Sul (touros de raças européias) e 5 (27,8 %) pertenciam as amostras de sêmen fresco dos touros de Goiás (touros de raça Zebu).

Para confirmar que o ECP era realmente devido a uma infecção por herpesvírus bovino e para determinar qual dos dois vírus (BoHV-1 ou BoHV-5) foi isolado, foi feita uma análise por restrição enzimática (REA) de sete amostras de sêmen em palheta – as sete primeiras positivas isoladas das 18. A REA com *HindIII* do DNA viral isolado mostrou a presença de DNA de BoHV-1.2 em todas as sete amostras (Mayfield et al., 1983; Rijsewijk et al., 1999). O padrão de fragmentos de restrição enzimática de BoHV-5 com *HindIII* foi difícil observar, entretanto, fragmentos típicos de BoHV-5 (com tamanhos de aproximadamente 50 e 57 Kb) também estavam presentes em todas as amostras (Figura 4.2).

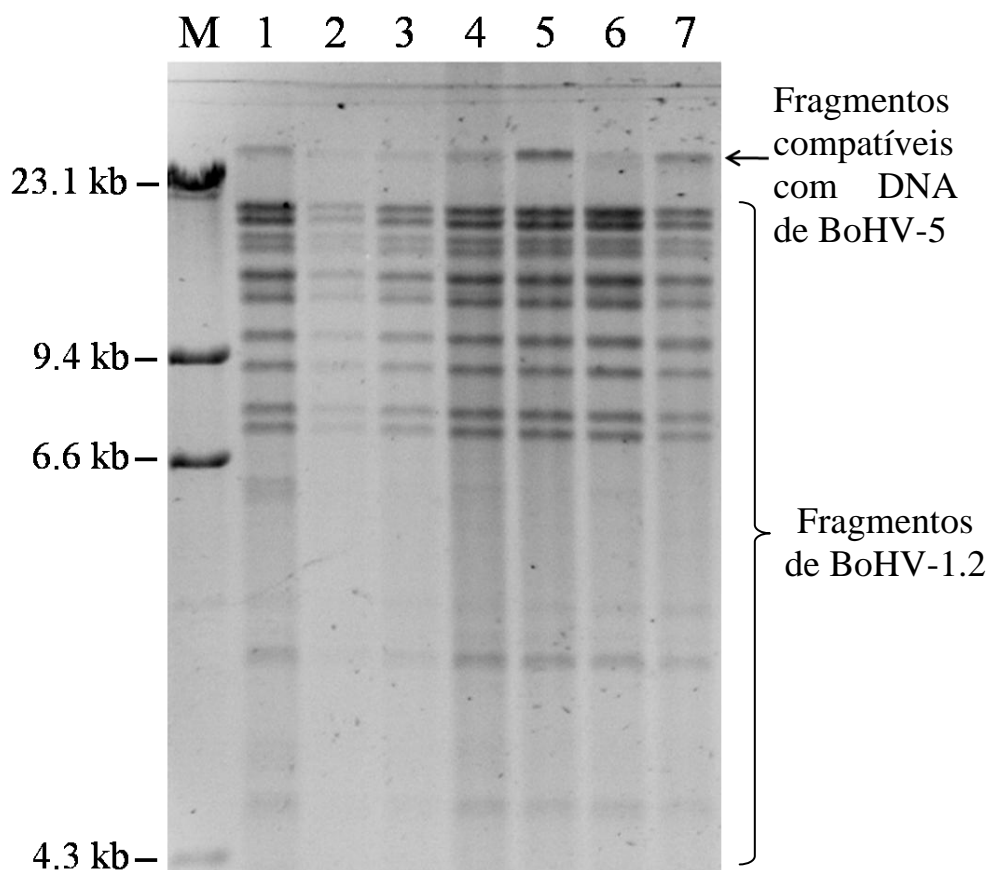


Figura 4.2. Análise por restrição enzimática (REA) do DNA genômico de BoHV-1 ou 5 isolado de 7 amostras de sêmen bovino. O DNA viral foi digerido com *HindIII* e os fragmentos obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,7%. Linha M: marcador de pelo molecular Lambda x *HindIII*. Colunas: 1, Isolado 1/4p; 2, Isolado 2/4p; 3, Isolado 3/4p; 4, Isolado 4/4p; 5, Isolado 5/4p; 6, Isolado 6/3p; 7, Isolado 7/3p. (1/4p = Isolado número/passagem 4). O padrão de fragmentos de BoHV-1 é típico do genótipo de BoHV-1.2. A seta indica fragmentos (~57 e 50 Kb) típicos de restrição de BoHV-5.

4.2 Mutação do gene UL49.5 em uma Amostra Recombinante de BoHV-5

4.2.1 Construção do Cassete de Deleção

Para a construção do fragmento de deleção da UL49.5, foi produzido um fragmento de BoHV-5 EVI 88/95 BamHIAMlUIE de 1902 pb, que continha os genes UL50, UL49.5 e parte do gene UL49 (Figura 4.3A). Esse fragmento foi clonado dentro do sítio múltiplo de clonagem do vetor pCR2.1. O plasmídeo obtido foi então utilizado como molde para a realização da PCR de fusão

(Figura 4.3 B, C e D). Depois, o fragmento obtido na PCR de fusão foi inserido no plasmídeo, substituindo o fragmento original pelo mutado (Figura 4.3 E e F). Após, ainda foi inserido – no sítio de restrição de EcoRV criado pela PCR de fusão – no plasmídeo o gene repórter eGFP (Figura 4.3 G), na mesma orientação de transcrição do gene UL49.5. O cassete de deleção foi, por fim, linearizado no sítio de HindIII, a 80 pb do inserto (Figura 4.3 H).

4.2.2 Transfecções

A primeira transfecção, em células EBTr pelo método de fosfato de cálcio com DNA plasmideal, obteve sucesso, com a observação de pelo menos uma célula verde fluorescente por campo no microscópio de fluorescência utilizando-se um aumento de 40x. Foi observada uma relação direta entre a concentração de DNA plasmideal utilizada e o número de células verdes fluorescentes encontradas. Apesar disso, a concentração de 2 µg de DNA apresentou o melhor resultado em relação a número de células verdes (em média, 6 células por campo) e viabilidade celular que a concentração de 3 µg, a qual apresentou uma mortalidade celular aproximadamente 20 % maior (e uma média também de 6 células verdes por campo). Dessa forma, começaram a ser feitos teste de co-transfecção de DNA plasmideal e viral respeitando as condições ótimas de transfecção obtidas somente com DNA plasmideal. Enquanto que no controle (apenas DNA plasmideal) foi possível detectar de 6 a 10 células verdes por campo, nos poços em que também foi adicionado DNA viral não foi possível a visualização de placas virais; entretanto, ao se realizar o

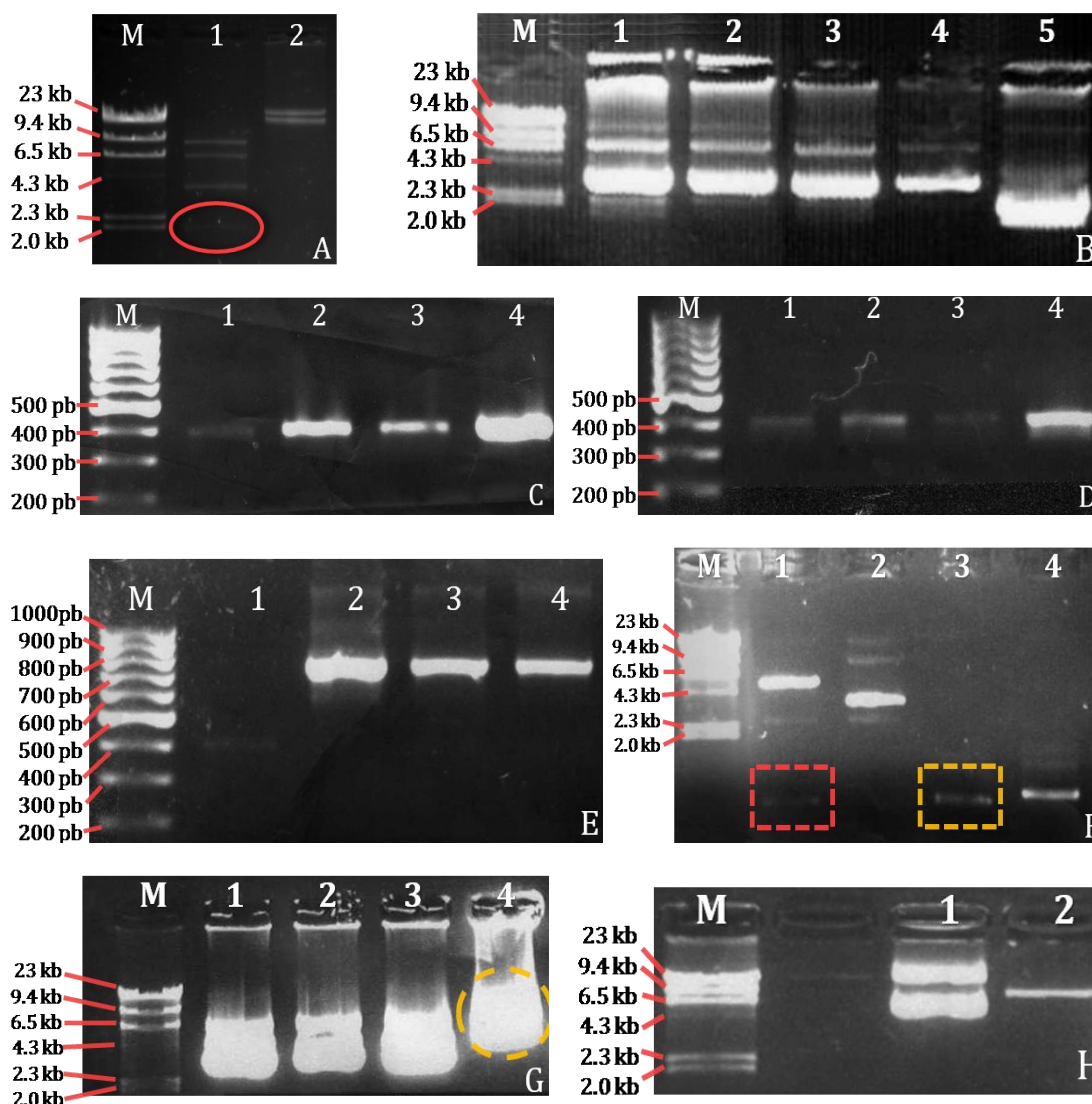


Figura 4.3 Construção do cassete de deleção. Em A, B, F, G e H: eletroforese em gel de agarose a 0,7 %, utilizando como marcador de peso molecular (M) DNA *LambdaxHindIII*. Em C, D e E: eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, utilizando como marcador de peso molecular (M) DNA Ladder 100 pb (Fermentas). Em A: Coluna 1: pBR322 contendo fragmento *BamHIA* do genoma de BoHV-5 clivado com *MluI* (em destaque, fragmento *MluI*E); coluna 2: pBR322 contendo fragmento *BamHIA* do genoma de BoHV-5 não clivado. Em B, extração de DNA plasmidial: colunas 1 a 4: clones de pCR2.1 contendo fragmento *BamHIA_MluI*E (1.9 kb); coluna 5: pCR2.1 sem inserto. Em C: PCR utilizando *primer* reverso mutado (Mut R) e *primer* externo forward, dando origem a um produto de 385 pb. Em D: PCR utilizando *primer* externo reverso e forward mutado (Mut F) dando origem a um produto de 386 pb. Em E: PCR de fusão, utilizando ambos *primers* externos (OUT), originando um produto de 735 pb. Em C, D e E, as colunas de 1 a 4 representam, diferentes concentrações de $MgCl_2$ (0.5 mM, 1 mM, 1.5 mM e 2 mM, respectivamente). Em F: 1, clivagem com *HincII* do plasmídeo pCR2.1 contendo o fragmento *BamHIA_MluI*E de BoHV-5 (pCR2.1MluI), liberando fragmento de 661 pb (em destaque vermelho); 2, pCR2.1MluI não clivado; 3, produto do PCR de fusão clivado com *HincII* (em destaque amarelo, fragmento de 662 pb); 4 produto do PCR de fusão não clivado. Em G, colunas 1 a 4, diferentes clones resultantes da ligação do cassete de eGFP no pCR2.1MluI_Mut, sendo o material da coluna 4 o resultado de uma clonagem bem sucedida (em destaque). Em H, coluna 1: cassete de expressão de deleção; coluna 2: cassete de deleção clivado com *HindIII*.

repique, utilizando o sobrenadante das células transfectadas de dois dos poços, foi visualizado ECP após 24h.

Durante a otimização da técnica, foi adotada a diminuição do tempo de incubação entre o DNA e o CaCl_2 para 1 min e a diminuição da concentração do glicerol para 10 %, além disso, foi também aumentada a quantidade de DNA tranfectado. Essas alterações resultaram em um aumento do número de células verdes por campo, porém não do de placas virais. A variação da técnica, na qual os vírus eram inoculados após a transfecção do cassete de deleção, se mostrou também infrutífera para o aparecimento de placas virais verdes. Por fim, testaram-se outros três tipos de cultivos primários (EBK, EBL e EBT) e nenhum deles demonstrou resultados superiores aos já obtidos.

A seguir, decidiu-se testar um kit comercial de transfecção. Primeiramente foi testada a eficiência do kit utilizando apenas DNA plasmideal em duas concentrações diferentes (2 e 5 μg) e apareceram 20 % a mais de células verdes por campo nas células transfectadas com a maior concentração de DNA em relação a menor concentração. Foram então testadas concentrações maiores de DNA (5; 7,5; e 10 μg) e foram utilizadas também células EBL e células VERO. As células VERO mostraram-se menos transfectáveis, porém apresentaram também uma menor mortalidade celular. Por sua vez, as células EBL mostraram-se 10 vezes mais eficientes que as células EBTr, alcançando até 80 % de eficiência de transfecção nas concentrações de 7,5 e 10 μg de DNA. Foram então realizadas co-transfecções

com DNA viral, utilizando as células EBL, o cassete de deleção linearizado e um plasmídeo contendo o gene *bICP0* de BoHV-1. Apesar de ter sido possível visualizar um grande número de células verdes, não foi possível identificar placas virais verdes até o momento.

4.2.3 Isolamento dos Vírus Recombinantes

Apesar da melhora dos parâmetros nas transfecções, até o momento não foi possível recuperar vírus recombinantes. A morte celular devido à toxicidade dificulta a visualização da formação de placas virais e diminui a eficiência da técnica.

4.2.4 Análise *in silico* da UL49.5

O alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína UL49.5 de BoHV-1 e de BoHV-5 revelou uma identidade de 79,1 % entre as sequências. A identidade entre as sequências da proteína mutada e da proteína selvagem de BoHV-5 foi de 39,1 % (Figura 4.4 A). Ao analisar o perfil de hidrofobicidade das sequências pela escala de Kyte & Doolittle – que considera hidrofóbicos os pontos com valores maiores do que zero –, percebe-se uma grande semelhança entre as proteínas selvagens de ambos os vírus. Já quando se compara o perfil apresentado pela proteína mutada, nota-se uma alteração importante na região transmembrana, que passa ter um caráter hidrofílico, porém há outras pequenas alterações ao longo quase toda a sequência (Figura 4.4 B e C). Além disso, a UL49.5 mutada de BoHV-5 apresentou 8 aminoácidos a menos que a proteína selvagem, diminuindo o tamanho da cauda citosólica.

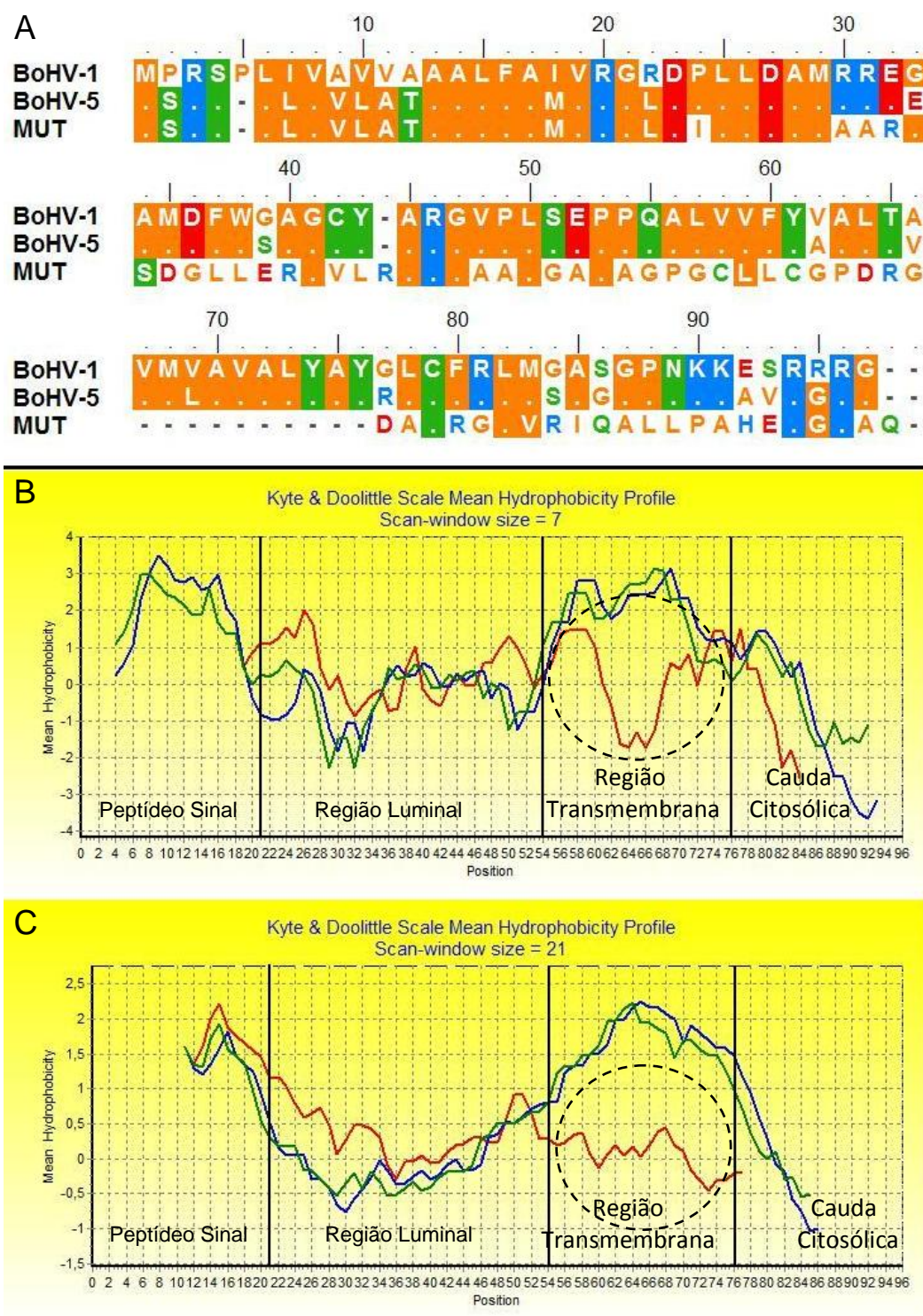


Figura 4.4 Comparação *in silico* das proteínas UL49.5 de BoHV-1, de BoHV-5 e da UL49.5 mutada produzida por PCR de fusão. Em A: alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas. Em B e C: perfil de hidrofobicidade pela escala de Kyte & Doolittle (valores >0 são considerados hidrofóbicos). Na abscissa estão posicionados os aminoácidos e na ordenada estão os valores de hidrofobicidade. Em vermelho: UL49.5 mutada; em azul: UL49.5 de BoHV-1; em verde: UL49.5 de BoHV-5. A janela de 21 aminoácidos (B) favorece análises de regiões hidrofóbicas (regiões transmembranas), enquanto a janela de 7 aminoácidos (C) favorece análises de regiões hidrofílicas (regiões expostas para o lúmen/citoplasma). Linhas pretas verticais indicam a divisão entre as putativas regiões de localização intracelular das proteínas. A região transmembrana é a que sofre a maior alteração no perfil de hidrofobicidade (círculo tracejado em preto). As análises foram realizadas utilizando-se o programa BioEdit.

5. DISCUSSÃO

5.1 Detecção de BoHV-1 e 5 em amostras de sêmen

Esse estudo mostrou que 100 % das 76 amostras de sêmen testados foram positivas para DNA de BoHV-5 e que 44,7 % dessas amostras também eram positivas para BoHV-1. A comparação das percentagens de infecções por BoHV-1 e por BoHV-5 entre os touros das raças européias e Nelore não apresentou diferença.

A presença de BoHV-1 e BoHV-5 em amostras de sêmen de gado brasileiro já foi demonstrada. DNA de BoHV-1 foi encontrado em 31,7 % de amostras de sêmen (n=101) de um centro de inseminação artificial (Rocha et al., 1998). DNA de BoHV-1 (n=5) e BoHV-5 (n=2) também foi detectado em amostras de touros saudáveis (Silva et al., 2007b). Da mesma forma, BoHV-1.2 foi detectado em touros sem sinais clínicos (D'arce et al., 2002). Igualmente, DNA de BoHV-5 foi encontrado em 30 % (n=20) de amostras de sêmen e em sêmen de um touro sem sinais clínicos (D'arce et al., 2002; Gomes et al., 2003; Esteves et al., 2003). Em outros países, esses resultados também são encontrados. Na Holanda, em centros de inseminação artificial, foi relatado o isolamento de BoHV-1 em sêmen de 43 touros saudáveis (n=116) e a detecção

de DNA de BoHV-1 pelo menos uma vez em 5 animais (n=23) (Van Oirschot et al., 1993; de Gee et al., 1996) Na Índia, foi possível detectar DNA de BoHV-1 em 50 % de touros soropositivos (n=12) e em 66,67% de touros soronegativos (n=12) (Deka et al., 2005). Na Austrália, foi detectado recentemente BoHV-5 no sêmen de 2 touros saudáveis (Kirkand et al., 2009; Diallo et al., 2010).

A percentagem de 31,7 % de amostras positivas para BoHV-1 encontrada por Rocha et al. (1998) pode ser comparável com o percentual encontrado neste estudo (44,7 %). A maior percentagem de amostras de sêmen positivas para BoHV-5 já descrita era de 30 % (Gomes et al., 2003). As 20 amostras de sêmen usadas pelos autores desse trabalho continham, além de DNA de BoHV-5, partículas infecciosas de BoHV-1. Nenhum dos estudos anteriores mostrou um percentual tão elevado de amostras positivas para BoHV-5 como o encontrado aqui. A diferença nas percentagens de amostras positivas entre esses estudos está ligada primariamente à prevalência da infecção dos rebanhos por BoHV-1 e 5 e à sensibilidade dos testes usados. Sabe-se, através de testes sorológicos, que a distribuição desses vírus nos rebanhos de bovinos do Brasil ocorre de forma variável, conforme o sistema de controle sanitário adotado nas propriedades. Logo, medidas como controle sorológico de animais, com eliminação de animais soropositivos e adoção de vacinação em regiões de alta prevalência interferem na circulação de vírus na população e, conseqüentemente, nos níveis e freqüência de excreção dos vírus em sêmen e outros. A diferença entre os trabalhos anteriores e o nosso também pode ser devida a uma diferença de sensibilidade nas PCR usadas

para detecção do DNA viral. Utilizando-se a mesma técnica descrita aqui, tanto DNA de BoHV-1 quanto de BoHV-5 foi recentemente detectado por nosso grupo em gânglios trigêmeos de bovinos do estado do Rio Grande do Sul (Campos et al., 2009). Nesse estudo, os percentuais de animais portadores de DNA de BoHV-1 ou BoHV-5 ou ambos foi de 82,8 %, 93,1 % e 75,9 %, respectivamente. Apesar dos números diferirem dos encontrados aqui, os resultados desse estudo corroboram com os nossos.

Nosso trabalho também demonstrou que tanto as amostras de sêmen fresco quanto as de sêmen em palheta continham vírus infeccioso. Apesar de todas as amostras testadas terem sido positivas por PCR, pelo menos para BoHV-5, o baixo percentual (45 %) de amostras, das quais se pode isolar BoHV-1 ou BoHV-5, apenas reflete o fato de que a PCR pode ser mais sensível do que o isolamento viral (van Engelenburg et al., 1993; Smits et al., 2000). Isso ocorre em virtude da possibilidade de detecção da PCR de DNA viral também de partículas não infecciosas. Além disso, já foi demonstrado que a presença de anticorpos anti-BoHV no sêmen pode prejudicar a infectividade dos vírus e interferir negativamente no isolamento viral (Pastoret et al., 1979). Foi demonstrado, por exemplo, que cerca de três semanas após a infecção artificial com BoHV-1, um teste de PCR pode detectar a de quatro a nove vezes mais amostras positivas do que o isolamento viral (Van Engelenburg et al., 1995). No presente estudo, entretanto, a nPCR específica para BoHV-1 não conseguiu detectar o DNA viral presente em uma amostra de sêmen, que foi positiva para BoHV-1 no isolamento viral. A nPCR para BoHV-1 aqui descrita

talvez seja, desse modo, menos sensível que o isolamento viral. Isso implica, portanto, que o número de amostras positivas para BoHV-1 pode ser na realidade maior que o detectado pela nossa nPCR.

As sete amostras de vírus que foram submetidas à análise por restrição enzimática (REA) foram as sete primeiras amostras (do grupo de 18 amostras positivas) positivas no isolamento viral. Ocorreu que essas sete amostras pertenciam a apenas quatro touros do mesmo centro de inseminação artificial – muito embora representem sete coletas diferentes. A REA mostrou a presença de DNA genômico de ambos os tipos virais, embora a quantidade de DNA de BoHV-5 detectada tenha sido até 20 vezes menor que a de BoHV-1. O padrão de fragmentos de DNA de BoHV-1 observado mostrou que todos genomas eram do genótipo de BoHV-1.2, o que já foi demonstrado na América do Sul (D'arce et al., 2002).

A presença de partículas virais infecciosas de BoHV-1 e de BoHV-5 no sêmen é um motivo de preocupação, entretanto, a aplicação de medidas sanitárias pode auxiliar na redução da disseminação desses vírus por sêmen. Sabe-se que animais latentemente infectados por BoHV podem sofrer reativação viral resultando ocasionalmente em contaminação intermitentemente do sêmen, muitas vezes sem o aparecimento de sinais clínicos (van Oirschot, 1995). Para evitar a disseminação desses vírus através da monta natural ou inseminação artificial, todas as amostras de sêmen – inclusive de touros aparentemente saudáveis – deveriam ser testadas para a presença dos mesmos. Devido à secreção intermitente, nem todos os lotes de sêmen

coletados estarão infectados com vírus infeccioso em animais portadores. Se duas palhetas de cada lote para inseminação artificial forem testadas e o resultado vir a ser negativo para a presença de vírus infeccioso, o risco de transmissão de BoHV-1 e 5 por inseminação é substancialmente diminuído (van Oirschot, 1995; Rocha et al., 1999).

5.2 Mutação do gene UL49.5 em uma amostra recombinante de BoHV-5

O gene UL49.5 codifica uma proteína responsável por inibir a a o da proteína transportadora associada com a apresenta o de antígenos (TAP) nas células hospedeiras (Koppers-Lalic et al., 2003). Apesar de não haver dados na literatura em rela o   fun o da UL49.5 do BoHV-5, sabe-se que essa proteína age como inibidora da TAP em diversos vírus do gênero *Varicellovirus*, entre os quais o BoHV-1, o EHV-1, o EHV-4 e o SuHV-1 (Koppers-Lalic et al., 2005; Verweij et al., 2008; Verweij et al., 2010a). O estudo *in silico* que realizamos revelou uma grande semelhança no perfil de hidrofobicidade e na sequência de aminoácidos entre a UL49.5 de BoHV-1 e de BoHV-5. Esses resultados podem indicar que a proteína de BoHV-5 compartilha uma estrutura parecida com a UL49.5 de BoHV-1. Dessa forma, pode-se inferir que a UL49.5 exerça a mesma fun o em ambos os vírus, embora o mecanismo de a o possa não ser especificamente o mesmo (Koppers-Lalic et al., 2005).

As alterações propostas nesse estudo no gene UL49.5 modificam a sequência da proteína a partir do vigésimo nono aminoácido. A partir do estudo *in silico* das mudanças produzidas na sequência de aminoácidos da proteína, pode-se observar que a região transmembrana passa a ter um caráter acentuadamente mais hidrofílico que o da proteína selvagem, embora alterações na hidrofobicidade sejam visíveis ao longo de toda a proteína. Além disso, a troca na fase de leitura ainda provoca um *stop codon* prematuro, levando à perda dos últimos sete aminoácidos da sequência. Essas alterações interferem justamente nas regiões que, de acordo com a literatura, seriam responsáveis por exercerem a função de inibição da TAP (Koppers-Lalic et al. 2008). Como não foi possível isolar uma amostra recombinante até o momento, não há como comprovar se as alterações previstas *in silico* realmente ocorrem ou são funcionais *in vitro* ou *in vivo*.

As dificuldades encontradas para o isolamento do vírus BoHV-5 recombinante podem ser explicadas principalmente por duas razões: a alta citotoxicidade apresentada pelas técnicas de transfecção e pela baixa frequência de recombinação homóloga (em torno de 1 %) entre o vírus parental e o fragmento de deleção (Jordan et al., 1996). A citotoxicidade, além de dificultar a visualização de placas virais, diminui a chance de eventos de recombinações, uma vez que há menos células vivas presentes na monocamada transfectada. Essa toxicidade é causada não apenas pelos reagentes usados nas transfecções, como pelo próprio DNA que se deseja inserir. Sabe-se que o tamanho dos precipitados define a capacidade de

ligação do DNA e, portanto, modulam a eficiência da transfecção e seus efeitos tóxicos (Roy et al., 2003; Welzel et al., 2004; Neumann et al., 2009). Porém, a presença do DNA parece afetar a formação das partículas, e as moléculas de cálcio, quando precipitam, causam dano celular (Jordan et al., 1996; Jordan & Wurm, 2004). O choque osmótico também é outro fator descrito como causador de um efeito tóxico e é recomendado que para cada tipo celular se estabeleça as melhores condições de concentração e tempo de exposição (Jordan & Wurm, 2004). Entretanto, transfecções realizadas através do uso do Kit Xfect se mostram menos tóxicas ao cultivo celular - e mais eficientes - que transfecções realizadas pela técnica de fosfato de cálcio, fato que gera novas perspectivas para esse trabalho.

6. CONCLUSÕES

No presente estudo foi possível concluir que:

a) Os herpesvírus bovino tipo 1 e 5 estão disseminados na população estudada.

b) Foi detectada a presença de BoHV-1 e de BoHV-5 em amostras de sêmen fresco e em palheta de touros saudáveis de duas propriedades rurais e uma central de inseminação, usando duas reações espécie-específicas de nPCR e isolamento viral. Esses resultados ressaltam a importância de se testar as amostras de sêmen, mesmo de touros saudáveis, para a presença de BoHV-1 e BoHV-5.

c) Neste trabalho também se tentou construir um vírus recombinante de BoHV-5, ao qual o hospedeiro pudesse desenvolver uma melhor resposta imunológica. Apesar do grande avanço na otimização dos parâmetros da técnica de transfecção, não foi possível produzir um vírus recombinante, devido às dificuldades encontradas em se realizar transfecções eficientes, nas quais ocorressem recombinações homólogas entre o DNA viral e cassete de deleção. Ainda assim, esperamos em breve obter sucesso na produção do recombinante.

7. REFERÊNCIAS

ABELE, R. & TAMPÉ, R. Modulation of the antigen transport machinery TAP by friends and enemies. **FEBS Letters**, Netherlands, v.580, p.1156–1163, 2006.

ACKERMAN, M. & WYLER, R. The DNA of an IPV strain of bovid herpesvirus 1 in sacral ganglia during latency after intravaginal infection. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.9, p.53–63, 1984.

ACKERMANN, M. & ENGELS, M. Pro and contra-IBR eradication. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.113, p.293-302, 2006.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, United States, v.124, p.783–801, 2006.

ALEGRE, M.; NANNI, M.; FONDEVILA, N. Development of a multiplex polymerase chain reaction for the differentiation of bovine herpesvirus-1 and -5. **J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health**, Germany, v.48, n.8, p.613-21, 2001.

ALFIERI, A. A. Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR): Epidemiologia, Imunologia e Imunoprofilaxia. In: **Laboratório Pfizer Ltda.** - Divisão de Saúde Animal -Atualização Técnica. São Paulo, 1999.

ASHBAUGH, K.; THOMPSON, K.; BELKNAP, E.; SCHULTHEISS, P.; CHOWDURY, 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.**, United States, v.9, n.4, p.387-394, 1997.

AMBAGALA, A.P.N.; GOPINATH, R.S.; SRIKUMARAN, S. Inhibition of TAP by pseudorabies virus is independent of its vhs activity. **Virus Res.**, Netherlands, v.96, n.1-2, p.37-48, 2003.

BAGUST, T.J. & CLARK, L. Pathogenesis of meningo-encephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. **J Comp Pathol.**, England, v.82, p.375-83, 1972.

BARBOSA, A.C.V.C.; BRITO, W.M.E.D.; ALFAIA, B.T. Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo Herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) no estado de Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.6, p.1368-1373, 2005.

BELKNAP, E.B.; COLLINS, J.K.; AYERS, V.K.; SCHULTHEISS, P.C. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 1.3. **Vet. Pathol.**, United States, v.31, n.3, p.358-365, 1994.

BELTRÃO N.; FLORES E.F.; WEIBLEN R.; SILVA A. M.; ROEHE P.M.; IRIGOYEN L.F. Infecção e enfermidade neurológica pelo herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5): coelhos como modelo experimental. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v.20, p.144-150, 2000.

BOSCH, J.C.; KAASHOEK, M.J.; KROESE, A.H.; VAN OIRSCHOT, J.T. An attenuated bovine herpesvirus 1 marker vaccine induces a better protection than two inactivated marker vaccines. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.52, p.223-234, 1998.

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

BRUM, M.C.S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F.; CHOWDHURY, S.I. Construction and growth properties of bovine herpesvirus type 5 recombinants defective in the glycoprotein E or thymidine kinase gene or both. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Brasil, v.43, n.2, p.217-224, 2010.

BULACH, D.M. & STUDDERT, M.J. Comparative genome mapping of bovine encephalitis herpesvirus, bovine herpesvirus 1, and buffalo herpesvirus. **Arch. Virol.**, Austria, v.113, p.17-34, 1990.

CAMPOS, F.S. **Detecção de infecções latentes por herpesvírus bovino 1 e 5 em gânglios trigêmeos de bovinos através da técnica de reação em cadeia da polimerase.** Dissertação - Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. UFRGS, Porto Alegre, 2009.

CAMPOS, F.S.; FRANCO, A.C.; HÜBNER, S.O.; OLIVEIRA, M.T.; SILVA, A.D.; ESTEVES, P.A.; ROEHE, P.M.; RIJSEWIJK, F.A. High prevalence of coinfections with Bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.139, p.67–73, 2009.

CAMPOS, F.S.; DEZEN, D.; ANTUNES, D.A.; SANTOS, H.F.; ARANTES, T.S.; CENCI, A.; GOMES, F.; LIMA, F.E.S.; BRITO, W.M.E.D.; FILHO, H.C.K.; BATISTA, H.B.C.R.; SPILKI, F.R.; FRANCO, A.C.; RIJSEWIJK, F.A.M.; ROEHE, P.M. Efficacy of an inactivated, recombinant bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) vaccine. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, *in press*, doi:10.1016/j.vetmic.2010.08.004.

CANN, A.J. Expression. In: . Principles of Molecular Virology 4th Ed. USA: Elsevier Academic Press, p.140-143, 2005.

CÁRDENAS, A.B.; ARANGO, C.J.J.; MAYA, J.J.M.; HIROSE, J.A.M.; BERNAL, A.O. Comparison between three diagnostic tests to detect abortion caused by infectious bovine rhinotracheitis in dairy herds. **Vet. Mex.**, Mexico, v.37, n.2, p.151-163, 2006.

CARON, L.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; SCHERER, C. F. C.; IRIGOYEN, L. F.; ROEHE, P. M.; ODEON, A.; SUR, J. H. Latent infection by bovine herpesvirus type-5 in experimentally infected rabbits: virus reactivation, shedding and recrudescence of neurological disease. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.84, n.4, p.285-295, 2002.

CARRILLO, B.J.; AMBROGI, A.; SCHUDEL, A.; VASQUEZ, M.; DAHME, E.; POSPISCHIL, A. Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. **Zentralbl. Veterinarmed. B, J. Vet. Med. B**, Berlin, v.30, n.1, p.327–332, 1983.

CASCIO, K.E.; BELKNAP E.B.; SCHULTHEISS, P.C.; AMES, A.D.; COLLINS, J.K. 1999. Encephalitis induced by bovine herpesvirus 5 and protection by prior vaccination or infection with bovine herpesvirus 1. **J. Vet. Diagn. Invest.**, United States, v.11, p.134–139, 1999.

CASTRUCCI G.; FRIGERI F.; SALVATORI D.; FERRARI M.; DICO M.L.; ROTOLA A.; SARDONINI Q.; PETRINI S.; CASSAI E. A study on latency in calves by five vaccines against bovine herpesvirus-1 infection. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, England, v.25, n.4, p.205-215, 2002.

CERQUEIRA, R.B.; CARMINATI, R.; SILVA, J.M.; CAMPOS, S.G.; MEYER, R.; SARDI, S. Serological survey for bovine herpesvirus 1 in cattle from different regions in the state of Bahia, Brazil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, Brazil, v.37, n.6, 2000.

CHAPLIN, D.D. Overview of the immune response. **J Allergy Clin Immunol.**, United States, v.125, (2 Suppl 2):S3-23, 2010. doi:10.1016/j.jaci.2009.12.980,

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

CHOWDHURY, S.I. Fine mapping of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) glycoprotein C neutralizing epitopes by type-specific monoclonal antibodies and synthetic peptides. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.58, p.309-314, 1997.

CHOWDHURY, S.I.; ROSS, C.S.; LEE, B.J.; HALL, V.; CHU, H.J. Construction and characterization of a glycoprotein E gene-deleted bovine herpesvirus type 1 recombinant. **Am. J. Vet. Res.**, United States, v.60, n.2, p.227-32, 1999 (resumo).

CHOWDHURY, S.I.; MAHMOOD, S.; SIMON, J.; AL-MUBARAK, A.; ZHOU, Y. The Us9 gene of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) effectively complements a Us9-null strain of BHV-5 for anterograde transport, neurovirulence, and neuroinvasiveness in a rabbit model. **J Virol.**, United States, v.80, p.4396-405, 2006.

D'ARCE, R.C.F.; ALMEIDA, R.S.; SILVA, T.C.; FRANCO, A.C.; SPILKI, F.R.; ROEHE, P.M.; ARNS, C.W. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesvirus types 1 and 5. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.88, n.4, p.315-324, 2002.

DAVIES, D.H.; DUNCAN, J.R. The pathogenesis of recurrent infections with infectious bovine rhinotracheitis virus induced in calves by treatment with corticosteroids. **Cornell Vet.**, United States, v.64, n.3, p.340-66, 1974.

DAVISON, A.J. Evolution of the herpesviruses. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.86, p.69–88, 2002.

DAVISON, A.J. Herpesvirus systematics. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.143, p.52–69, 2010.

DAVISON, J.A.; DARGAN, D.J.; STOW, N.D. Fundamental and accessory systems in herpesviruses. **Antiviral Research**, United States, v.56, p.1-11, 2002.

DAVISON, A.J.; TRUS, B.; CHENG, N.; STEVEN, A.C.; WATSON, M.S.; CUNNINGHAM, C.; LE DEUFF, R.M.; RENAULT, T. A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. **J. Gen. Virol.**, England, v.86, p.41–53, 2005.

DAVISON, J.A.; EBERLE, R.; EHLERS, B.; HAYWARD, G.S.; MCGEOCH, D.J.; MINSON, A.C.; PELLETT, P.E.; ROIZMAN, B.; STUDDERT, M.J.; THIRY, E. The order Herpesvirales. **Arch. Virol.**, Austria, v.154, p.171–177, 2009.

DE GEE, A.L.W.; WAGTER, L.H.A.; HAGE, J.J. The use of a polymerase chain reaction assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in semen during a natural outbreak of infectious bovine rhinotracheitis. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.53, p.163-168, 1996.

DE JONG, M.C.M.; KIMMAN, T.G. Experimental quantification of vaccine-induced reduction in virus transmission. **Vaccine**, United States, v.12, p. 761-766, 1994.

DEJUCQ, N. & JEGOU, B. Viruses in the mammalian male genital tract and their effects on the reproductive system. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, United States, v.65, n.2, p.208–231, 2001.

DEKA RAMNEEK, D.; MAITI, N.K.; OBEROI, M.S. Detection of bovine herpesvirus-1 infection in breeding bull semen by virus isolation and polymerase chain reaction. **Rev. Off. Int. Epizoot.**, France, v.24, n.3, p.1085-1094, 2005.

DEL FAVA, C.; PITUCO, E.M.; GENOVEZ, M.E. **Diagnóstico diferencial de doenças da reprodução em bovinos: experiência do Instituto Biológico.** Biológico, São Paulo, v.69, n.2, p.73-79, 2007.

DEL MÉDICO ZAJAC, M.P.; PUNTEL, M.; ZAMORANO, P.I.; SADIR, A.M.; ROMERA, S.A. BoHV-1 vaccine induces cross-protection against BoHV-5 disease in cattle. **Res. Vet. Sci.**, England, v.81, p.327–334, 2006.

DERUELLE, M.J.; DEN BROEKE, C.V.; NAUWYNCK, H.J.; METTENLEITER, T.C.; FAVOREEL, H.W. Pseudorabies virus US3- and UL49.5-dependent and -independent downregulation of MHC I cell surface expression in different cell types. **Virology.**, United States, v.395, p.172–181, 2009.

DIALLO, I.S.; HEWITSON, G.R.; HOAD, J.; TURNER, S.; CORNEY, B.G.; RODWELL, B.J. Isolation of bovine herpesvirus type 5 from the semen of a healthy bull in Australia. **Aust. Vet. J.**, Austrália, v.88, n.3, p.93-5, 2010.

DIAS, M.M. **Análise da soroprevalência do Herpesvírus bovino tipo 1 e do cortisol sérico em diferentes situações de manejo no Rio Grande do Sul.** Porto Alegre: 2006. 84 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias – Virologia) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

DIEFFENBACH, C.W. & DVEKSLER, G.S. PCR primer. **A laboratory manual.** CSHL Press. p.37-61; 133-141, 1995.

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

EDWARDS, S.; NEWMAN, R. H.; WHITE, H. The virulence of British isolates of bovid herpesvirus 1 in relationship to viral genotype. **British Vet. J.**, England, v.147, p.216-231, 1991.

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

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

ENGELS, M.; STECK, F.; WYLER, R. Comparison of the genomes of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis. **Arch. Virol.**, Austria v.67, p.169-174, 1981.

ESTEVEES, P.A. **Desenvolvimento de um ELISA com antígeno recombinante específico para a detecção de anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1)**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias. UFRGS. Porto Alegre, p.100, 2001.

ESTEVEES, P.A.; SPILKI, F.R.; FRANCO, A.C.; SILVA, T.C.; OLIVEIRA, E.A.S.; MOOJEN, V.; ESMERALDINO, A.M.; ROEHE, P.M. Bovine herpesvirus type 5 in the semen of a bull not exhibiting clinical signs. **Vet. Rec.**, England, v.152, p.658-659, 2003

FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. **Virus Taxonomy**. The eighth report. Academic Press, San Diego, p.1162, 2004.

FLORES, E.F.; OSORIO, F.A.; ZANELLA, E.L.; KIT, S.; KIT, M. Efficacy of a deletion mutant bovine herpesvirus-1 (BHV-1) vaccine that allows serologic differentiation of vaccinated from naturally infected animals. **J. Vet. Diagn. Invest.**, Unites States, v.5, n.4, p.534-40, 1993.

FLORES, E.F.; DONIS, R.O. Isolation of a mutant MDBK cell line resistant to bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection due to a block in viral entry. **Virology**, United States, v.208, p.565-575, 1995.

FRANCO, A.C., RIJSEWIJK, F.A.M., FLORES, E.F., WEIBLEN, R., ROEHE, P.M.. Construction and characterization of a glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus type 1.2 strain isolated in Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, Brasil, v. 33, p. 274 – 278, 2002a.

FRANCO A.C; SPILKI, F.R.; ESTEVES, P.A.; LIMA, M.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F.; RIJSEWIJK, F.A.M.; ROEHE, P.M. A Brazilian glycoprotein E-negative bovine herpesvirus type 1.2 a (BHV-1.2 a) mutant is attenuated for cattle and induces protection against wild-type virus challenge. **Pesq. Vet. Bras.**, Brasil, v. 22, p. 135-140, 2002b.

FRANCO, A.C.; HÜBNER, S.O.; OLIVEIRA, A.P.; BATISTA, H.B.C.R.; ROEHE, P.M.; Rijsewijk, F.A.M. Construction and Characterization of a Bovine Herpesvirus 5 Mutant with a Deletion of the gl, gE and US9 Genes. **Braz. J. Microbiol.**, Brasil, v.38, p.667-673, 2007.

FRANCO, A.C. & ROEHE, P.M. Herpesviridae. In: FLORES, E. (org.). **Virologia Veterinária**: Editora UFSM, p.581-616, 2007.

GIBBS, E.P.J. & RWEYEMAMU M.M. Bovine herpesviruses: Part I. **Vet. Bulletin.**, United States, v.47, p.317–343, 1977.

GOMES, L.I.; ROCHA, M.A.; SOUZA, J.G.; COSTA, E.A.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F. Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) in bull semen: amplification and sequence analysis of the US4 gene. **Vet Res Commun.**, Netherlands, v.27, n.6, p.495-504, 2003.

GRANZOW, H., KLUPP, B.G., FUCHS, W., VEITS, J., OSTERRIEDER, N. & METTENLEITER, T.C. Egress of Alphaherpesviruses: Comparative Ultrastructural Study. **J. Virol.**, United States, v.75, n.8, p.3675-3684, 2001.

GRIFFIN, B.D.; VERWEIJ, M.C.; WIERTZ, E.J. Herpesviruses and immunity: the art of evasion. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.143, n.1, p.89-100, 2010.

HALL, W.T.K.; SIMMONS, G.C.; FRENCH, E.L.; SNOWDON, W.A.; ASDELL, M. The pathogenesis of encephalitis caused by the infectious bovine rhinotracheitis. **Aust. Vet. J.**, Australia, v.42, p.229-237, 1966.

HANSEN, T.H. & BOUVIER, M. MHC class I antigen presentation: learning from viral evasion strategies. **Nat. Rev. Immunol, England**, v.9, p.503-513, 2009.

HEILEIN, A.; METZLER, A. E.; WEIBLEN, R.; BERRIOS, P.; SCHUDEL, A.A.; RODRIGUEZ, M. Molecular characterization of south american bovine herpesvírus-1 isolates with monoclonal antibodies and SDS-PAGE. **J. Vet. Med. B**, Germany, v.40, p.125-130, 1993.

HOLZ, C.L.; CIBULSKI, S.P.; TEIXEIRA, T.F.; BATISTA, H.B.C.R.; CAMPOS, F.S.; SILVA, J.R.; VARELA, A.P.M.; CENCI, A.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. Prevalência de herpesvírus bovinos tipos 1 e/ou 5 no Estado do Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras.**, Brasil, v.29, n.9, p.767-773, 2009;

HONDA, K. & TANIGUCHI, T. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. **Nat. Rev. Immunol.**, United Kingdom, v.6, p.644-658, 2006 | doi:10.1038/nri1900

ICTVdB^a (International Committee of Taxonomy of Viruses). ICTVdB Management. 00.031. Herpesviridae - *The Universal Virus Database*, version 4. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/> (Acesso: Dezembro de 2010).

ICTVdB^b (International Committee of Taxonomy of Viruses) Disponível em: http://talk.ictvonline.org/files/ictv_documents/m/msl/1231.aspx (Acesso: Dezembro de 2010).

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

JONES, C. Alphaherpesvirus latency: its role in disease and survival of the virus in nature. **Adv. Virus. Res.**, United States, v.51, n.1, p.47–99, 1998.

JONES, C.; GEISER, V.; HENDERSON, G.; JIANG, Y.; MEYER, F.; PEREZ, S.; ZHANG, Y. Functional analysis of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) genes expressed during latency. **Vet. Microbiol.**, Netherlands., v.13, p.199–210, 2006.

JONES, C. & CHOWDHURY, S. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. **Anim. Health Res. Rev.**, England, v.8, n.2, p.187-205, 2008.

JONES, C. & CHOWDHURY, S. Bovine Herpesvirus Type 1 (BHV-1) is an Important Cofactor in the Bovine Respiratory Disease Complex. **Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.**, United States, v.26, p.303–321, 2010.

JÖNS, A.; GRANZOW, H.; KUCHLING, R.; METTENLEITER, T.C. The UL49.5 Gene of Pseudorabies Virus Codes for a O-Glycosylated Structural Protein of the Viral Envelope. **J. Virol.**, United States, v.70, n.2, p.1237–1241, 1996.

JORDAN, M.; SCHALLHORN, A.; WURM, F.M. Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium phosphate precipitate formation. **Nucleic Acids Res.**, United Kingdom, v.24, p.596–601, 1996.

JORDAN, M. & WURM, F. Transfection of adherent and suspended cells by calcium phosphate. **Methods**, United States, v.33, p.136–143, 2004.

KAASHOEK, M.; MOERMANN, A.; MADIC, J.; RIJSEWIJK, F.A.M.; QUAK, J.; GIELKENS, A.L.J.; VAN OIRSCHOT, J.T. A conventionally attenuated glycoprotein E negative strain of bovine herpesvirus type 1 is an efficacious and safe vaccine. **Vaccine**, v.12, p. 439-444, 1994.

KAASHOEK, M.; MOERMANN, A.; MADIC, J.; WEERDMEEESTER, K.; MARISVELDHUIS, M.A.; RIJSEWIJK, F.A.M.; VAN OIRSCHOT, J.T. An inactivated vaccine based on a glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus 1 induces protective immunity and allows serological differentiation. **Vaccine**, v.13, p.342-346, 1995.

KAASHOEK, M.J.; RIJSEWIJK, F.A.M.; RUULS, R.C.; KEIL, G.M.; THIRY, E.; PASTORE, P.P.; VAN OIRSCHOT, J.T. Virulence, immunogenicity and reactivation of bovine herpesvirus 1 mutants with a deletion in the gC, gG, gI, gE, or in both the g1 and gE gene. **Vaccine**, v.16, n.8, p.802-809, 1998.

KAHRS, R.F. (Ed.), Infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis, p. 159–170. In: **Viral Diseases of Cattle**. Iowa State University Press, Ames, IA, 2001.

KALTHOFF, D.; KÖNIGA, P.; TRAPPB, S.; BEER, M. Immunization and challenge experiments with a new modified live bovine herpesvirus type 1 marker vaccine prototype adjuvanted with a co-polymer. **Vaccine**, Unites States, v.28, n.36, p.5871-5877, 2010.

KIMMAN, T.G. Comparative efficacy of three doses of the genetically engineered Aujeszky's disease virus vaccine strain 783 in pigs with maternal antibodies. **Vaccine**, v.10, p.363-365, 1992.

KIRKLAND, P.D.; POYNTING, A.J.; GU, X.; DAVIS, R. J. Infertility and venereal disease in cattle inseminated with semen containing bovine herpesvirus type 5. **Vet. Rec.**, England, v.165, p.111-113, 2009.

KOPPERS-LALIC, D.; RIJSEWIJK, F.A.M.; VERSCHUREN, S.B.E.; VAN GAANS-VAN DEN BRINK, J.A.M.; NEISIG, A.; RESSING, M.E.; NEEFJES, J.; WIERTZ, E.J.H.J. The UL41-encoded virion host shutoff (vhs) protein and vhsindependent mechanisms are responsible for down-regulation of MHC class I molecules by bovine herpesvirus 1. **J. Gen. Virol.**, England, v.82, p.2071-2081, 2001.

KOPPERS-LALIC, D.; RYCHLOWSKI, M.; VAN LEEUWEN, D.; RIJSEWIJK, F. A. M.; RESSING, M.E.; NEEFJES, J.J.; BIENKOWSKA-SZEWCZYK, K.; WIERTZ, E.J.H.J. Bovine herpesvirus 1 interferes with TAP-dependent peptide transport and intracellular trafficking of MHC class I molecules in human cells. **Arch. Virol.**, Austria, v.148, p. 2023–2037, 2003.

KOPPERS-LALIC, D.; REITS, E.A.J.; RESSING, M.E.; LIPINSKA, A.D.; ABELE, R.; KOCH, J.; REZENDE, M.M.; ADMIRAAL, P.; VAN LEEUWEN, D.; BIENKOWSKA-SZEWCZYK, K.; METTENLEITER, T.C.; RIJSEWIJK, F.A.M.; TAMPÉ, R.; NEEFJES, J.; WIERTZ, E.J.H.J. Varicelloviruses avoid T cell recognition by UL49.5-mediated inactivation of the transporter associated with antigen processing. **PNAS**, United States, v.102, n.14, p.5144–5149, 2005.

KOPPERS-LALIC, D.; VERWEIJ, M.C.; LIPINSKA, A.D.; WANG, Y.; QUINTEN, E.; REITS, E.A.; KOCH, J.; LOCH, J.; REZENDE, M.M.; DAUS, F.; BIENKOWSKA-SZEWCZYK, K.; OSTERRIEDER, N.; METTENLEITER, T.C.; HEEMSKERK, M.H.M.; TAMPÉ, R.; NEEFJES, J.J.; CHOWDHURY, S.I.; RESSING, M.E.; RIJSEWIJK, F.A.M.; WIERTZ, E.J.H.J. Varicellovirus UL49.5 proteins differentially affect the function of the transporter associated with antigen processing, TAP. **PLoS Pathog.**, United States, v.4, n.5, e1000080. doi:10.1371/journal.ppat.1000080, 2008.

KUPFERSCHMIED, H.U.; KIHM, U.; BACHMANN, P.; MÜLLER, K.H.; ACKERMANN, M. Transmission of IBR/IPV virus in bovine semen: A case report. **Theriogenology**, United States, v.25, p.439-443; 1986.

LEHMANN, D.; SODOYER, R.; LETERME, S.; CREVAT, D. Improvement of serological discrimination between herpesvirus-infected animals and animals vaccinated with marker vaccines. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.86, p.59-68, 2002.

LEMOS, R.A.A. **Enfermidades do Sistema Nervoso de Bovinos de Corte das regiões Centro-oeste e Sudeste do Brasil**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2005. 149 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, 2005.

LIANG, X.; TANG, M.; MANNS, B.; BABIUK, L.A.; ZAMB, T.J. Identification and deletion mutagenesis of the Bovine herpesvirus 1 dUTPase gene and a gene homologous to Herpes Simplex Virus UL49.5. **Virology.**, United States, v.195, p42-50, 1993.

LIANG, X.; CHOW, B.; RAGGO, C.; BABIUK, L.A. Bovine herpesvirus 1 UL49.5 homolog gene encodes a novel viral envelope protein that forms a disulfide-linked complex with a second virion structural protein. **J. Virol.**, United States, v.70, n.3, p.1448-1454, 1996.

LIPÍŃSKA, A.D.; KOPPERS-LALIC, D.; RYCHŁOWSKI, M.; ADMIRAAL, P.; RIJSEWIJK, F.A.M.; BIENKOWSKA-SZEWCZYK, K.; WIERTZ, E.J.H.J. Bovine herpesvirus 1 UL49.5 protein inhibits the transporter associated with antigen processing despite complex formation with glycoprotein M. **J. Virol.**, United States, v.80, n.12, p.5822-5832, 2006.

LOCH, S. & TAMPÉ, R. Viral evasion of the MHC class I antigen-processing machinery. **Pflugers Arch - Eur J Physiol, German**, v.451, p.409-417, 2005.

LOCH, S.; KLAUSCHIES, F.; SCHÖLZ, C.; VERWEIJ, M.C.; WIERTZ, E.J.H.J.; KOCH, J.; TAMPÉ, R. Signaling of a varicelloviral factor across the endoplasmic reticulum membrane induces destruction of the peptide-loading complex and immune evasion. **J. Biol Chemistry.**, United States, v.283, n.19, p. 13428–13436, 2008.

LUDWIG, H. In: Roisman, B: **The herpesviruses**. New York: Plenum Press, 1983.

MADIN, S.H.; MCKERCHER, D.G.; YORK, C.J. Isolation of the infectious bovine rhinotracheitis virus. **Science**, United States, v.124, p.721-722, 1956.

MARS, M.H.; DE JONG, M.C.; VAN MAANEN, C.; HAGE, J.J.; VAN OIRSCHOT, J.T. Airborne transmission of bovine herpesvirus 1 infections in calves under field conditions. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.76, p.1–13, 2000.

MARS, M.H.; DE JONG, M.C.; FRANKEN, P.; VAN OIRSCHOT, J.T. Efficacy of a live glycoprotein E-negative bovine herpesvirus 1 vaccine in cattle in the field. **Vaccine**, Netherlands, v.19, n.15-16, p.1924-1930, 2001.

MCGEOCH, D.J.; RIXON, F.J.; DAVISON, A.J. Topics in herpesvirus genomics and evolution. **Virus Res.**, Netherlands, v.117, p.90–104, 2006.

MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o Herpesvírus bovino tipo 1, decorrente de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.2, p.347-350, 2000.

METTENLEITER, T. C. Herpesvirus assembly and egress. **J. Virol.**, United States, v.76, n.4, p.1537-1547, 2002.

METTENLEITER, T.C. Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread. **Virus Res.**, Netherlands, v.92, n.2, p.197-206, 2003.

METTENLEITER, T.C.; KLUPP, B.G.; GRANZOW, H. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. **Curr. Opin. Microbiol.**, England, v.9, p.423-429, 2006.

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

MEYER, G.; LEMAIRE, M.; ROS, C.; BELAK, K.; GABRIEL, A.; CASSART, D.; COIGNOUL, F.; BELAK, S.; THIRY, E. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. **Arch. Virol.**, Austria, v.146, n.4, p.633-52, 2001.

MILLER, J.M. & VAN DER MAATEN, M.J. Reproductive tract lesions in heifers after intrauterine inoculation with infectious bovine rhinotracheitis virus. **Am. J. Vet. Res.**, United States, v.45, n.4, p.790-794, 1984.

MILLER, J.M.; WHETSTONE, C.A.; BELLO, L.J.; LAWRENCE, W.C.; WHITBECK, J.C. Abortion in heifers inoculated with a thymidine kinasenegative recombinant of bovine herpesvirus 1. **Am. J. Vet. Res.**, United States, v.56, n.7, p.870-874, 1995.

MILLER, J.M., WHETSTONE, C.A. & VAN DER MAATEN, M.J. Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA. **Am J Vet Res.**, United States, v.52, p.458-61, 1991.

MISRA, V.; BABIUK, L.A.; DARCEL, C.Q. Analysis of bovine herpesvirus type 1 isolates by restriction endonuclease fingerprinting. **Arch. Virol.**, Austria, v.76, p.341–354, 1983.

MOYNAGH, P.N. TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF-kappaB pathway. **Trends Immunol.**, England, v.26, p.469–476, 2005.

MUYLKENS, B.; THIRY, J.; KIRTEN, F.S.; THIRY, E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Vet. Res.**, France, v.38, p.181-209, 2007.

NATARAJ, C.; EIDMANN, S.; HARIHARAN, M.J.; SUR, J.H.; PERRY, G.A.; SRIKUMARAN, S. Bovine herpesvirus 1 downregulates the expression of bovine MHC class I molecules. **Viral Immunol.**, United States, v.10, n.1, p.21-34, 1997.

NEUMANN, S.; KOVTUN, A.; DIETZEL, I.D.; EPPLE M.; HEUMANN, R. The use of size-defined DNA-functionalized calcium phosphate nanoparticles to minimise intracellular calcium disturbance during transfection. **Biomaterials**, England, v.30, p.6794–6802, 2009.

Northwestern. Disponível em:
<http://stdgen.northwestern.edu/stdgen/bacteria/prv/herpes.html> (Acesso em:
Dezembro, 2010).

OSÓRIO, F.A.; SRIKUMARAN, S.; RHODES, M.; CHRISTENSEN, D.; SRIKUMARAN, P. Detection of bovine herpesvirus-1-specific IgM using a capture enzyme immune assay with isotype-specific monoclonal antibodies. **J. Vet. Diagn. Invest.**, United States, v.1, p.139-145, 1989.

PASTORET, P.P. & THIRY, E. Diagnosis and prophylaxis of infectious bovine rhinotracheitis: the role of virus latency. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, England, v.8, p.35-42, 1985.

PASTORET, P.P.; AGUILAR-SETIEN, A.; BURTONBOY, G.; MAGER, J.; JETTEUR, P.; SCHOENAERS, F. Effect of repeated treatment with dexamethasone on the reexcretion pattern of infectious bovine rhinotracheitis virus and humoral immune response. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.4, p.149-159, 1979.

PEAPER, D.R. & CRESSWELL, P. Regulation of MHC Class I Assembly and Peptide Binding. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, United States, v.24, p.343-368, 2008.

PEREZ, S.E.; BRETSCHEIDER, G.; LEUNDA, M.R.; OSORIO, E.A.; FLORES, E.F.; ODEÓN, A.C. Primary infection, latency, and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. **Vet. Pathol.**, United States, v.39, n.4, p.437-44, 2002.

PIDONE, C.L.; GALOSI, C.M.; ECHEVERRIA, M.G.; NOSETTO, E.O.; ETCHEVERRIGARAY, M.E. Restriction Endonuclease Analysis of BHV-1 and BHV-5 Strains Isolated in Argentina. **J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health**, Germany, v.46, n.7, p.453-456, 1999.

QUINCOZES, C.G. **Prevalência e fatores de risco associados às infecções pelos herpesvírus bovino tipo 1 e 5 (BHV-1 e 5) e pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) nos rebanhos dos municípios de Santa Vitória do Palmar e Chuí.** Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2005. 117 f. Dissertação (Mestrado em Veterinária – Virologia) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, UFPEL, Pelotas, 2005.

QUINT, W.G.V.; GIELKENS, A.L.J.; BERNS, A.J.M; VAN OIRSCHOT, J.T.; CUYPERS, H.T. Construction and characterization of deletion mutants of pseudorabies virus: a new generation of "live" vaccines. **J. Gen. Virol.**, England, v.68, p.523-534, 1987.

RIET-CORREA, F.; Vidor, T.; Schild, A.L.; Mendez, M.C.. Meningoencefalite e necrose da córtex cerebral em bovinos causados por herpesvírus bovino-1. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v.9, p.13-16, 1989.

RIJSEWIJK, F. A. M.; KAASHOEK, M. J.; LANGEVELD, J. P. M.; MELOEN, R. J.; JUDEK, R.; BIENKOWSKA-SZEWCZYK, K.; MARIS-VELDHUIS, M. A.; VAN OIRSCHOT, J.T. Epitopes on glycoprotein C of bovine herpesvirus-1 (BoHV-1) that allow differentiation between BoHV-1.1 and BoHV-1.2 strains. **J. Gen. Virol.**, England, v.80, p.1477–1483, 1999.

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

ROCHA, M.A., BARBOSA, E.F., GUIMARÃES, S.E., DIAS NETO, E. & GOUVEIA, A.M. A high sensitivity-nested PCR assay for BoHV-1 detection in semen of naturally infected bulls. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.63, p.1-11, 1998.

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

ROEHE, P.M.; ALMEIDA, R.S.; TEIXEIRA, M.F.B.; ESTEVES, P.A.; OLIVEIRA, E.A.S.; PETZHOLD, S.A.; SILVA, T.C. Atualização no diagnóstico e controle de infecções por herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5). **Arq. Inst. Biol.** (São Paulo), Brasil, v.59, n.2, p.27-32, 1997b.

ROELS, S.; CHARLIER, G.; LETELLIER, C.; MEYER, G.; SCHYNTS, F.; KERKHOF, P.; THIRY, E.; VANOPDENBOSCH, E. Natural case of bovine herpesvirus 1 meningoencephalitis in an adult cow. **Vet. Rec.**, England, v.146, p.586-588, 2000.

ROIZMAN, B. & PELLETT, P.E. The Family Herpesviridae: A Brief Introduction, p. 2222-2229. In: Knipe, D.M. & Howley, P.M. (orgs): **Fields Virology**, 4^a ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, USA, 2001

ROIZMAN, B. & SEARS, A.E. An inquiry into the mechanisms of herpes simplex virus latency. **Annu. Rev. Microbiol.**, United States, v.41, p.543-71, 1987.

ROIZMAN, B.; DESROSIERS, R.C.; FLECKENSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON, A.C.; STUDDERT, M.J. The family Herpesviridae: an update. **Arch. Virol.**, Austria, v.123, n.3-4, p.425-448, 1992.

ROIZMAN, B.; GU, H.; MANDEL, G. The First 30 Minutes in the Life of a Virus - unREST in the Nucleus. **Cell Cycle**, United States, v.4, n.8, p.1019-1021, 2005.

ROY, I.; MITRA, S.; MAITRA, A.; MOZUMDAR, S. Calcium phosphate nanoparticles as novel non-viral vectors for targeted gene delivery. **Int. J. Pharm.**, Netherland, v.250, p.25-33, 2003.

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

SAMBROOK, J. & RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

Schölz, C. & Tampé, R. The Intracellular Antigen Transport Machinery TAP in Adaptative Immunity and Virus Escape Mechanisms. **J. Bioenerg. Biomembr.**, United States, v.37, n.6, p.509-515, 2005.

HARTIKKA, J., SAWDEY, M., CORNEFERT-JENSEN, F., MARGALITH, M., BARNHART, K., NOLASCO, M., VAHLSING, H.L., MEEK, J., MARQUET, M., HOBART, P., NORMAN, J., MANTHORPE, M. An improved plasmid DNA expression vector for direct injection into skeletal muscle. **Hum. Gene Ther.**, United States, v.7, p.1205-1217. 1996.

SCHUDEL, A.A.; CARRILLO, B.J.; WYLER, R.; METZLER, A.E. Infections of calves with antigenic variants of Bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurological disease. **Zentralbl. Veterinarmed. B**, Germany, v.33, p.303-310, 1986.

SILVA, T.C.S.; OLIVEIRA, E.A.S.; MELO, S.V.; SPILKI, F.R.; ESTEVES, P.A.; SCHMIDT, C.S.R.; MOOJEN, V.; ESMERALDINO, A.M.; ROEHE, P.M. Molecular and antigenic characterization of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) isolated from semen. **Virus Rev. Res.** Brasil, v.5, n.2, p.116, 2000 (resumo).

SILVA, A.D.; SPILKI, F.R.; FRANCO, A.C.; ESTEVES, P.A.; HÜBNER, S.O.; DRIEMEIER, D.; OLIVEIRA, A.P.; RIJSEWIJK, F.; ROEHE, P.M. Vaccination with a gE-negative bovine herpesvirus type 1 vaccine confers insufficient protection to a bovine herpesvirus type 5 challenge. **Vaccine**, Netherlands, v.24, p.3313-3320, 2006.

SILVA, L.F.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Imunogenicidade de vacinas comerciais inativadas contra o herpesvírus bovino tipo 1. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.5, p.1471-1474, 2007a.

SILVA, S.S.; BRUM, M.C.S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas

no Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987-2006). **Pesq. Vet. Bras.**, Brasil, v.27, n.10, p.403-408, 2007b.

SILVA, A.D.; FRANCO, A.C.; ESTEVES, P.A.; SPILKI, F.R.; ROEHE, P.M. Experimental infection of rabbits with a recombinant bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) gI, gE and US9-negative. **Pesq. Vet. Bras.**, Brasil, v.29, p.913-918, 2009.

SIX, A.; BANKS, M.; ENGELS, M.; BASCUNANA, C.R.; ACKERMANN, M. Latency and reactivation of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) in goats and of caprine herpesvirus 1 (CapHV-1) in calves. **Arch. Virol.**, Austria, v.146, p.1325-1335, 2001.

SMITS, C.B.; VAN MAANEN, C.; GLAS, R.D.; DE GEE, A.L.W.; DIJKSTRAB, T.; VAN OIRSCHOT, J.T.; RIJSEWIJK, F.A.M. Comparison of three polymerase chain reaction methods for routine detection of bovine herpesvirus 1 DNA in fresh bull semen. **J. Virol. Methods**, Netherlands, v.85, p.65-73, 2000.

SOUZA, V.F.; MELO, S.V.; ESTEVES, P.A.; SCHMIDT, C.S.R.; GONÇALVES, D.; SCHAEFER, R.; SILVA, T.C.; ALMEIDA, R.S.; VICENTINI, F.K.; FRANCO, A.C.; OLIVEIRA, E.A.S.; SPILKI, F.R.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F.; LEMOS, R.A.; ALFIERI, A.A.; PITUCO, E.M.; ROEHE, P.M. Monoclonal antibody characterization of bovine herpesviruses types 1 (BHV-1) and 5 (BHV-5). **Pesq. Vet. Bras.**, Brasil, v.22, p.13-18, 2002.

SPILKI F.R.; SILVA A.D.; HÜBNER S.; ESTEVES P.A.; FRANCO A.C.; DRIEMEIER D.; ROEHE P.M. Partial protection induced by a BoHV-1 recombinant vaccine against challenge with BoHV-5. **Ann. N Y Acad. Sci.**, United States, v.1026, p.247-50, 2004.

SPILKI, F.R.; ESTEVES, P.A.; SILVA, A.D.; FRANCO, A.C.; RIJSEWIJK, F.A.M.; ROEHE, P.M. A monoclonal antibody-based ELISA allows discrimination between responses induced by bovine herpesvirus subtypes 1 (BoHV-1.1) and 2 (BoHV-1.2). **J. Virol. Methods**, Netherlands, v.129, p.191-193, 2005.

STACZEK, J. Animal Cytomegaloviruses. **Microbiol. Rev.**, United States, v.54, n.3, p.247-265, 1990.

STRUBE, W.; AUER, S.; BLOCH, W.; HEINEN, E.; KRETZDORN, D.; RODENBACH, C.; SCHMEER, N. A gE deleted infectious bovine rhinotracheitis marker vaccine for use in improved bovine herpesvirus 1 control programs. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.53, p.181-189, 1996.

TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Herpesvírus bovino tipo 1: tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. **Semina: Cienc. Agr.**, Londrina, v.22, n.2, p.203-209, 2001.

TEIXEIRA, M.B.; ESTEVES, P.A.; COELHO, C.S.S.; SILVA, T.C.; OLIVEIRA, L.G.; ROEHE, P.M. Diferenças em níveis de anticorpos neutralizantes contra Herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) por testes de soroneutralização. **Pesqui. Vet. Gau.**, Brasil, v.4, n.1, p.61-65, 1998.

THIRY, J.; KEUSER, V.; MUYLKENS, B.; MEURENS, F.; GOGEV, S.; VANDERPLASSCHEN, A.; THIRY, E. Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. **Vet. Res.**, France, v.37, p.169-190, 2006.

TRAPP, S.; KÖNIG, P.; BEER, M. Biology of bovine herpesviruses. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr.**, Germany, v.116, n.5-6, p.171-8, 2003 (resumo).

TURIN, L.; RUSSO, S.; POLI, G. BoHV-1: New Molecular Approaches to Control a Common and Widespread Infection. **Mol. Med.**, United States, v.5, p.261-284, 1999.

UniProt. Disponível em <http://www.uniprot.org/uniprot/Q77CE4> , (Acesso: Janeiro, 2011).

VAN ENGELENBURG, F.A.; MAES, R.K.; VAN OIRSCHOT, J.T.; RIJSEWIJK, F.A.M. Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. **J. Clin. Microbiol.**, United States, v.31, n.12, p.3129-3135, 1993.

VAN ENGELENBURG, F.A.C.; KAASHOEK, M.J.; RIJSEWIJK, F.A.M.; VAN DEN BURG, L.; MOERMAN, A.; GIELKENS, A.L.J.; VAN OIRSCHOT, J.T. A glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1 is avirulent in calves. **J. Gen. Virol.**, England, v.75, p. 2311-2318, 1994.

VAN ENGELENBURG, F.A.; KAASHOEK, M.J.; VAN OIRSCHOT, J.T.; RIJSEWIJK F.A. A glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1 infects the same limited number of tissues in calves as wild-type virus, but for a shorter period. **J. Gen. Virol.**, England, v.76, p.2387-2392, 1995.

VAN OIRSCHOT, J.T.; STRAVER, P.J.; VAN LIESHOUT, J.A.H.; QUAK, J.; WESTENBRINK, F.; VAN EXSEL, A.C.A. A subclinical infection of bulls with bovine herpes virus type 1 at an artificial insemination centre. **Vet. Rec.**, England, v.132, n.2, p.32-35, 1993.

VAN OIRSCHOT, J.T. Bovine herpesvirus 1 in semen of bulls and the risk of transmission: a brief review. **Vet Q.**, Netherlands, v.17, n.1, p.29-33, 1995.

VAN OIRSCHOT J.T. Diva vaccines that reduce virus transmission. **J. Biotechnol.**, Netherlands, v.73, n.2-3, p.195-205, 1999.

VAN OIRSCHOT, J.T.; RZIHA, H.J.; MOONEN, P.J.L.M.; POL, J.L.A.; VAN ZAANE, D. Differentiation of serum antibodies from pigs vaccinated or infected with Aujeszky's disease virus by a competitive enzyme immunoassay. **J. Gen.Virol.**, England, v.67, p.1179-1182, 1986.

VAN OIRSCHOT, J.T.; GIELKENS, A.L.J.; MOORMANN, R.J.M.; BERNS, A.J.M. Marker vaccines, virus protein-specific antibody assays and the control of Aujeszky's disease. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.23, p.85-101, 1990.

VAN OIRSCHOT J.T.; KAASHOEK M.J.; RIJSEWIJK F.A. Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.53, n.1-2, p.43-54, 1996.

VAN OIRSCHOT, J.T.; KAASHOEK, M.J.; MARIS-VELDHUIS, M.A.; WEERDMEESTER, K.; RIJSEWIJK, F.A. An enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against glycoprotein gE of bovine herpesvirus 1 allows differentiation between infected and vaccinated cattle. **J. Virol. Methods**, Netherlands, v.67, n.1, p.23-34, 1997.

VARELA, A.P.M.; HOLZ, C.L.; CIBULSKI, S.P.; TEIXEIRA, T.F.; ANTUNES, D.A.; FRANCO, A.C.; ROEHE, L.R.; OLIVEIRA, M.T.; CAMPOS, F.S.; DEZEN, D.; CENCI, A.; BRITO, W.D.; ROEHE, P.M. Neutralizing antibodies to

bovine herpesvirus types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) and its subtypes. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.142,p.254-260, 2010.

VERWEIJ, M.C.; KOPPERS-LALIC, D.; LOCH, S.; KLAUSCHIES, F.; DE LA SALLE, H.; QUINTEN, E.; LEHNER, P.J.; MULDER, A.; KNITTER, M.R.; TAMPÉ, R.; KOCH, J.; RESSING, M.E.; WIERTZ, E.J.H.J. The Varicellovirus UL49.5 Protein Blocks the Transporter Associated with Antigen Processing (TAP) by Inhibiting Essential Conformational Transitions in the 6+6 Transmembrane TAP Core Complex. **J. Immunol.**, United States, v.181, p.4894-4907, 2008.

VERWEIJ, M.C..**Unmasking the masters of evasion: TAP inhibition by varicellovirus UL49.5 proteins.** Tese de Doutorado. Leiden University Medical Center. Leiden, p.280, 2010a

VERWEIJ, M.C.; LIPINSKA, A.D.; KOPPERS-LALIC, D.; VAN LEEUWEN, W.F.; COHEN, J.I.; KINCHINGTON, P.R.; MESSAOUDI, I.; BIENKOWSKA-SZEWCZYK, K.; RESSING, M.E.; RIJSEWIJK, F.A.M.; WIERTZ, E.J.H.J. The capacity of UL49.5 proteins to inhibit TAP is widely distributed amongst members of the genus Varicellovirus. **J. Virol.**, United States, doi:10.1128/JVI.01621-10, 2010b

VIEIRA, S.; BRITO, W.M.E.D.; SOUZA, W.J.; ALFAIA, B.T.; LINHARES, D.C.L. Anticorpos para o Herpesvírus bovino 1 (BHV-1) em bovinos do estado de Goiás. **Ciê. An. Bras.**, Goiás, v.4, n.2, p.131-137, 2003.

VOGEL, F.S.F.; CARON, L.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; WINKELMANN, E.R.; MAYER, S.V.; BASTOS, R.G. Distribution of Bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous systems of latently experimentally infected calves. **J. Clin. Microbiol.**, United States, v.41, n.10, p.4512-4520, 2003.

WEIBLEN, R.; LOMBARDO DE BARROS, C.S.; CANABARRO, T.F.; FLORES, E. Bovine meningo-encephalitis from IBR virus. **Vet. Rec.**, England, v.124, n.3 p.666–667, 1989.

WEIBLEN, R.; KREUTZ, L. C.; CANABARRO, T. F.; SCHUCH, L. F.; REBELATTO, M. C. Isolation of bovine herpesvirus 1 from preputial swabs and semen of bulls with balanoposthitis. **J. Vet. Diagn. Invest.**, United States, v.4, n.3, p.341-343, 1992.

WELLENBERG, G.J.; MARS, M.H.; VAN OIRSCHOT, J.T. Antibodies against bovine herpesvirus (BHV) 5 may be differentiated from antibodies against BHV1 in a BHV1 glycoprotein E blocking ELISA. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.78, n.1, p.79-84, 2001.

WELLENBERG, G. J.; VAN DER POELB, W.H.M.; VAN OIRSCHOT, J.T. Viral infections and bovine mastitis: a review. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.88, n.1, p.27-45, 2002.

WELZEL, T.; RADTKE, I.; MEYER-ZAIKA, W.; HEUMANN, R.; EPPLE, M. Transfection of cells with custom-made calcium phosphate nanoparticles coated with DNA. **J. Mater. Chem.**, England, v.14, p.2213–2217, 2004.

WHITE, D.O. & FENNER, F.J. Herpesviridae: **Properties of Herpesviridae**. In: . Medical Virology, 4^a Ed. USA: Academic Press, p. 320-322, 1994.

WILD, P.; SCHRANER, E.M.; PETER, J.; LOEPFE, E.; ENGELS, M. Novel Entry Pathway of Bovine Herpesvirus 1 and 5. **J. Virol.**, United States, v.72, n.12, p.9561–9566, 1998.

WRATHALLA, A.E.; SIMMONSA, H.A.; VAN SOOM, A. Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilisation with virus-infected semen next term. **Theriogenology.**, United States, v.65, n.2, p.247-274, 2006.

WU, S. X.; ZHU, X.P.; LETCHWORTH, G. J. Bovine Herpesvirus 1 Glycoprotein M Forms a Disulfide-Linked Heterodimer with the UL49.5 Protein, **J. Virol.**, United States, v.72, n.4, p.3029-3036, 1998.

WYLER, R.; ENGELS, M.; SCHWYZER, M. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV-1). In: G. Wittman and Y. Becker (ed.), **Herpesvirus diseases of cattle, horses, and pigs**. Developments in veterinary virology. Kluwer Academics Publishers, Boston, p.1-72, 1989.

8. APÊNDICE

Detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in semen from Brazilian bulls.

Theriogenology, v.75(6), p. 1139-1145, 2011.

Detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in semen from Brazilian bulls

M.T. Oliveira^{a,*}, F.S. Campos^a, M.M. Dias^a, F.A. Velho^a, G.E. Freneau^b,
W.M.E.D. Brito^b, F.A.M. Rijsewijk^a, A.C. Franco^a, P.M. Roehe^{a,c}

^a Virology Laboratory, Microbiology Department, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, CEP 90050-170, Rio Grande do Sul (RS), Brazil

^b Virology Laboratory, Microbiology Department, Federal University of Goiás (UFG), Rod GO 080 Q Área, s/n Lt 1. Campus Universitário, Goiânia, CEP 74001-970, Goiás (GO), Brazil

^c FEPAGRO, Animal Health, Institute for Veterinary Research “Desidério Finamor” (IPVDF), Estrada do Conde 6000, Eldorado do Sul, CEP 92990-000, Rio Grande do Sul (RS), Brazil

Received 1 April 2010; received in revised form 24 October 2010; accepted 15 November 2010

Abstract

Bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) are important pathogens of the respiratory and genital tract of cattle and may also affect the central nervous system and cause meningoencephalitis. Both virus types are estimated to be widely distributed in Southern Brazil. In the present study, BoHV-1 and/or BoHV-5 DNA were detected in bovine semen samples from two states of Brazil by two species-specific nested polymerase chain reactions (nPCRs). These nPCRs were used to assay 53 samples of fresh semen and 23 samples of frozen semen from breeding bulls. Viral DNA was detected in all 76 semen samples: all were positive for BoHV-5, whereas 34 of these were positive for BoHV-1 as well. Moreover, in five fresh and in 13 frozen semen samples—of a total number of 40 samples suitable for virus isolation—contagious BoHV-1 and/or BoHV-5 virus were detected. In conclusion, that both BoHV-1 and BoHV-5 were detected in bovine semen in Brazil highlighted the importance of examining bull semen in search for both agents to reduce the risk of transmitting these viruses.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: BoHV-1; BoHV-5; Bull semen; Herpesvirus; Nested PCR

1. Introduction

Bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) are pathogens of major veterinary importance, responsible for substantial economical losses worldwide [1–3]. Bovine herpesvirus 1 causes predominantly respiratory and genital disease in cattle [4], although it can also be associated with meningoencephalitis [5]. The closely related BoHV-5 is a major cause of viral meningo-

encephalitis in cattle, but can also infect the genital tract [6]. Both viruses have been associated with reproductive failure, e.g., early embryonic death and abortions, which probably account for the most significant losses linked to BoHV-1 and BoHV-5 [7–9]. Due to their high degree of antigenic similarity, BoHV-1 and BoHV-5 are highly cross-reactive in standard serological assays. Therefore, type-specific prevalences have not, to date, been determined [10,11].

It has been estimated that BoHV-1 infects 50–90% of the Brazilian cattle population [12,13]. However, the prevalence of BoHV-5 infections, as well as how much

* Corresponding author. Tel.: +555133083655; fax: +5555133084111.
E-mail address: marthatoliveira@gmail.com (M. Oliveira).

of the estimated BoHV-1 prevalence is actually due to BoHV-5 is unknown. Like other alphaherpesviruses, BoHV-1 and BoHV-5 can cause latent infections in trigeminal and paravertebral ganglia, from where they may eventually be reactivated [14,15]. During episodes of reactivation, viral shedding may take place and lead to contamination of semen [7,16].

We recently conducted a study to detect latent BoHV-1 and or BoHV-5 DNA in trigeminal ganglia of slaughtered cattle [17]. The objective of the present study was to identify BoHV-1 and BoHV-5 DNA in samples of semen from breeding bulls employing two species-specific nPCRs.

2. Materials and methods

2.1. Semen samples

Fifty-three samples of fresh semen were obtained from bulls from a farm in the Brazilian state Rio Grande do Sul (34) and a farm near the city of Goianópolis in the state Góias (19). In addition, 23 frozen semen samples were obtained from an artificial insemination center in Rio Grande do Sul. The bulls from the two farms were Nelore (Zebu) and ranged from 2–3 y old, whereas the AI centre bulls were *Bos taurus* (e.g., Angus, Hereford and Holstein) and ranged from 3–7 y. Although no serological data regarding BoHV-1 or BoHV-5 infections were available for any of these bulls, none showed obvious signs of a BoHV infection.

2.2. DNA extraction from fresh and frozen semen

Extraction of DNA from fresh and frozen semen was performed as described by van Engelenburg and others [16] and Smits and others [18], with small modifications. In brief, 50 μL of each semen sample were centrifuged (Eppendorf centrifuge 5415C) at 8500 g for 10 min. To each supernatant, 150 μL of TE buffer [10 mM Tris (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), pH 7.5; 1 mM EDTA (Invitrogen)] were added. Samples were then mixed with 22 μL of 10% sodium dodecyl sulfate (SDS, Promega, Madison, WI, USA), 0.5 μL transfer RNA (10.3 mg/mL, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA), 1 μL proteinase K (20 mg/mL, USB Corporation, Cleveland, OH, USA), 200 molecules of an internal control (IC) plasmid [17] and incubated at 37 °C for 1 h. Extraction of DNA was performed by adding one volume of buffer-saturated phenol (pH 8.0, Invitrogen) and 13 μL of 5 M NaCl (Nuclear, Diadema, SP, Brazil), followed by incubation at room temperature for 30

min. After centrifugation at 8500 g for 12 min, 0.6 volumes of isopropanol (Pro Analysis, Industria Quimica Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) were added to the supernatant. Subsequently the mixture was incubated at -20 °C for 30 min and centrifuged for 20 min at 8500 g. Pellets were resuspended in 100 μL of TE buffer and 1 mL of n-butanol (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) was added. After vigorous mixing, the samples were centrifuged at 8500 g for 10 min. The DNA containing pellets were air dried and resuspended in 50 μL TE.

2.3. Nested polymerase chain reactions (nPCRs)

The nPCRs were performed as described by Campos and others [17]. In brief, for the first PCR, primers were used that recognize both BoHV-1 and BoHV-5 and were expected to give rise to amplicons of 575 bp (BoHV-1) and 572 bp (BoHV-5). To each reaction, 200 molecules of an internal control (IC) template were added to detect false negative reactions. The IC template is a plasmid containing the amplified region of BoHV-1, with a 135 bp internal deletion leaving the primer binding sites intact. The IC template gives an amplification product of 440 bp. To identify false positive reactions, three negative control samples, i.e., samples with 50 ng of BoHV negative bovine genomic DNA, were added to each set of 12 PCRs. Reactions were performed in a Mastercycler Eppendorf thermocycler and the products were analyzed by electrophoresis on a 1.5% agarose (Invitrogen) gel stained with ethidium bromide (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Promega) and compared with pUC19 x *Hinf*I (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) as a molecular weight marker.

To differentiate between BoHV-1 and BoHV-5, the products of the first PCR were used in two species-specific nPCRs, as described by Campos and others [17]. These nPCRs give rise to a BoHV-1 specific product of 161 bp and a BoHV-5 specific product of 236 bp.

2.4. Virus isolation from semen

Virus isolation was carried out following an OIE (World Organization for Animal Health) standard protocol [19]. In short, the semen samples were diluted in 90% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Grand-Island, NY, USA) supplemented with amphotericin B (2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Cristália, Itapira, SP, Brazil), enrofloxacin (10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Baytril[®], Bayer, São Paulo, SP, Brazil) and gentamicin (50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Gentamax[®], Marcolab, Duque de Caxias, RJ, Brazil). Samples were added in quadruplicate into 96-well cell culture plates seeded

24 h prior with CRIB cells (Madin Darby bovine kidney cells resistant to BVDV) [20]. For each sample, 50 μL were added per well. Samples were incubated on cells for 1 h at 37 °C for adsorption. Subsequently, monolayers were gently washed twice with 100 μL of Eagle's minimal essential medium (EMEM, Gibco) supplemented with 5% FBS (Gibco) plus antibiotics as above, and replenished with a fresh volume (100 μL /well) of medium. Plates were then incubated for 72 h at 37 °C in a 5% CO_2 atmosphere (Forma Scientific). Negative control wells in each plate were mock infected with medium only, following the same protocol. Monolayers of CRIB cells were examined and compared with negative control cells for cytopathic effect (CPE). When no CPE was observed, plates were frozen and thawed, the cell medium was harvested and inoculated into new culture plates. If no CPE was observed up to the third blind passage, a sample was considered negative for virus isolation.

2.5. Isolation of viral DNA and restriction enzyme analysis

Seven of the 18 CPE positive semen samples were submitted for DNA isolation to confirm the presence of BoHV virus and to determine the species (BoHV-1 or BoHV-5). Recovery of viral DNA from BoHV-1 or BoHV-5 infected cells was performed as described by Green and others [21] and Pignatti and others [22], with some modifications as follows. Each of the seven samples was used to inoculate a confluent monolayer of CRIB cells in a 75 cm^2 tissue culture flask. When CPE was evident in approximately 90% of the cell monolayer, the supernatant was removed and the remaining infected monolayer was treated with 5 mL of 2.5% trypsin (Gibco) and incubated at 37 °C for 5 min and harvested carefully so as not to disrupt the cells. Next, 5 mL of cold PBS [8.5 g of NaCl, 1.84 g of $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.26 g of $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, H_2O q.s.p. 1000 mL, pH 7.2] were added to the tissue culture flask to remove the residual cells and the 10 mL of cells were centrifuged for 10 min at 1000 g (Cientec CT 5000). The pellets were treated with 2 mL of lysis buffer [100 mM Tris-HCl (Invitrogen) pH 7.9, 100 mM EDTA (Invitrogen), 0.25% Triton X-100 (Roche Diagnostics Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brazil)]. Then this solution was mixed gently, incubated for 10 min at room temperature and NaCl was added to a final concentration of 0.2 M. Next, this solution was centrifuged for 10 min at 1000 g to pellet the cell nuclei. To the supernatant 5 μL proteinase K (20 mg /mL, USB Corporation) and 40 μL 10% SDS were added to final

concentrations of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 0.2%, respectively. This mixture was incubated 1 h at 56 °C followed by a phenol extraction and an isopropanol precipitation. The obtained pellet was resuspended in 10 μL of TE (10 mM Tris-HCl pH 7.9 and 1 mM EDTA) per tube supplemented with 3 μL of RNase (20 mg / mL, Qiagen Inc., Valencia, CA, USA). After incubation for 15 min at 37 °C, 3 to 7 μL (depending on the concentration of viral DNA) were used for restriction enzyme analysis (REA) with HindIII enzyme (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), which allows differentiation between BoHV-1 and 5. The reactions were analyzed by an overnight electrophoresis on 0.7% agarose (Invitrogen) gel stained with ethidium bromide (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and compared with Lambda DNA (Promega) x HindIII molecular weight marker.

3. Results

3.1. Detection of BoHV-1 and BoHV-5 DNA in semen samples

The 57 semen samples from Rio Grande do Sul (34 fresh semen samples from a breeding farm and 23 frozen semen samples from an artificial insemination (AI) centre) and 19 fresh semen samples from a breeding farm in the state Goiás, were all subjected to a first PCR, based on primers that recognized both BoHV-1 and BoHV-5. The products of this first PCR, however, were not always visible on the agarose gel, perhaps due to the low amount of viral DNA in the sample (Fig. 1A). The products of the first PCR were subjected to two species-specific nPCRs that were able to discriminate between DNA of BoHV-1 and DNA of BoHV-5. The BoHV-1 specific nPCR gave rise to a product of 161 bp, whereas the BoHV-5 specific nPCR gave rise to a product of 236 bp (Fig. 1B).

All 76 semen samples were positive for BoHV-5 DNA, whereas 34 (44.7%) of these were also positive for BoHV-1 (Table 1). Of the 57 semen samples collected from bulls of European breeds in the state of Rio Grande do Sul, 25 were positive for both BoHV-1 and BoHV-5. Among the semen samples of the AI center, fewer samples were positive for both virus species. Of the 23 frozen semen samples from the AI centre, five were positive for both virus species. Conversely, of the 34 fresh semen samples of a farm in this state 20 samples were positive for both BoHV-1 and BoHV-5. Of the 19 fresh semen samples collected from bulls of the Zebu breed in the state of Goiás, nine samples were positive for both BoHV-1 and BoHV-5.

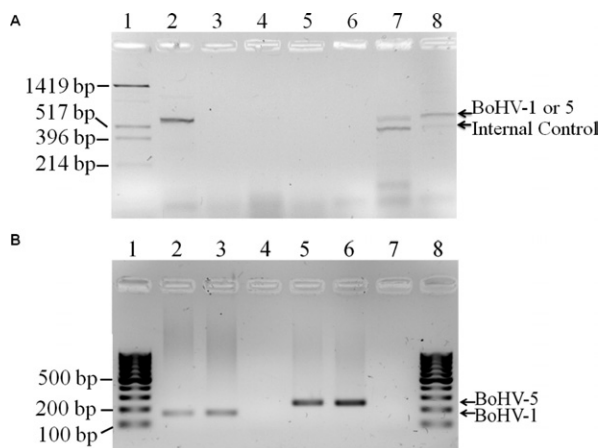


Fig. 1. (A) Agarose gel analysis of the amplified products of the first PCR using DNA isolated from bovine semen samples as a template. Arrow 'BoHV-1 or 5' indicates the PCR product of either BoHV-1 or BoHV-5 (about 570 bp). Arrow 'Internal Control' indicates the PCR product of the internal control template (440 bp). Lane 1: marker pUC19 x *Hinf*I. Lanes 2, 3, 4, 6, 7, and 8 are PCR products of semen samples. Lanes 3, 4 and 6 scored negative, whereas lanes 2, 7, and 8 scored positive. Lane 5: negative control. (B) Agarose gel analysis of the amplified products of the two species-specific nested PCRs using the products of the first PCR of two samples as a template. The BoHV-1 specific nPCR products have a size of 161 bp (lane 2 = sample 1265 and lane 3 = sample 1350), whereas the BoHV-5 specific nPCR products have a size of 236 bp (lane 5 = sample 1265 and lane 6 = sample 1350). Lanes 1 and 8: 100 bp DNA ladder (New England Biolabs - Ipswich, MA, USA). Lanes 4 and 7: negative controls.

3.2. Virus isolation and REA

To determine whether the BoHV-1 and/or BoHV-5 DNA-positive semen samples contained infectious virus, virus isolation was performed. However, 36 samples could not be assayed due to lack of sufficient semen (16) or due to cytotoxicity (20). Of the tested remaining 40

Table 1

Detection of viral DNA and virus isolation in semen of Brazilian bulls.

	RS European breeds	GO Zebu breed	Total (%)
Viral DNA detection			
BoHV-5	57/57	19/19	76/76 (100)
BoHV-1	25/57	9/19	34/76 (44.7)
BoHV-5 + BoHV-1	25/57	9/19	34/76 (44.7)
Virus isolation			
Positive samples	13/30	5/10	18/40 ^a (45.0)

RS, State of Rio Grande do Sul; GO, State of Goiás.

^a Thirty-six samples could not be assayed due to lack of sufficient semen (16) or due to cytotoxicity (20).

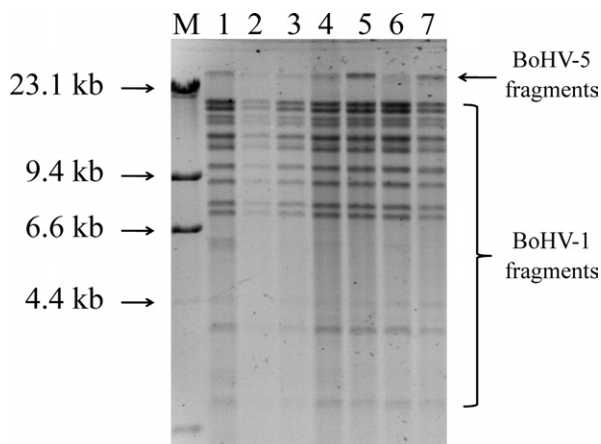


Fig. 2. Restriction enzyme analysis of genomic DNA of BoHV-1 or BoHV-5 virus isolated from bovine semen samples. The viral DNA was digested with *Hind*III and obtained fragments were separated on a 0.7% agarose gel. Lanes M: lambda x *Hind*III markers. Lanes 1, Isolate 1/4p; 2, Isolate 2/4p; 3, Isolate 3/4p; 4, Isolate 4/4p; 5, Isolate 5/4p; 6, Isolate 6/3p; 7, Isolate 7/3p. (1/4p = isolate number/passage 4.) The pattern of the BoHV-1 fragments is typical for the BoHV-1.2 genotype [23,24]. The upper band (arrow) represents the typical two largest *Hind*III fragments (~57 and 50 kb) of BoHV-5.

samples, 18 produced a typical herpesvirus like cytopathic effect (CPE) and were considered positive (45%) (Table 1). Thirteen of these 18 semen samples with infectious BoHV were from bulls of the AI centre in Rio Grande do Sul (European breeds) and five were from bulls from the farm in Goiás (Zebu breed).

To confirm that the CPE was really due to a bovine herpesvirus infection and to determine which of the two viruses (BoHV-1 or BoHV-5) was isolated, restriction enzyme analysis (REA) of the first seven of the 18 virus isolation positive samples was performed. The REA of the isolated viral DNA with the *Hind*III enzyme [23,24] showed the presence of BoHV-1.2 DNA in all seven samples. A BoHV-5 *Hind*III restriction enzyme fragment pattern was difficult to observe, however typical BoHV-5 bands (with approximate sizes of 50 and 57 kb) were present in all samples (Fig. 2). All seven virus samples originated from semen samples that were positive in the BoHV-5 nPCR and negative in the BoHV-1 nPCR. Conversely, all samples—with exception of sample 2—originated from bulls that scored at least one time positive by both the BoHV-1 and BoHV-5 nPCRs.

4. Discussion

In this study, 100% of 76 semen samples of Brazilian cattle were positive for BoHV-5 DNA and 44.7% of these samples were positive for BoHV-1 DNA as well.

The percentages of BoHV-1 and BoHV-5 infections of the bulls of European breeds and those of Zebu breed did not differ significantly. From 18 of the 40 samples that could be tested (45%), infectious BoHV-1 and/or BoHV-5 could be isolated. Seven of these 18 viral isolates were analyzed by restriction enzyme analysis. All seven contained both BoHV-1 and BoHV-5 genomic DNA and all BoHV-1 genomes were of the BoHV-1.2 genotype.

The presence of BoHV-1 and BoHV-5 in semen samples of Brazilian cattle was demonstrated before. In that regard, BoHV-1 DNA was found in 31.7% of semen samples ($n = 101$) from an artificial insemination centre [25]. Bovine herpesvirus type 1 DNA ($n = 5$) and BoHV-5 ($n = 2$) were detected in semen samples of healthy bulls [26]. Bovine herpesvirus type 1.2 was also found in semen of a bull without clinical signs [27]. Likewise, BoHV-5 DNA was found in 30% ($n = 20$) of semen samples and in semen of a bull without clinical signs [27–29]. In addition, in Australia, BoHV-5 was detected in semen of a healthy donor bull [30].

The percentage of 31.7% BoHV-1 positive samples found by Rocha and others [25] seemed comparable to the 44.7% found in this study. The highest percentage of BoHV-5 positive semen samples reported before was 30% [by Gomes and others, 28]. The 20 semen samples used by these authors all contained infectious BoHV-1 [25]. The observed 30% BoHV-5 DNA positive samples were thus positive for both BoHV-1 and BoHV-5. None of the earlier studies showed such a high percentage of BoHV-5 positive semen samples as found in the present study. The differences between our and earlier results may have been due to differences in sensitivity of the PCR assays used and/or due to the origins of the semen samples. It is noteworthy that DNA of both BoHV-1 and BoHV-5 were recently found by our group in ganglia of cattle from South Brazil [17]. In that study, the percentages of cattle carrying BoHV-1 DNA or BoHV-5 DNA or both, were 82.8, 93.1, and 75.9%, respectively. These numbers differed from those obtained here, but the high numbers of BoHV-5 infected animals found in both studies corroborate each other.

This study also showed that fresh as well as frozen semen samples contained infectious virus. The low percentage (45%) of semen samples from which BoHV-1 or BoHV-5 virus could be isolated, despite the fact that they were all positive by PCR, reflected the fact that PCR of BoHV-1 or BoHV-5 was generally more sensitive than virus isolation [16,18]. This is be-

cause viral DNA from non-infectious particles can also be detected by PCR [31]. Furthermore, anti-BoHV antibodies in semen may hinder the infectivity of the virus [31]. Starting ~3 wk after an artificial infection with BoHV-1, a PCR assay scored four to nine times more BoHV-1 DNA positives than BoHV-1 virus isolation [32]. In this study, however, the BoHV-1 specific nPCR failed to detect viral DNA in semen samples that were BoHV-1 virus isolation positive. Our BoHV-1 specific nPCR is thus less sensitive than virus isolation. This was probably due to the annealing temperature that was optimized to discriminate between BoHV-1 and BoHV-5 at the expense of its sensitivity. We inferred that the number of samples positive for BoHV-1 was actually higher than detected by our nPCR.

The seven virus samples that were used to perform a restriction enzyme analysis (REA) were the first 7 of the 18 virus batches obtained by virus isolation. As it happened, these seven samples were obtained from only four bulls from the same artificial insemination centre. The REA showed the presence of genomic DNA of both BoHV-1 and BoHV-5, although the amount of BoHV-5 DNA was ~20 times lower than the amount of BoHV-1 DNA. Presumably BoHV-1 grows better than BoHV-5 in the CRIB cells that were used for virus isolation. This may reflect biological differences between these viruses. The observed pattern of the BoHV-1 DNA fragments showed that all BoHV-1 genomes had the BoHV-1.2 genotype, which is normally found in South America [27].

The presence of infectious BoHV-1 and BoHV-5 virus in semen is a matter of concern. Primary BoHV-1 and BoHV-5 infections of cattle are an animal health concern, with expected economic losses. Consequently, it may be advantageous to control BoHV-1 and BoHV-5 infections and eventually eliminate these viruses from herds. A growing number of countries already started to control BoHV-1 infections [33]. In addition, more and more countries created national and international trade barriers for BoHV-1 positive products [33]. However, management of cattle in Brazil is quite different from the countries that already started BoHV-1 control programs. Most cattle in Brazil are managed extensively, roaming free over immense areas and the herds are very large, making it hard to implement a control program. The use of serologically differentiating or diva vaccines [34] would be the method of choice, but is not yet put in practice in Brazil [35]. There is a diva vaccine available against BoHV-1, but not against BoHV-5. Although one might expect that a

BoHV-1 vaccine also protects against BoHV-5, this is still a controversial issue [36–38].

However, even without a specific control program, the spread of BoHV-1 and 5 by contaminated semen can be reduced. Bovine herpesviruses latently infect their host, occasionally reactivate and intermittently emerge in the semen, often without reappearance of clinical signs [39]. To avoid spreading of BoHV-1 and BoHV-5 by artificial insemination, all semen samples, including those from apparently healthy bulls, should be tested for their presence. Due to the intermittent secretion of these viruses not all batches of semen are contaminated with infectious virus. If two straws of each batch for artificial insemination are tested negative for the presence of infectious BoHV-1 and BoHV-5, the risk of transmitting these viruses to inseminated cows is substantially reduced [39,40].

In conclusion, we investigated the presence of BoHV-1 and BoHV-5 in fresh and frozen semen samples from healthy Brazilian bulls using two species-specific nPCR assays and virus isolation. We found BoHV-5 DNA in all samples (N = 76) and in 44.7 % of these samples BoHV-1 DNA was detected as well. Of 40 tested samples, 45% were also positive by virus isolation. These results highlighted the importance of testing semen samples, even from healthy bulls, for the presence of BoHV-1 and BoHV-5, especially in regions where these viruses are endemic.

Acknowledgments

The authors thank the employees, professors and colleagues of the Virology Laboratories of UFRGS. P.M. Roehle is a CNPq 1C research fellow. This study was supported by CNPq and CAPES.

References

- [1] Turin L, Russo S, Poli G. BoHV-1: New molecular approaches to control a common and widespread infection. *Mol Med* 1999; 5:261–84.
- [2] Muylkens B, Thiry J, Kirten P, Schynts F, Thiry E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet Res* 2007;38:181–209.
- [3] Weiblen R, Kreutz LC, Canabarro TF, Schuch LF, Rebelato MC. Isolation of bovine herpesvirus 1 from preputial swabs and semen of bull with balanoposthitis. *J Vet Diagn Invest* 1992;4: 341–3.
- [4] Gibbs EPJ, Rweyemamu MM. Bovine herpesviruses. Part I. *Vet Bulletin* 1977;47:317–43.
- [5] Silva MS, Brum MCS, Loreto ELS, Weiblen R, Flores EF. Molecular and antigenic characterization of Brazilian bovine herpesvirus type 1 isolates recovered from the brain of cattle with neurological disease. *Virus Res* 2007;129:191–9.
- [6] Bratanich AC, Sardi SI, Smitsaart EN, Schudel AA. Comparative studies of BHV-1 variants by in vivo-in vitro tests. *Zentralbl Veterinarmed B* 1991;38:41–8.
- [7] Engels M, Ackermann M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Vet Microbiol* 1996;53:3–15.
- [8] Dejuq N, Jegou B. Viruses in the mammalian male genital tract and their effects on the reproductive system. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001;65:208–31.
- [9] Thiry J, Keuser V, Muylkens B, Meurens F, Gogev S, Vanderplasschen A, Thiry E. Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. *Vet Res* 2006;7:169–90.
- [10] Teixeira MB, Esteves PA, Coelho CSS, Silva TC, Oliveira LG, Roehle PM. Diferenças em níveis de anticorpos neutralizantes contra Herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) por testes de soroneutralização. *Pesq Agrop Gaúcha* 1998;4:1–65.
- [11] Esteves PA, Dellagostin OA, Pinto LS, Silva AD, Spilki FR, Ciacci-Zanella JR, Hübner SO, Puentes R, Maisonnave J, Franco AC, Rijsewijk FAM, Batista HBCR, Teixeira TF, Dezen D, Oliveira AP, David C, Arns CW, Roehle PM. Phylogenetic comparison of the carboxy-terminal region of glycoprotein C (gC) of bovine herpesviruses (BoHV) 1.1, 1.2 and 5 from South America (SA). *Virus Res* 2008;131:16–22.
- [12] Cerqueira RB, Carminati R, Silva JM, Soares GC, Meyer R, Sardi S. Serological survey for bovine herpesvirus 1 in cattle from different regions in the state of Bahia, Brazil. *Braz J Vet Res Anim Sci* 2000;37:1–6.
- [13] Barbosa ACVC, Brito WMED, Alfaia BT. Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) no Estado de Goiás, Brasil. *Ciência Rural* 2005; 35:1368–73.
- [14] Davies DH, Duncan JR. The pathogenesis of recurrent infections with infectious bovine rhinotracheitis virus induced in calves by treatment with corticosteroids. *Cornell Vet* 1974;64: 340–66.
- [15] Ackermann M, Wyler R. The DNA of an IPV strain of bovid herpesvirus 1 in sacral ganglia during latency after intravaginal infection. *Vet Microbiol* 1984;9:53–63.
- [16] van Engelenburg FA, Maes RK, van Oirschot JT, Rijsewijk FA. Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. *J Clin Microbiol* 1993;31:3129–35.
- [17] Campos FS, Franco AC, Hübner SO, Oliveira MT, Silva AD, Esteves PA, Roehle PM, Rijsewijk FAM. High prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. *Vet Microbiol* 2009;139:67–73.
- [18] Smits CB, Van Maanen C, Glas RD, De Gee ALW, Dijkstrab T, Van Oirschot JT, Rijsewijk, FAM. Comparison of three polymerase chain reaction methods for routine detection of bovine herpesvirus 1 DNA in fresh bull semen. *J Virol Methods* 2000; 85:65–73.
- [19] Kramps JA. Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis. In: *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, OIE, World organization for animal health Chapter 2.4.13* 2008, p. 752–67
- [20] Flores EF, Donis RO. Isolation of a mutant MDBK cell line resistant to bovine viral diarrhea virus infection due to a block in viral entry. *Virology* 1995;208:565–75.
- [21] Green MH, Miller HI, Hendler S. Isolation of a Polyoma-Nucleoprotein Complex from Infected Mouse-Cell Cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971;68:1032–6.

- [22] Pignatti PF, Cassai E, Meneguzzi G, Chenciner N, Milanese G. Herpes simplex virus DNA isolation from infected cells with a novel procedure. *Virology* 1979;93:260–4.
- [23] Mayfield JE, Good PJ, Van Oort HJ, Campbell AR, Reed DE. Cloning and cleavage site mapping of DNA from bovine herpesvirus 1 (Cooper strain). *J Virol* 1983;47:259–64.
- [24] Rijsewijk FAM, Kaashoek M J, Langeveld JPM, Meloen RJ, Judek R, Bienkowska-Szewczyk K, Maris-Veldhuis MA, van Oirschot JT. Epitopes on glycoprotein C of bovine herpesvirus-1 (BoHV-1) that allow differentiation between BoHV-1.1 and BoHV-1.2 strains. *J Gen Virol* 1999;80:1477–83.
- [25] Rocha MA, Barbosa EF, Guimarães SE, Dias Neto E, Gouveia AM. A high sensitivity-nested PCR assay for BoHV-1 detection in semen of naturally infected bulls. *Vet Microbiol* 1998;63:1–11.
- [26] Silva MS, Brum MCS, Weiblen R, Flores EF. Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987–2006). *Pesq Vet Bras* 2007;27:403–8.
- [27] D'arce RCF, Almeida RS, Silva TC, Franco AC, Spilki FR, Roehle PM, Arns CW. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. *Vet Microbiol* 2002;88:315–24.
- [28] Gomes LI, Rocha MA, Souza JG, Costa EA, Barbosa-Stancioli EF. Bovine Herpesvirus 5 (BoHV-5) in bull semen: Amplification and sequence analysis of the *US4* gene. *Vet Res Commun* 2003;27:495–504.
- [29] Esteves PA, Spilki FR, Franco AC, Silva TC, Oliveira EAS, Moojen V, Esmeraldino AM, Roehle PM. Bovine herpesvirus type 5 in the semen of a bull not exhibiting clinical signs. *Vet Rec* 2003;152:658–9.
- [30] Diallo IS, Hewitson GR, Hoad J, Corney BG, Rodwell BJ. Isolation of bovine herpesvirus type 5 from the semen of a healthy bull in Australia. *Aust Vet J* 2010;88:93–5.
- [31] Pastoret PP, Aguilar-Setie'n A, Burtonboy G, Mager J, Jetteur P, Schoenaers F. Effect of repeated treatment with dexamethasone on the re-excretion pattern of infectious bovine rhinotracheitis virus and humoral immune response. *Vet Microbiol* 1979;4:149–55.
- [32] Van Engelenburg FA, Van Schie FW, Rijsewijk FA, Van Oirschot JT. Excretion of bovine herpesvirus 1 in semen is detected much longer by PCR than by virus isolation. *J Clin Microbiol* 1995;33:308–12.
- [33] Ackermann M, Engels M. Pro and contra IBR-eradication. *Vet Microbiol* 2006;113:293–302.
- [34] van Oirschot JT. Diva vaccines that reduce virus transmission. *J Biotechnol* 1999;73:195–205.
- [35] Franco AC, Spilki FR, Esteves PA, Lima M, Weiblen R, Flores EF, Rijsewijk FAM, Roehle PM. A Brazilian glycoprotein E-negative bovine herpesvirus type 1.2a (BHV-1.2a) mutant is attenuated for cattle and induces protection against wild-type virus challenge. *Pesq Vet Bras* 2002;22:135–40.
- [36] Spilki FR, Silva AD, Hübner S, Esteves PA, Franco AC, Driemeier D, Roehle PM. Partial protection induced by a BoHV-1 recombinant vaccine against challenge with BoHV-5. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1026:247–50.
- [37] Del Médico Zajac MP, Puntel M, Zamorano PI, Sadir AM, Romera SA. BoHV-1 vaccine induces cross-protection against BoHV-5 disease in cattle. *Res Vet Sci* 2006;81:327–34.
- [38] Silva AD, Spilki FR, Franco AC, Esteves PA, Hübner SO, Driemeier D, Oliveira AP, Rijsewijk FAM, Roehle PM. Vaccination with a gE-negative bovine herpesvirus type 1 vaccine confers insufficient protection to a bovine herpesvirus type 5 challenge. *Vaccine* 2006;24:3313–20.
- [39] van Oirschot JT. Bovine herpesvirus 1 in semen of bulls and the risk of transmission: a brief review. *Vet Q* 1995;17:29–33.
- [40] Rocha MA, Gouveia AMG, Leite RC. Bovine herpesvirus-1 in semen. *Ciência Rural* 1999;29:373–80.

9. VITA

9.1 Dados Pessoais:

Nome: Martha Trindade Oliveira

Endereço: Edgar Fritz Müller, 136 – Rio Branco – Canoas – RS/Brasil – CEP 92200-610

Email: marthatoliveira@gmail.com

Telefone: (51) 99512209

9.2 Formação Acadêmica/Titulação:

2009 – 2011: Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

2005 – 2008: Graduação em Biomedicina pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

9.3 Publicações:

OLIVEIRA, M.T.; CAMPOS, F.S.; DIAS, M.M.; VELHO, F.A.; FRENEAU, G.E.; BRITO, W.M.E.D.; RIJSEWIJK, F.A.M.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. Detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in semen from Brazilian bulls. **Theriogenology**, Unites States, v.75, p.1139-1145, 2011.

VARELA, A.P.M.; HOLZ, C.L.; CIBULSKI, S.P.; TEIXEIRA, T.F.; ANTUNES, D.A.; FRANCO, A.C.; ROEHE, L.R.; OLIVEIRA, M.T.; CAMPOS, F.S.; DEZEN, D.; CENCI, A.; BRITO, W.D.; ROEHE, P.M. Neutralizing antibodies to bovine herpesvirus types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) and its subtypes. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.142, p.254-260, 2010.

CAMPOS, F.S.; FRANCO, A.C.; HÜBNER, S.O.; OLIVEIRA, M.T.; SILVA, A.D.; ESTEVES, P.A.; ROEHE, P.M.; RIJSEWIJK, F.A. High prevalence of coinfections with Bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.139, p.67-73, 2009.