

**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
Instituto Biológico
Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e
Ambiental no Agronegócio**

**PERFIL PROTEÔMICO APÓS INFECÇÃO POR
BVDV (VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA) EM CÉLULAS MDBK**

Roberta Kelly Ribeiro de Queiróz

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutor
em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no
Agronegócio. Área de concentração: Segurança
Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

**São Paulo
2017**

Roberta Kelly Ribeiro de Queiróz

**PERFIL PROTEÔMICO APÓS INFECÇÃO POR
BVDV (VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA) EM CÉLULAS MDBK**

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutor em
Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no
Agroecossistema

Orientador: Professor Dr. Ricardo Harakava

**São Paulo
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Queiróz, Roberta Kelly Ribeiro de.

Perfil proteômico após infecção por BVDV (Vírus da Diarreia Viral Bovina) em células MDBK. / Roberta Kelly Ribeiro de Queiroz. - São Paulo, 2017. 105 p.

Tese (Doutorado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema. Linha de pesquisa: Gestão Sanitária e Ambiental na Produção Animal.

Orientador: Ricardo Harakava.

Versão do título para o inglês: Preteomic profile after infection by BVDV (Bovine Viral Diarrhea Virus) in MDBK cells.

1. Células MDBK 2. Vírus BVDV 3. Proteoma 4. Bovino I. Queiróz, Roberta Kelly Ribeiro de. II. Harakava, Ricardo. III. Instituto Biológico (São Paulo). IV. Título.

IB/Bibi./2017/011



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO
Pós-Graduação
Av. Cons. Rodrigues Alves 1252
CEP 04014-002 - São Paulo - SP
secretariapg@biologico.sp.gov.br



FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do candidato: Roberta Kelly Ribeiro de Queiróz

Título: Perfil Proteômico após Infecção por BVDV (Vírus da Diarreia Viral Bovina) em Células MDBK.

Orientador(a): Prof. Dr. Ricardo Harakawa

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutor em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Aprovada em: 03/07/2017.

Banca Examinadora

Prof. Dra. Roseli Fernandes Gonçalves Instituição: Universidade de SP-FMVZ
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra. Eliana Scarcelli Pinheiro Instituição: Instituto Biológico
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann Instituição: Universidade de SP-FMVZ
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra. Rosa Maria Piatti Instituição: Instituto Biológico
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Enio Mori Instituição: Instituto Pasteur
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Eu, **(Roberta Kelly Ribeiro de Queiróz)**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico, de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura: _____ Data ____/____/____

DEDICATÓRIA

Dedico cada frase desse trabalho à pessoa que ansiava tanto em estar presente até a última palavra: "Ufa, cheguei ao fim"!

Minha querida avó, infelizmente sua partida nos pegou de surpresa, mas esta aqui a conclusão de mais essa etapa da loucura chamada: VIDA!

"Nossa vida é feita justamente daquilo que consideramos interrupções (C.S. Lewis)".

Maria Adélia Masiero (*In memoriam*), meu grande tesouro.

AGRADECIMENTOS

No decorrer desses longos quatro anos, muitas coisas aconteceram no enredo dessa história, e o destino, trouxe-me momentos de muita tristeza. A minha jornada até aqui não foi nada fácil, admito, mas a sensação de ter encerrado mais um ciclo e "virado a página", me traz a esperança em dias felizes.

À minha amada mãe, que contrariando a lei do universo, sempre foi mãe e pai, além de estar ao meu lado incansavelmente em todos os momentos, ensinando-me que da vida, só levamos o caráter, a honestidade e a integridade pára com o próximo.

Ao meu fiel amigo, encontrado em um dia frio e chuvoso na rua, o qual conquistou meu coração, tornando-se meu grande companheiro "não humano", de horas e horas escrevendo este trabalho, Lucky. E agora ao meu novo amiguinho Kelvin, pela lealdade em todos os momentos.

Quantas saudades trago em meu peito...

Agradeço a Deus pela honrosa e única oportunidade. Foi O Senhor que segurou em minhas mãos, acalmando meu coração aflito, enxugando as lágrimas que não cessavam, dizendo-me: "Eu estou aqui".

À grande amiga e percussora de toda essa "confusão", Dra., Magali D'Angelo, nossa "Maga", (*In memoriam*). Lamento muito em não ter tido você ao meu lado no decorrer desses anos, mas saiba que tentei ao máximo "seguir em frente", colocando em prática algo que não tivemos tempo de executar (não neste momento, minha amiga). Maga, deixo aqui uma singela lembrança do quão importante você fora em minha vida.

Lembro como se fosse hoje o dia que cheguei ofegante, ansiosa (para não dizer "desesperada"), abordando a Dra. Lia. Ela prontamente atendeu-me carinhosamente (como sempre o fez), dizendo-me que "sim", "ok,", aceitava meu pedido de orientação. Portanto, Dra. Eliana Scarcelli Pinheiro, sou eternamente grata por tudo que a Sra. fez por mim nestes 4 anos. O mundo precisa de pessoas tão íntegras como a Sra.

À Dra. Roseli Fernandes Gonçalves, pelo valioso conhecimento transmitido em sua co-orientação e total apoio.

Às pesquisadoras, Dra. Maria Judite Bittencourt e Dra. Isabela Simoni, Laboratório de Biologia Celular do Instituto Biológico. Não poderei mensurar tamanha a minha gratidão à vocês por terem aberto as portas, (ou melhor, nunca terem fechado) do laboratório, onde consegui realizar grande parte dos experimentos. Isa e Ju, muito obrigado!

À Diretora Técnica do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, CDPSA, Dra. Josete Garcia Bersano por sempre abrir as portas do Centro com todo carinho e atenção (a Sra. mora no meu coração e nem paga aluguel), e a amiga, Nenza Fernandez pelas idas e vindas ao Frigorífico e, acima de tudo pela grande amizade construída, além das "estradas".

Ao Dr. Antônio Batista Filho, Diretor do Instituto Biológico, cuja simpatia e carisma é cativante.

À Dra. Edviges Maristela Pituco, Laboratório de Víroses de Bovídeos, pela doação de parte do material do presente trabalho.

Ao Departamento de Pós-Graduação do Instituto Biológico de São Paulo, ao Pró Reitor de Ensino e Pesquisa, Dr. Ricardo Harakava, meu atual orientador, ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação, Dr. Marcelo Eiras, e aos Membros do Comitê.

À todos dos Laboratório de Víroses de Bovídeos, em especial à Dra. Adriana Nogueira pela ajuda na manipulação das células (Dri, obrigada por responder até aos domingos).

À querida amiga Tereza Jocys pelos abraços e pela grande amizade.

À Dra. Rosa Maria Piatti "Rosinha", Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução, por não ter só atendido prontamente meu pedido de fazer parte da Banca, como também colaborar com a correção do trabalho na qualificação.

À amiga Danielle Pavão, por todo conhecimento na época do meu Mestrado, onde ainda hoje, aplico muitas coisas aprendidas outrora.

À Biblioteca do Instituto Biológico, em especial ao meu grande amigo e conselheiro Roberto Tadeu pela bondade e disposição em sempre ajudar os alunos da melhor forma, além de ter me "socorrido" no final do segundo tempo (ufa!)

À Prof. Dra. Ana Eugênia de Carvalho Campos pelas aulas ministradas no Curso de Pós-Graduação.

Ao meu grande e amado amigo Paulo Ricardo de Jesus, que se transformou em um grande amigo ("aqueles para guardarmos ao lado esquerdo do peito"). Amo você!

Ao Dr. Marcos Potenza, Laboratório de Pragas em Horticultura, por sempre me acolher em seu laboratório.

Aos meus eternos e queridos amigos alunos da Pós-Graduação do Instituto Biológico, que assim como eu, são verdadeiros batalhadores. Neste período compartilhamos de muitas risadas, troca de conhecimento, opiniões, preocupações e até viagens, enfim momentos inesquecíveis, Adeline Mira Fernandes, Andrea Dantas, Amanda de Oliveira, Wellington Salviano, Talita Brombila, Simone Fabris, Michele Lima, Josemara Apolinário, Cristiano, entre outros.

À Dona Mafalda D'Angelo (*In memoriam*), pela amizade.

Ao Prof. Dr. Ricardo Lopes Dias da Costa, Instituto de Zootecnia de Nova Odessa, pelas valiosas aulas práticas de Reprodução Animal.

À Prof. Dra. Fabíola Freitas de Paula Lopes, UNIFESP, Depto. Ciências Biológicas por aceitar meu estágio no Laboratório. À Dra. Cassia Orlandi, e as colegas, Daniela Franco da Silva e Thais Alves pelos ensinamentos durante todo esse período.

Quando eu era criança, passava em frente ao grandioso Instituto Biológico de São Paulo, e pensava: "que lugar imponente de natureza fenomenal". O tempo passou, e eis que um dia, deparo-me entrando neste belo lugar a procura de um estágio. Tantas coisas aconteceram a cargo do destino, tantos momentos, sentimentos, e hoje finalizo um trabalho que outrora era um sonho. Hoje é uma realidade. Portanto, o Instituto, não é só um centro de formação de cientistas, mas sim um lugar mágico, onde passei grande parte de minha vida acadêmica agradecendo por ter tido a oportunidade de estar em um lugar assim. Sou muito agradecida.

À CAPES, pelo auxílio financeiro, viabilizando a execução deste trabalho.

E, por fim a uma pessoa muito importante, por ter caminhado ao meu lado na evolução deste percurso. Entendo o quanto fora difícil entender todos os momentos que não pude dar a atenção merecida a você, mas creia, ter você ao meu lado todo esse tempo, fez de fato, toda diferença. Portanto, "amor de verdade a gente conserta, não joga fora, Elvis Ângelo".

EPÍGRADE

*“O saber a gente aprende com os mestres e os livros.
A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes.”*

Cora Coralina

*“O que faz andar o barco não é a vela enfunada,
mas o vento que não se vê.”*

(Platão)

*“A resposta certa não importa nada”.
O essencial é que as perguntas estejam certas”.*

(Mário Quintana)

*“Somos o que repetidamente fazemos.
A excelência, portanto, não é um feito, mas sim um hábito”.*

(Aristóteles)

*“Pouco importa o julgamento dos outros.
Os seres são tão contraditórios que é impossível atender às suas demandas.
Tenha em mente simplesmente em ser autêntico e verdadeiro”*

(Dalai Lama)

O teu trabalho é cântico
De tua própria vida.

Imprime nele onde estiveres
A nota azul de teu amor.

Não busques a tarefa que te cabe
Com a tristeza do escravo.

O teu trabalho é a oficina
Em que podes forjar a tua própria luz.

(Chico Xavier)

RESUMO

QUEIRÓZ, R. K. **Perfil Proteômico após Infecção por BVDV (Vírus da Diarreia Viral Bovina) em Células MDBK.** São Paulo. 2017. 102f Tese (Doutorado em Sanidade, Segurança Alimentar no Agronegócio) - Instituto Biológico. Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2017.

O setor do agronegócio contribui com grande impacto no desenvolvimento da economia brasileira, além de estar relacionado diretamente ao crescimento do Produto Interno Bruto (PIB). A importância da pecuária bovina no desenvolvimento da economia é um dos principais destaques do agronegócio. Deste modo, o surgimento de divergentes técnicas sanitárias torna-se imprescindível no controle e disseminação de agentes patogênicos. O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é um dos principais patógenos que afetam os bovinos, responsável por grandes perdas econômicas na pecuária. Pertencente à família Flaviviridae, gênero *Pestivirus*, apresenta distribuição mundial, causando divergentes problemas no âmbito reprodutivo (infertilidade, repetição de cios, abortamentos e mal-formações fetais). Apresenta-se sob as formas não citopatogênica (NCP) e a citopatogênica (CP). As abordagens proteômicas surgem amplamente com o objetivo de elucidar os processos fisiológicos proteicos, através de técnicas de quantificação, identificação e, por fim, caracterização de proteínas em meio de cultivo celular. Os objetivos do presente trabalho foram verificar os possíveis efeitos do BVDV CP, quando isolados em células MDBK, além de identificar e comparar utilizando análise proteômica, o perfil de glicoproteínas presentes no meio de cultivo de células MDBK infectadas ou não com o vírus; além de também selecionar possíveis biomarcadores moleculares relacionados à interação BVDV-células MDBK. Na primeira fase do experimento, foram analisados 8 cultivos contendo monocamadas de células MDBK, inoculadas com o vírus BVDV CP. Após várias observações em horários distintos, observou-se um ECP gradativo nas células inoculadas com o vírus CP. Na segunda fase, amostras de meio de cultivo das células MDBK, foram submetidas à extração de proteínas para análise proteômica. Para cada amostragem, foram obtidos géis bidimensionais representativos, os quais foram analisados com relação a expressão diferencial de proteínas. A análise utilizando a Espectrometria de Massa (MS) identificou 55 proteínas, sendo que grande parte delas apresentou expressão alterada. Cada proteína identificada foi representada baseada na busca de similaridade com outras sequências de proteínas já depositadas no NCBI. Proteínas de importante papel na resposta de defesa ao vírus e resposta imune foram identificadas.

Palavras-chave: Células MDBK, Vírus BVDV, Proteoma, Bovino

ABSTRACT

QUEIRÓZ, R.K. **Proteômico profile after Infection by BVDV (bovine viral diarrhoea virus) in MDBK Cells**. São Paulo. 2017.102f thesis (Doctorate in sanity, food safety in agribusiness)-Biological Institute. Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Department of agriculture and food supply in the State of São Paulo, São Paulo, 2017.

The agribusiness sector contributes with great impact on the development of the Brazilian economy, in addition to being directly related to the growth of gross domestic product. The importance of cattle raising in the development of the economy is one of the main highlights of agribusiness. Thus, emergence of divergent health techniques becomes essential in the control and dissemination of pathogens. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) is one of the main pathogens that affect cattle, responsible for great economic losses in livestock. In the family Flaviviridae, genus *Pestivirus*, offers worldwide distribution, causing reproductive problems under divergent (infertility, cio repetitions, abortions and malformations). Presents itself as not citopatogenic (NCP) and the citopatogenic (CP). Proteomics approaches appear widely in order to elucidate the physiological processes protein quantification techniques, identification and characterization of proteins. The main objective of this study was to ascertain the possible effects of the CP in the cultivation of BVDV MDBK cells at different stages, in addition to isolate and identify the proteins present in the growth medium of cells inoculated with the virus. After various observations, in different times, there was a gradual ECP in cells inoculated with the virus. In the second phase of the experiment, samples of medium of MDBK cells were subjected to extraction of proteins for proteomics analysis. In the second phase of the experiment, samples of medium of MDBK cells were subjected to extraction of proteins for proteomics analysis. For each sampling, two-dimensional gels representative were obtained, which were scanned and analyzed using PDQuest application (R) version 8.0.1. The detected spots after the analysis of 2-D maps have been cut of gels and subjected to digestion with trypsin. Proteins were identified by mass spectrometry and analyzed using the program annotations of proteins (STRAP). Protein-protein interaction networks were obtained from the database STRING. 55 and proteins were identified, based on the analysis of the gene ontology, they were associated in biological process associated with the connection (76%) and present biological functions of virus defense (31%), process of apoptosis (14%) and immune response (13%), among others.

Keywords: MDBK Cells, BVDV, Proteomic, Bovine

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D = Bidimensional

2D-PAGE = Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida

et al. = e colaboradores

etc = et Cetera

R\$ = Reais

US\$ = Dólar dos Estados Unidos

ABIEC = Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes

ABNT = Associação Brasileira de Normas Técnicas

ACN = Acetonitrila

ATCC = American Type Culture Collection

Bcl3 = B-cell leukemia protein 3

BDV = Vírus da doença das fronteiras em ovinos

BSA = Albumina sérica bovina

BVD = Diarreia Viral Bovina – Bovine Viral Diarrhea

BVDV = Vírus da Diarreia Viral Bovina – Bovine Viral Diarrhea Vírus

CETEA = Comissão de Ética na Experimentação Animal

cm = centímetro

CP = Citopatogênico

CPDSA = Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal

CSFV = Vírus da peste suína clássica

DM = Doença das Mucosas

DNA = Ácido desoxirribonucléico

DPI = pontos por polegada

DSMZ = Services Human and Animal cell lines

DTT = Ditioneitol

EBV = Vírus Ep Stein - Barr

ECP = Efeito citopático

ELISA = Enzyme Linked Immunosorbent Assay

EMC = Encefalomiocardite

ESI-Q-ToF = Electrospray Ionization Quadrupole-time-of-flight

EUA = Estados Unidos da América

EV = Estomatite vesicular

FAO = Food and Agriculture Organization

FIV = Fertilização *in vitro*

FPPs = Enzima farnesil difosfato sintase

g = grama

h = Horas

HA = ácido hialurônico

HAV = Hepatite A

HCV = Hepatite C

HCMV = Citomegalovírus humano

HIV = Vírus da imunodeficiência humana

HSPs = Proteínas de choque térmico

IA = Inseminação artificial

IATF = Inseminação artificial em tempo fixo

IB = Instituto Biológico

IBGE = Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IBR = Rinotraqueíte infecciosa bovina

ICTV = Comitê internacional de taxonomia de vírus

IDGA = Imunodifusão em gel de ágar

IEF = Focalização isoelétrica

IL = interleukin

IL- β = interleukin-beta

IRF = interferon regulatory transcription factor

JCRB = Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank

Kb = quilobases

kDa – KiloDaltons

Kg = Quilograma

LBV = Laboratório de Viroses de Bovídeos

m = metros

mA/gel = miliampere/gel

m/z = razão massa e carga

MALDI = Dessorção por laser ionizante assistida por uma matriz

MASCOT = Matrix Science Inc., (www.mascot.com)

MDBK = Madin Darby Bovine Kidney - Linhagem estabelecida de rim bovino

MEM = Meio essencial mínimo

min = minuto

mL = mililitro

mm = milímetros cúbicos

mM = miliMol

mM = milimolar

MPT = Modificação pós-traducional

MS = Espectrometria de massa

MUDPIT = Tecnologia Multidimensional de Identificação de Proteínas

Mx-1 = Gene Mx-1

NADL = National Animal Disease Laboratory

NCP = Não citopatogênico

NCBI = The National Center for Biotechnology Information

NF-κB = Fator nuclear kappa B

nm = Nanometros

NY = Nova York

OIE = Organização Mundial de Saúde Animal

OMS = Organização Mundial de Saúde

ORF = Open Reading Frame

Pb = Pares de base

PCR = Reação em cadeia pela polimerase

PeDV = Vírus da diarreia epidêmica suína

pDCs = Células dendríticasplasmocitóides

pH = Potencial hidrogeniônico

PI = Persistentemente infectado

pI = Ponto isoelétrico

PIB = Produto Interno Bruto

ppm = Partes por milhão

q.s.p. = quantidade suficiente para

RIKEN= Cell line validation testing Cell Bank

RNA = Ácido ribonucléico

RS = Rio Grande do Sul

RT-PCR = Reação em cadeia pela polimerase quantitativa

SDS = Dodecil sulfato de sódio

SFB = Soro fetal bovino

SN = Soroneutralização

SV40 = Simiar vacuolating vírus

TCID = Dose infectante em cultura de tecidos

TE = Transferência embrionária

TFA = Ácido trifluoroacético

TI = Transitoriamente infectado

v/v = volume por volume

VERO = Células de rim de macaco verde africano

VN = Vírusneutralização

YFV = Vírus da febre amarela

VSV = Vírus da estomatite vesicular

WNV = Vírus do Nilo Oeste

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1** – Comissão de Ética (frente).....
- Anexo 2** – Comissão de Ética (verso).....
- Anexo 3** – Tabela de identificação de proteínas diferencialmente expressas de cultura de células MDBK infectadas com o vírus BVD.....

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Lista de doenças, infecções e infestações em vigor pela OIE.....	12
Figura 2 – <i>Pestivirus</i> . Negative contrast electron micrograph of particles of an isolate of bovine viral diarrhea virus.....	14
Figura 3 – Ilustração esquemática de uma partícula da família Flaviridae.....	14
Figura 4 – Esquema do genoma do vírus BVDV.....	15
Figura 5 – Perdas reprodutivas relacionada à infecção pelo BVDV em fêmeas prenhes não imunes.....	17
Figura 6 – Duas rotas de nascimento de bezerros PI.....	21
Figura 7 – Representação esquemática do ciclo reprodutivo de um animal PI.....	21
Figura 8 – Representação de alguns sintomas observados na presença do vírus BVDV.....	24
Figura 9a – Ulceration on the tongue BVDV.....	24
Figura 9b – Ocular discharge.....	24
Figura 10 – Consequências da infecção de fêmeas prenhes pelo BVDV de acordo com o biótipo do vírus e o tempo de gestação.....	27
Figura 11 – Ferramentas “ômicas” (genômica, proteômica e metabolômica) integradas na promoção da saúde.....	37
Figura 12 – Maneiras em que a expressão do gene e da proteína pode ser regulada ou modificada na transcrição ou na pós-tradução.....	38
Figura 13 – Eletroforese bidimensional 2D-PAGE utilizado na análise de proteomas.....	39
Figura 14 – Espectrômetro de massas MALDI-TOF.....	40
Figura 15 – Diferentes metodologias podem ser combinadas em estudos proteômicos.....	42
Figura 16 – Análise de proteínas por espectrometria de massas em gel bidimensional.....	43
Figura 17 – Foto de cultura de células MDBK (controle negativo).....	57
Figura 17 –. Foto de cultura de células MDBK após 32h de exposição ao vírus BVDV.....	57
Figura 18 –. Foto de cultura de células MDBK (controle negativo).....	57
Figura 18 – Foto de cultura de células MDBK após 51h de exposição ao vírus BVDV.....	57
Figura 19 – Foto de cultura de células MDBK (controle negativo).....	58
Figura 19 – Foto de cultura de células MDBK após 71h de exposição ao vírus BVDV.....	58
Figura 20 – Foto de cultura de células MDBK (controle negativo).....	58

Figura 20 – Foto de cultura de células MDBK após 79h de exposição ao vírus BVDV.....	58
Figura 21 – Perfil bidimensional de proteínas extraídas de meio de cultivo de células MDBK, infectadas ou não com o vírus BVDV.....	61
Figura 22a,b,c – Gráficos das anotações da ontologia gênica das proteínas do meio de cultivo de células MDBK infectadas ou não com o vírus BVDV com base nos componentes celulares, funções moleculares e processos biológicos.....	62
Figura 23 – Rede de interação proteína-proteína analisada pelo software STRING; (A) a rede completa; (B) mostra a família ISG que é regulada pelo interferon.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características gerais dos três gêneros da família Flaviviridae.....	13
Tabela 2 – Efeito Citopático em células MDBK expostas ao vírus BVDV.....	56
Tabela 3 – Teor de proteínas solúveis extraídas de meio de cultivo de células MDBK, controle (C), exposto (E) com o vírus BVDV, em diferentes tempos de amostragem.....	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Descrição de proteínas estruturais do vírus BVDV.....	16
Quadro 2 – Descrição de proteínas não - estruturais do vírus BVDV.....	16
Quadro 3 – Relação de doenças virais com sinais clínicos semelhantes aos da BVD para diagnóstico diferencial da BVD.....	30
Quadro 4 – Relação de doenças bacterianas com sinais clínicos semelhantes aos da BVD para diagnóstico diferencial da BVD.....	30
Quadro 5 – Cronograma de coleta de meio de células MDBK inoculadas com o vírus BVDV.....	49

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	3
2.1. Objetivo geral.....	3
2.2. Objetivo específico.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. Histórico do Cultivo Celular.....	4
3.2. Linhagens Celulares.....	6
3.3. Aplicações dos Cultivos Celulares.....	7
3.4. Histórico da Diarreia Viral Bovina.....	9
3.5. Agente etiológico.....	13
3.6. Genoma do vírus	15
3.7. Patogenia.....	17
3.8. Aspectos gerais da epidemiologia da Diarreia Viral Bovina.....	18
3.9. Animais Persistentemente Infectados.....	20
3.10. Sinais Clínicos.....	22
3.11. Doença das Mucosas.....	25
3.12. Transmissão.....	26
3.13. Diagnóstico.....	29
3.14. Prevenção e Controle	33
3.15. Expressão Gênica e Proteínas.....	34
3.16. Proteoma.....	36
3.17. Proteômica.....	37
3.18. Instrumentos da Proteômica.....	41
3.19. Aplicações no Estudo de Doenças.....	44
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.1. Linhagem estabelecida de rim bovino (MDBK)	46
4.2. Vírus.....	47
4.3. Titulação viral.....	47

4.4. Exposição das células MDBK ao vírus BVDV.....	48
4.5. Análise proteômica.....	50
4.5.1. <i>Determinação da concentração de proteínas</i>	50
4.5.2. <i>Eletroforese bidimensional</i>	50
4.5.3. <i>Coloração dos géis com Coomassie blue G-250</i>	51
4.5.4. <i>Digitalização e análise das imagens dos géis pelo aplicativo PDQuest</i>	51
4.5.5. <i>Análise estatística</i>	52
4.5.6. <i>Digestão das proteínas</i>	52
4.5.7. <i>Identificação das proteínas por espectrometria de massas ESI-Q-TOF</i>	53
4.5.8. <i>Pesquisa em banco de dados e classificação das proteína (Electrospray ionization quadrupole-time-of-flight)</i>	53
4.5.9. <i>Ontologia Gênica</i>	54
4.5.10. <i>Análise in silico das redes de interação das proteínas</i>	54
5. RESULTADOS	55
5.1. Exposição das células MDBK ao vírus BVDV.....	55
5.2. Análise Proteômica.....	59
5.2.1. <i>Eletroforese 2D e identificação das proteínas por espectrometria de massas ESI-Q-TOF (Electrospray ionization quadrupole-time-of-flight)</i>	59
5.2.2. <i>Análise da Ontologia Gênica</i>	62
5.2.3. <i>Análise in silico das redes de interação das proteínas</i>	64
6. DISCUSSÃO	67
7. CONCLUSÕES	76
8. REFERÊNCIAS	77

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2016), o efetivo de bovinos alcançou a marca recorde de 215,2 milhões de cabeças em 2015, totalizando um crescimento de 1,3% em relação ao ano de 2014 (IBGE, 2016).

Segundo a Associação Brasileira da Indústria Exportadora de Carne (ABIEC), as exportações brasileiras de carne bovina encerraram 2016 com um faturamento de aproximadamente US\$5,5 bilhões, uma queda de 6,8%, em comparação com os US\$5,9 bilhões arrecadados em 2015. E, claro, a queda de faturamento é prejudicial para os frigoríficos (ABIEC, 2016).

Ainda de acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) em 2016, o Brasil deteve o segundo maior efetivo de bovinos, sendo responsável por 22,5% do rebanho mundial, atrás apenas da Índia, ocupando a terceira posição no ranking em relação a exportação de carne bovina (USDA, 2016).

Portanto, a bovinocultura brasileira passa por uma fase de reconhecimento da importância de biotecnologias aplicadas à reprodução animal, tendo em vista retorno financeiro através da eficácia nos sistemas de produção (JUNIOR et al., 2009), sobretudo dentro dessa cadeia produtiva da bovinocultura, a reprodução animal é um elemento de impacto direto sobre os índices de produtividade (NICACIO, 2016).

Além do caminho percorrido pela pecuária dos países desenvolvidos, continuam os estudos de cenários e previsões sobre o futuro da produção animal, no mundo, em regiões e em países (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura - FAO, 2013).

O Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV), agente causador da doença Diarreia Viral Bovina (BVD), acomete animais em todas as idades, sendo uma doença de distribuição mundial e com alta ocorrência no Brasil. Pertencente à família Flaviviridae, gênero *Pestivirus*, o BVDV é um dos principais patógenos de bovinos, responsável por grandes perdas econômicas na pecuária (FAUQUET et al., 2005).

A cultura de células eucariotas tornou-se um recurso valioso tanto para a pesquisa quanto na área de biotecnologia industrial. Células mantidas em cultura são modelos biológicos mais simples que os estabelecidos com base em animais de experimentação e tendem a fornecer respostas simplificadas para problemas complexos de investigação biomédica (MIGITA, 2012).

Entre as divergentes áreas diretamente beneficiadas pelo desenvolvimento da cultura celular, também figuram a Imunologia e a Virologia (MIGITA, 2012). Na virologia, a cultura de células é muito utilizada para a obtenção viral, pois através do isolamento do vírus é possível avaliar o seu efeito em determinados tipos celulares, além de verificar quais células são de fato suscetíveis a determinados vírus (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

Estimativas sugerem que mais de um milhão de diferentes tipos de proteínas estão presentes nas células, nos tecidos e nos fluidos corporais em condições e/ou momentos distintos. O termo proteômica refere-se ao estudo do conjunto dessas moléculas, que são responsáveis direta ou indiretamente pelo controle de todos ou quase todos os processos biológicos (BARBOSA et al., 2012).

A proteômica se aplica, ainda, na busca de biomarcadores e alvos terapêuticos que auxiliem no diagnóstico e tratamento de doenças e busca por novos fármacos (mais específicos e com menos efeitos colaterais), bem como no diagnóstico precoce e no tratamento de várias doenças, incluindo câncer (KUHNER et al., 2009; SANTOS et al., 2004).

Portanto, muitos estudos têm focado em alterações nos genes, seus transcritos e produtos proteicos envolvidos em processos celulares importantes (BARBOSA et al., 2012). Assim, a proteômica surge para expandir a gama de informações biológicas, permitindo elucidar aspectos fundamentais podendo gerar no futuro um evidente impacto nas práticas agronômicas (SALVATO; CARVALHO, 2010).

A hipótese geral do presente estudo é que podem ocorrer diferenças na expressão de proteínas, resultante da presença do vírus BVDV em células MDBK. Portanto, o principal objetivo desse trabalho foi o de avaliar o perfil proteico global do meio de cultivo de células MDBK infectadas ou não com o vírus BVDV.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Identificar e comparar utilizando análises proteômicas, o perfil de glicoproteínas presentes no meio de cultivo de células MDBK infectadas ou não com o vírus BVDV.

2.2. ESPECÍFICOS

- Identificar os possíveis efeitos do vírus BVDV, CP, quando isolados em células MDBK.
- Identificar e caracterizar glicoproteínas diferencialmente expressas no meio de cultivo na ausência ou presença do vírus BVDV, durante o cultivo de células MDBK;
- Selecionar possíveis biomarcadores moleculares relacionados à interação BVDV-células MDBK.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. HISTÓRICO DO CULTIVO CELULAR

O cultivo de células baseia-se nos processos de isolamento e manutenção da viabilidade e da proliferação das células de um determinado tecido (animal ou vegetal) em um sistema *in vitro* constituído de nutrientes e fatores essenciais à sobrevivência, sob condições de temperatura, pH e osmolaridade controladas (AMARAL; MACHADO-SANTELLI, 2011). Consiste em manipular e manter células *in vitro*, sob condições definidas e controladas, preservando ao máximo suas características fisiológicas, bioquímicas e genéticas (CANDEIAS, 1996; FRESHNEY, 2005; WHO, 2010).

Essas células possibilitam o isolamento de cepas CP e NCP do vírus, sendo a última facilmente identificada pelos efeitos citopáticos causados no tapete celular, após 48 horas da inoculação viral. Por ser uma prova laboriosa, não é indicada para o processamento de um grande número de amostras (SALIKI; DUBOVI, 2004, RADOSTITS et al., 2007). Portanto, o isolamento em cultivo celular é considerado a prova ouro em alguns diagnósticos virológicos (BLUM; WEIBLEN, 2007).

O início do cultivo celular se deu diante da curiosidade sobre o desenvolvimento do tecido nervoso. Claude Bernard foi um dos primeiros a compreender a necessidade de se isolar células em sistemas artificiais para estudo do metabolismo celular sem influência do organismo (ASSIS et al., 2007). A necessidade de desenvolver vacinas virais, particularmente contra a poliomielite, durante a Segunda Guerra Mundial, também foi o propulsor do desenvolvimento do cultivo de células animais (ALVES et al., 2008).

A primeira tentativa de cultivar tecidos ocorreu no século XIX, através de Wilhelm Roux, em 1885. O embriologista alemão provou que células embrionárias de pinto poderiam ser mantidas vivas fora do organismo em solução salina (BACELLAR; SOUSA, 2004).

No início do século XX, vários autores almejavam alcançar novos resultados sobre o funcionamento do sistema nervoso (KESHISHIAN, 2004). Harrison inseria-se neste contexto por trabalhar, entre outras linhas de pesquisa, com processos relacionados à formação de fibras nervosas. Visando compreender como estas se originavam e como ocorria à inervação dos órgãos em direção ao sistema nervoso central, ele desenvolveu um método que possibilitava a retirada de células de embrião de anfíbios mantendo-as vivas em laboratório (HARRISON et al., 1907).

Tal procedimento mostrou-se, portanto, bastante eficaz por permitir que Harrison acompanhasse o crescimento e a formação das fibras nervosas, mostrando pela primeira vez que somente o tecido nervoso possuía essa propriedade. Contudo, as considerações de Harrison foram um marco para o cultivo de células (ASSIS et al., 2007).

Em 1910, Burrows desenvolveu experiências com tecidos provenientes de embrião de galinha mergulhando-os em plasma sanguíneo, o que possibilitou o cultivo de tecidos do sistema nervoso e do tecido cardíaco do embrião.

Segundo Burrows, o plasma de galinha seria um fator importante, pois possuía alta concentração de fibrina e quantidades reduzidas de enzimas proteolíticas, além de facilitar a visualização da cultura ao microscópio (REBELLO, 2014).

Pela primeira vez, já em 1913, culturas celulares foram utilizadas para propagar o vírus vaccínia (CANDEIAS, 1996). Em 1930, os vírus da febre amarela e varíola foram propagados com sucesso em células. A partir de 1933, com o desenvolvimento dos métodos de cultivo celular foi possível pesquisar alguns vírus através da multiplicação *in vitro*. O cultivo celular passou então a substituir os animais de laboratório e os ovos embrionados, devido à sua maior especificidade, praticidade e menor custo (CANDEIAS, 1996; FREITAS, 2006).

Earle et al., (1947) desenvolveram a técnica de cultivo celular em monocamada, uniestratificada, utilizando meio de cultura líquido. Em 1952, Dulbecco introduziu a utilização de uma enzima proteolítica de origem pancreática, a Tripsina, nos métodos de virologia para desagregar, individualizar e soltar as células das superfícies de aderência (FREITAS, 2006).

O avanço na cultura de células ocorreu, em grande parte, por intermédio dos experimentos de Hayflick e Moorhead, em 1961, considerados clássicos, nos quais eles utilizaram células de vida finita. Nakamura et al., (1962), no Japão, estabeleceram a linhagem (VERO), oriunda de rim de macaco-verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Essa célula é uma das poucas, na atualidade, aprovadas para uso em produção de vacinas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), o que a torna um excelente modelo de pesquisas para o desenvolvimento de novas vacinas (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

Os pesquisadores Evans e Kaufman, (1981) estabeleceram a primeira cultura de células-tronco a partir de embriões de camundongos. E a primeira linhagem de células-tronco embrionárias humanas foi desenvolvida em 1998, pelo pesquisador americano James Thomson. Em 1986, Martin e Evans isolaram e cultivaram células-tronco pluripotentes de embrião de camundongo.

Dez anos mais tarde, James Thomson isolou e cultivou células-tronco embrionárias humanas provenientes da fase de blastocisto, doadas de clínicas de fertilização *in vitro* (FIV). John Gearhart, por sua vez, conseguiu derivar células-troncos embrionárias humanas de uma população de células-tronco fetais, oriundas de fetos abortados (ROCHA, 2008).

3.2. LINHAGENS CELULARES

Um dos grandes avanços no cultivo de células se deu com o estabelecimento de linhagens celulares. Linhagem celular é uma população de células específicas originadas pelo subcultivo sequencial de uma população celular primária, na qual pode ser usada para estabelecer um banco, com conteúdo uniforme e estocado em um contêiner apropriado, sob condições definidas de armazenamento. A caracterização de uma linhagem resulta de um conjunto de dados referentes ao crescimento populacional, citogenética, suscetibilidade celular à amostras virais, identificação da espécie e tecido de origem (BRETAS, 2011)

. Assim, no cultivo celular a caracterização das células em cultivo é imprescindível para: comprovar a sua origem, descartar contaminação cruzada com outras linhagens celulares, identificar o nível de diferenciação celular (diferenciadas ou não), determinar o tipo de linhagem (continua ou finita), a capacidade proliferativa, as características de replicação *in vitro*, eficiência de plaqueamento, dentre outras caracterizações (ALVES; GUIMARÃES, 2010). Impetrar, caracterizar e selecionar uma linhagem celular de alto desempenho é a chave para o desenvolvimento dos bioprocessos (BUTLER, 2007).

O desenvolvimento dessa biotécnica foi fundamental na elaboração de procedimentos experimentais e nas primeiras elucidações da interação célula-célula. O cultivo de células consiste nos processos de isolamento e manutenção da viabilidade e da proliferação das células de um determinado tecido (animal ou vegetal) em um sistema *in vitro* constituído de nutrientes e fatores essenciais à sobrevivência, sob condições de temperatura, pH e osmolaridade controladas (AMARAL; MACHADO-SANTELLI, 2011).

As células MDBK e VERO são amplamente utilizadas na pesquisa em virologia e na rotina diagnóstica. A célula MDBK é uma linhagem contínua das células obtidas de tecido renal, de um bovino adulto, *Bos taurus*, em 18 de fevereiro de 1957 (MADIN; DARBY, 1958).

Esta linhagem é susceptível ao herpesvírus bovino tipo I, ao parvovirus bovino, ao adenovirus bovino 2 e 3, ao vírus da diarreia viral bovina 1, ao parainfluenza 3, dentre outros (HAY; CAPUTO; CEHN, 1994). Já as células VERO foram obtidas do tecido do rim de macaco verde Africano adulto e livre de patógenos, por Yasumura da Universidade de Chiba, no Japão, em 1962. Esta linhagem é susceptível a diversos vírus, entre eles o Poliovirus humano 1, 2 e 3; Simian Vírus, SV40; e Parainfluenza tipo 2 (HAY; CAPUTO; CEHN, 1994).

Contudo, atualmente, a cultura de células não se limita ao estudo do comportamento de determinado tecido ou célula *in vitro*. Seu uso, portanto, estende-se à medicina, pois células em cultivo possuem um importante papel no tratamento de doenças degenerativas (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

3.3. APLICAÇÕES DOS CULTIVOS CELULARES

O mercado global ligado a biotecnologia movimenta bilhões de dólares ao ano (BUTLER; MENESES-ACOSTA, 2012). Este sucesso econômico é sustentado pela produção de biofármacos, principalmente anticorpos monoclonais, produzidos através de bioprocessos baseados no cultivo de células de mamíferos (BUTLER; MENESES-ACOSTA, 2012). Portanto, a cultura de células permite pesquisas no campo da biotecnologia, produção de proteínas e antígenos, testes de toxicidade, replicação de vírus, etc. (BUTLER; MENESES-ACOSTA, 2012).

O cultivo de células tem aberto possibilidades de regeneração de tecidos e órgãos com algum tipo de dano biológico. A biotecnologia para produção de tecidos *in vitro*, bem como a elaboração de procedimentos que envolvam o reparo e regeneração tecidual *in vivo* apresenta um notável crescimento ao longo dos séculos (COSTA; MIGUEL; ROSA, 2010).

Existem muitas aplicações para a cultura de células. As primeiras relacionam-se com a produção de anticorpos monoclonais. Os anticorpos monoclonais possuem sua maior aplicação nos imunoenaios, como o Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Além disso, esses anticorpos também são muito utilizados associados a marcadores radioativos em imunocintilografia (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

Os dados produzidos à partir de culturas de células eucariotas *in vitro* podem ser suficientemente informativos, particularmente para estudos funcionais, bioquímicos e moleculares, como também para análise de alvos farmacológicos e produção de produtos biológicos, incluindo vacinas e anticorpos (MIGITA, 2012).

Diversos avanços na pesquisa básica, como a descrição de fenômenos biológicos como a pinocitose, a hibridação celular e a inibição de crescimento por contato célula-célula (a qual auxiliou na discriminação entre células normais e malignas), foram beneficiados pelo desenvolvimento do cultivo de células.

Na virologia, a cultura de células é muito utilizada para a obtenção viral. Como os vírus necessitam de hospedeiros, é na cultura de células que se torna possível cultivá-los. A cultura de células permite o isolamento do vírus para avaliar o seu efeito em determinados tipos celulares, além de verificar quais células são de fato suscetíveis a determinados vírus (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

Novas áreas de pesquisa, como a medicina regenerativa e a engenharia de tecidos também se beneficiam com a cultura celular. O desenvolvimento do cultivo de células associado a medicina regenerativa tornou-se crucial diante o aumento da expectativa de vida da população e, conseqüentemente, aumento de casos de neoplasia, lesões traumáticas e falência de órgãos (BOROJEVIC, 2008).

Grandes avanços foram obtidos com a utilização de células-tronco pela medicina regenerativa em transplantes e reparação de órgãos, como também pela engenharia de tecidos para criação de tecidos artificiais (pele artificial para queimados) (MIGITA, 2012), como também recentemente, com o desenvolvimento da engenharia tecidual, o cultivo de agrupamentos celulares permitindo a produção de enxertos para transplante (BARBOSA et al., 2015).

Entretanto, é fundamental o emprego das células adequadas aos propósitos da experimentação e em condições que permitam garantir fidelidade dos resultados, notadamente à ausência de contaminação por microrganismos indesejáveis ou por outro tipo de célula que não seja a esperada. Portanto, para se manter o controle de qualidade das culturas celulares um conjunto de fatores é necessário (MIGITA, 2012).

A obtenção de matrizes originais de linhagens celulares de fontes confiáveis, como nos principais biorrepositórios. A American Type Culture Collection (ATCC), a Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), a Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank, (JCRB) e a The Institute of Physical and Chemical Research - Cell Bank BioResource Center (RIKEN), mantêm um banco de células autenticadas, garantido assim a qualidade do produto biológico disponibilizado (MIGITA, 2012).

Contudo, nota-se que são inúmeros os benefícios científicos e tecnológicos proporcionados pelo desenvolvimento da cultura de células eucarióticas. Por outro lado, o emprego de cultura celular em pesquisa demanda conhecimento prévio das singularidades de cada linhagem, posto que a interpretação dos resultados obtidos seja estritamente dependente do perfil biológico das células utilizadas (MIGITA, 2012).

3.4. HISTÓRICO DA DIARREIA VIRAL BOVINA (BVD)

A primeira descrição da Diarreia Viral Bovina ocorreu na década de 1940. No Canadá Ocidental ficou conhecida como “doença X”, descrita em duas formas: subaguda e aguda. A primeira esteve provavelmente presente na região durante anos, onde a quantidade de animais afetados em um rebanho era de 1 a 2 animais (com posterior morte), e com aparecimento de novos casos de forma não constante em algumas semanas (SILVA, 2000).

Em 1946, nos Estados Unidos da América (EUA), investigadores da Universidade de Cornell descreveram uma nova doença transmissível entre bovinos. Tratava-se de uma enfermidade diarreica a qual apresentava altos índices de morbidade, baixa mortalidade, e etiologia ainda não definida. Num primeiro momento, tal doença fora caracterizada com os sintomas de leucopenia, febre alta, depressão, diarreia, desidratação, anorexia, salivação, descargas nasais, erosões gastrointestinais e hemorragias em vários tecidos (OLAFSON et al, 1946).

Após o relato da forma aguda em Nova Iorque, Childs (1946), descreveu uma doença idêntica, porém, mais grave. Este relato foi considerado como a primeira descrição da “Doença das Mucosas” (DM) (DEREGT, 2005). Tratava-se de uma doença gastroentérica, com aspectos clínicos e patológicos compatíveis com a forma clássica da infecção (CORREA; NETO; BARROS, 1968).

Em 1947, foram publicados novos conhecimentos sobre o vírus, descrevendo que a doença poderia ser transmitida por matéria orgânica livre de bactérias, assumindo que o agente infeccioso era viral (MARQUES, 2003).

Com o passar do tempo, a doença recebeu várias denominações (diarreia a vírus de Nova York, diarreia a vírus de Indiana e enfermidade das mucosas), sem suspeitarem de que era o mesmo agente que causava as diferentes manifestações clínica-patológicas já descritas (GOENS, 2002).

Ramsey e Chivers, (1953) relataram a DM nos EUA, nomeando por fim, a doença (RAMSEY; CHIVERS, 1953).

A DM afetou apenas alguns animais do rebanho, tendo índices mais elevados de casos fatais (DEREGT, 2005). Cogitou-se, portanto, que se tratava de uma entidade causadora da doença diferente daquela que causava o BVDV, mas, mais uma vez, não foi encontrado nenhum agente bacteriano associado à doença.

Em 1956, Pritchard et al., descreveram uma “moléstia nas mucosas dos bovinos”, no estado de Indiana (EUA) e, como dito anteriormente, postergou-se até que fosse suspeitado que todas essas manifestações clínicas foram ocasionadas pelo mesmo agente (CORREA; CORRÊA, 1992).

Foi no final da década de 1960, que os mesmos autores, isolaram agentes virais em animais acometidos pela doença. Este agente etiológico, portanto, fora nomeado como Vírus da Diarreia Viral Bovina / Doença das Mucosas (GOENS, 2002).

Ainda na década de 1960, foi demonstrado que o BVDV estava antigenicamente relacionado com o vírus da Peste Suína Clássica (CSFV). Mais tarde, evidências sorológicas indicaram que o agente causador da doença das Fronteiras em Ovinos (BDV) também estava relacionada com o BVDV e CSFV (PLANT; LITTLEJOHNS; GARDINER, 1973).

Nos anos de 1970, ficou estabelecido que animais com infecções congênitas eram economicamente desvantajosos e, geralmente, vinham à óbito em poucos meses, mas ao sobreviverem ficariam constantemente infectados, possuindo por sua vez, quantidades deficitárias de anticorpos contra o vírus. As lesões microscópicas dos animais persistentemente infectados (PI) foram primeiramente observadas no cérebro e rins (DEREGT, 2005).

Em 1973, este grupo de viroses foi denominado de *Pestivirus* (HORZINEK, 1991). A investigação sobre a patogenia do complexo BVDV/DM, depois que esse passou a ser conhecido, levou a estudos com infecções experimentais em vacas gestantes e bezerros.

Nessa ocasião, abortos, bem como distúrbios teratogênicos foram encontrados e associados a infecções intrauterinas com o BVDV (MALMQUIST, 1968).

No Brasil, os primeiros estudos sorológicos da infecção datam do início da década de 1970, no Rio Grande do Sul (RS), onde se evidenciou a presença de anticorpos anti-BVDV em rebanhos onde foram detectados 39% de animais soropositivos em 229 soros examinados (WIZIGMANN; VIDOR; RICCI, 1971). Desde então, diversos estudos sorológicos foram realizados em várias regiões, demonstrando a ampla distribuição da infecção no rebanho bovino brasileiro.

Já no final dos anos de 1980, ocorreram avanços significativos na biologia molecular do vírus, como o primeiro sequenciamento genômico das estirpes, a descoberta da proteína marcadora para o vírus citopatogênico e a primeira evidência do RNA recombinante nas estirpes citopatogênicas do vírus (DEREGT, 2005).

No ano de 1990, o vírus foi considerado como amplamente disseminado no rebanho brasileiro, com 47,7% de ocorrência quando realizada pesquisa sorológica de amostras (PITUCO; DEL FAVA, 1998).

Em 1994, Pellerin et al., afirmaram que as estirpes de BVDV (isoladas da síndrome hemorrágica e da forma aguda da doença) formavam um novo grupo genético (genótipo) do BVDV, distinto das estirpes mais antigas que se utilizavam nas vacinas. O novo grupo foi designado tipo 2 (BVDV-2) e o grupo comparado de estirpes antigas como tipo 1 (BVDV-1). No mesmo ano, Pellerin et al. (1994) subdividiram o BVDV-1 em dois subgrupos: 1a e 1b.

A fim de criar uma lista única de doenças obrigatórias, a World Organisation for Animal Health, (OIE), definiu critérios para examinar a inclusão ou não de uma determinada doença em uma lista única (aprovada em maio de 2004). Em 2005, a primeira lista outrora elaborada pela OIE, sofrera modificações quanto ao critério para inclusão de novas doenças, surgindo assim uma nova lista, entrando em vigor no ano de 2006. Para o ano de 2017, a lista inclui 116 doenças animais, infecções e infestações.

(Figura 1) (OIE, 2017).

Figura 1: Lista de Doenças, Infecções e Infestações em vigor

Multiple species diseases, infections and infestations	Cattle diseases and infections
+ Anthrax	+ Bovine anaplasmosis
+ Bluetongue	+ Bovine babesiosis
+ Brucellosis (<i>Brucella abortus</i>)	+ Bovine genital campylobacteriosis
+ Brucellosis (<i>Brucella melitensis</i>)	+ Bovine spongiform encephalopathy
+ Brucellosis (<i>Brucella suis</i>)	+ Bovine tuberculosis
+ Crimean Congo haemorrhagic fever	+ Bovine viral diarrhoea
+ Epizootic haemorrhagic disease	+ Enzootic bovine leukosis
+ Equine encephalomyelitis (Eastern)	+ Haemorrhagic septicaemia
+ Foot and mouth disease	+ Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis
+ Heartwater	+ Infection with <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC (Contagious bovine pleuropneumonia)
+ Infection with Aujeszky's disease virus	+ Lumpy skin disease
+ Infection with <i>Echinococcus granulosus</i>	+ Theileriosis
+ Infection with <i>Echinococcus multilocularis</i>	+ Trichomonosis
+ Infection with rabies virus	+ Trypanosomosis (tsetse-transmitted)
+ Infection with Rift Valley fever virus	
+ Infection with rinderpest virus	
+ Infection with <i>Trichinella</i> spp.	
+ Japanese encephalitis	
+ New world screwworm (<i>Cochliomyia hominivorax</i>)	
+ Old world screwworm (<i>Chrysomya bezziana</i>)	
+ Paratuberculosis	
+ Q fever	
+ Surra (<i>Trypanosoma evansi</i>)	
+ Tularemia	
+ West Nile fever	

Fonte: OIE, 2017

O BVDV pode replicar-se em diferentes tipos de cultivos celulares, Entre os mais sensíveis, estão as culturas de rim bovino, tendo como suplemento o SFB, livre de BVDV e anticorpos específicos (SANDVIK, 1999).

O vírus tem a capacidade de deprimir o sistema imune de bovinos provocando a depleção das células de defesa - linfócitos T e B - e afetando a função macrofágica, predispondo, assim, o organismo do hospedeiro às infecções secundárias (RADOSTITS et al., 2007).

3.5. AGENTE ETIOLÓGICO

O vírus BVDV é um agente infeccioso de distribuição mundial, cuja disseminação na população bovina fora comprovada por meio de isolamentos e inquéritos sorológicos (VIDOR; 1974; PITUCO et al., 1997; DIAS; SAMARA, 2003; FLORES et al., 2005). É classificado na família Flaviviridae, e incluído, juntamente com os vírus da CSFV e BDV, no gênero *Pestivirus* (RIDPAHT, 2010).

O BVDV é um vírus envelopado, possuindo como genoma uma molécula de RNA de cadeia simples, polaridade positiva, com aproximadamente 12,5 Kb (FRANCKI; FAUQUEST; KNUDSON, 1991).

Os gêneros da família Flaviviridae diferem entre si pela extensão, estrutura e organização genômica, número e função de produtos gênicos e em alguns aspectos biológicos. Várias dessas características são utilizadas para sua classificação em gêneros e espécies (RIDPATH; FLORES, 2007). As principais diferenças entre os gêneros estão apresentadas na **tabela 1**.

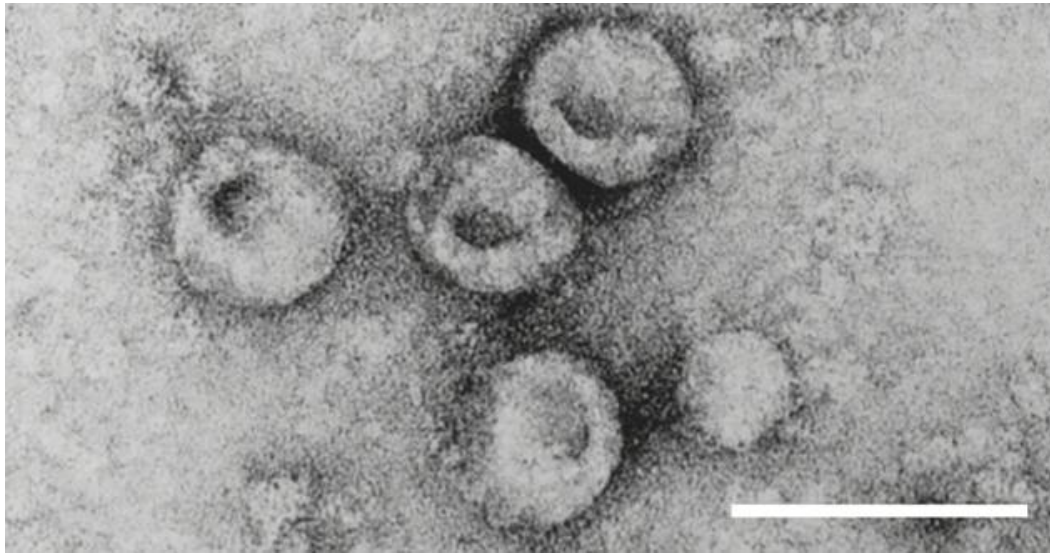
Tabela 1: Características gerais dos três gêneros da família Flaviviridae

GÊNERO	GENOMA	MULTIPLICAÇÃO		
		EM CULTIVO CELULAR	HOSPEDEIROS	VETORES
<i>Flavivirus</i>	11 Kb	X	Humanos e Animais	X
<i>Pestivirus</i>	12.5 Kb	X	Animais	-
<i>Hepacivirus</i>	9.6 Kb	-	Humanos	-

Fonte: RIDPATH; FLORES, 2007.

Os virions são de 40-60 nm de diâmetro e forma esférica (**Figura 2**). O envelope possui subunidades em forma de anel de 10 a 12 nm na sua superfície (LAUDE, 1979); o nucleocapsídeo tem como genoma uma fita única de RNA, de polaridade positiva, de aproximadamente 12,3 Kb com predisposição a altas taxas de mutação (RIDPATH, 2005). Essas mutações levam à heterogeneidade do BVDV, que propicia a evasão do sistema imunológico do hospedeiro (RIDPATH, 2005; KELLING, 2004).

Figura 2: *Pestivirus*. Negative contrast electron micrograph of particles of an isolate of bovine viral diarrhea vírus

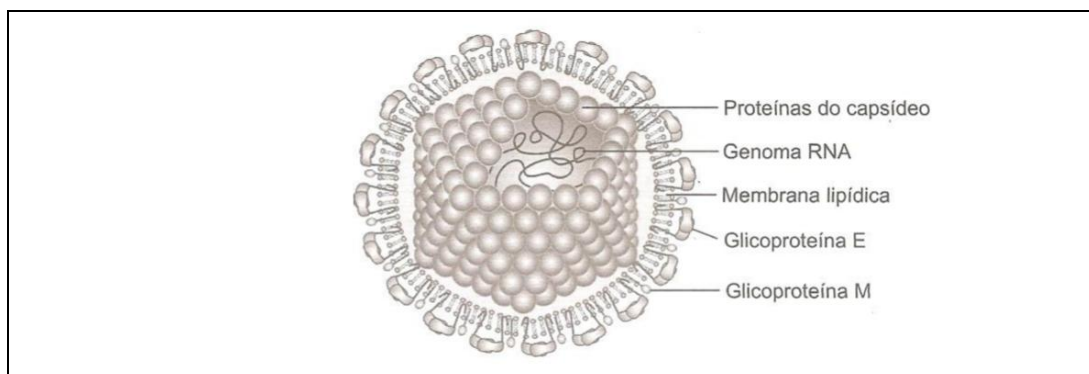


Fonte: LAUDE, 1979

De acordo com a capacidade de produzir alterações microscópicas em culturas celulares, os isolados de BVDV também podem ser classificados em dois biotipos: citopatogênico (CP) e não citopatogênico (NCP) (GOYAL; RIDPATH, 2005), os quais variam na virulência, podendo apresentar-se ainda tanto na forma avirulenta até aquela altamente virulenta (RIDPATH, 2010).

A família Flaviviridae abriga vários vírus de importância em saúde humana e animal (**Figura 3**). É dividida em três gêneros: *Flavivirus*, *Hepacivirus* e *Pestivirus*. Entre os Flavivirus estão o vírus da Febre Amarela (YFV), o vírus da Dengue, e o Hepacivirus. Tem como único membro o vírus da Hepatite C (HCV), patógeno exclusivo de humanos (RIDPATH; FLORES, 2007).

Figura 3: Ilustração esquemática de uma partícula da família Flaviviridae com os seus componentes



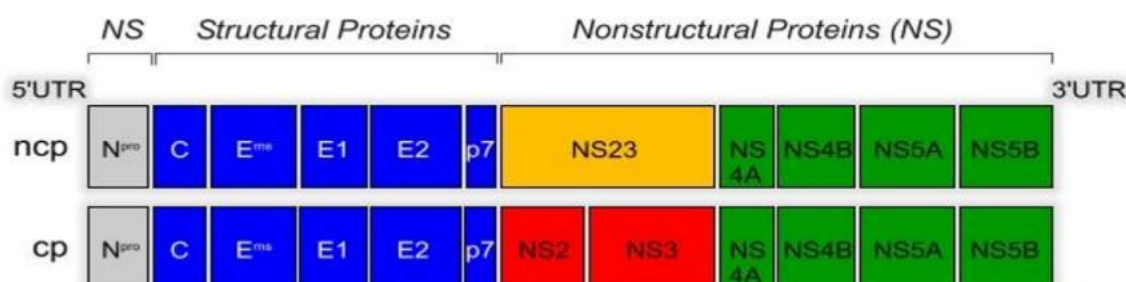
Fonte: RIDPATH; FLORES, 2007

O virion é resistente às variações de pH (5,7 a 9,3), ao contrário dos demais vírus da família Flaviviridae, conseguindo sobreviver no meio ambiente até duas semanas. São rapidamente inativados pelo calor, por solventes orgânicos, detergentes e desinfetantes comuns, como fenóis e clorexidine (KELLING, 1996; RIDPATH, 2005). Contudo, o período de incubação do BVDV é de aproximadamente 5 a 7 dias e a virêmia é detectada nas primeiras 24 horas após a infecção, podendo persistir por até 15 dias. Na maioria das vezes, as infecções nos bovinos ocorrem de forma inaparente ou pouco característica, com sinais de hipertermia transitória e leucopenia. Estima-se que 70% a 90% das infecções sejam assintomáticas (BAKER, 1995).

3.6. GENOMA DO VÍRUS

A alta frequência de mutação, a tendência para a recombinação genética e a pressão seletiva imposta pela resposta imune do hospedeiro levam à criação da diversidade genética do BVDV. Essas variantes são agrupadas com base na homologia das sequências de segmentos do genoma viral e formam os genótipos e os subgenótipos (BOLIN; GROOMS, 2004). A caracterização genotípica é realizada com base na diversidade genética encontrada na região 5'UTR (**Figura 4**), ou nas proteínas não estruturais Npro e E2 (VILCEK et al., 2005). As variações nas sequências da região 5' UTR são conservadas entre as diferentes espécies de *Pestivirus* e são utilizadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) precedida pela Transcrição Reversa (RT-PCR) para a segregação dos isolamentos de BVDV em genótipos e subgenótipos (RIDPATH; BOLIN, 1998).

Figura 4: Esquema do genoma do vírus BVDV



Fonte: <http://www.bvd-info.ch/images/stories/bvd/vet/genome.jpg>

A diversidade genética que ocorre entre as estirpes isoladas no campo é característica comum entre os BVDV, os quais existem na natureza como quaisquer espécies (uma grande quantidade de mutantes virais). Quando comparados aos DNA-vírus, os RNA-vírus são altamente mutáveis e, sobretudo aqueles de polaridade positiva como o BVDV, estão sujeitos a modificações genômicas no ácido nucléico que envolve pontos de mutação ou recombinações, homólogas ou heterólogas (BOLIN; GROOMS, 2004).

As estirpes de BVDV foram segregadas nos genótipos BVDV 1 e BVDV 2, com base na comparação das sequências da região 5'UTR do genoma viral (PELLERIN et al., 1994).

A organização deste genoma consiste em uma longa fita aberta de leitura *Open Reading Frame* (ORF), com cerca de 4000 códon, contornada por duas regiões não traduzidas, 5'UTR (360-390 bases) e 3'UTR (200-240 bases) (RIDPATH, 2005).

A ORF é traduzida em uma única poliproteína, que é clivada pelas proteases virais e celulares, dando origem a 11 e 12 polipeptídeos estruturais e não estruturais (CHASE; ELMOWALID; YOUSIF, 2004; RIDPATH, 2005), descritas nos **quadros 1 e 2**.

Quadro 1: Descrição de proteínas estruturais do vírus da Diarreia Viral Bovina

Proteínas Estruturais	Descrição
C	Proteína do capsídeo – forma a nucleocapside
Erns	Glicoproteína do envelope – induz a produção de anticorpos
E1	Glicoproteína do envelope
E2	Glicoproteína do envelope – possui epítomos e é indutora de anticorpos neutralizantes
p7	Função desconhecida – necessária para produzir vírus infeccioso

Fonte: CHASE; ELMOWALID; YOUSIF, 2004; RIDPATH, 2005

Quadro 2: Descrição de proteínas não-estruturais do vírus da Diarreia Viral Bovina

Proteínas Não – Estruturais	Descrição
N ^{pro}	Autoproteólise
NS23 (NCP)	Anticorpos contra NS23 tem reação cruzada com outros <i>Pestivirus</i>
NS3 (CP)	Proteína que causa a citopatologia em células
NS2 (CP)	Aparece no biótipo citopatogênico
NS4A	Cofator da serina protease
NS4B	Componente da replicase
NS5A	Componente da replicase
NS5B	Atividade RNA Polimerase

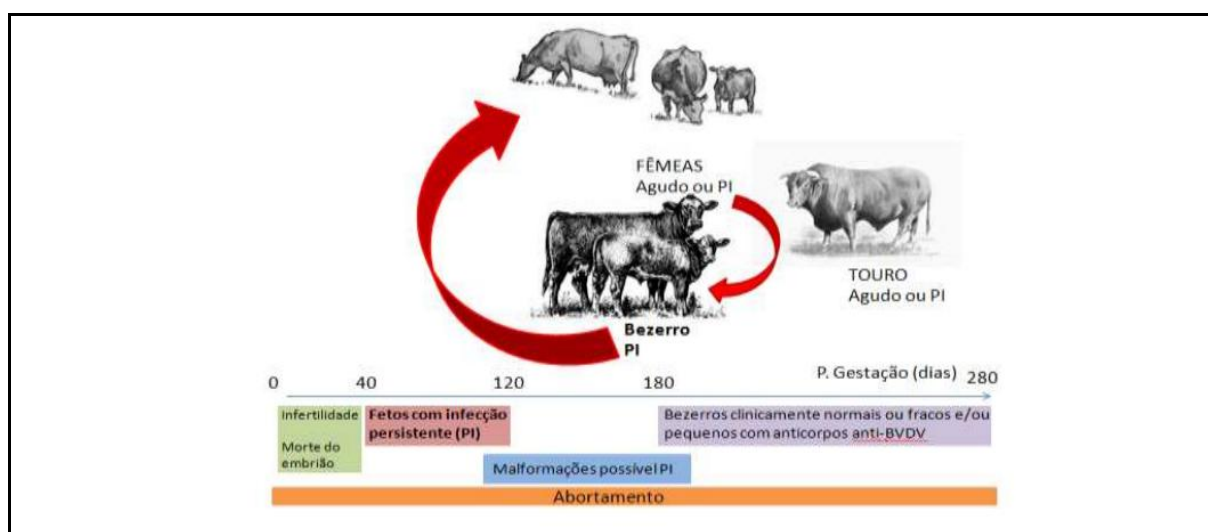
Fonte: CHASE; ELMOWALID; YOUSIF, 2004; RIDPATH, 2005

3.7. PATOGENIA

A BVD é uma doença infecciosa que possui uma patogenia complexa, produzindo por sua vez uma doença multifacetada. Ao longo dos quase 65 anos desde a sua descoberta, muitos foram os esforços para se compreender a etiologia, transmissão, patogenia, diagnóstico e profilaxia da doença (CANÁRIO, et al., 2009).

A patogenia da infecção apresenta características peculiares, que se refletem na epidemiologia e não são observadas em outras enfermidades (DIAS, 2008). Apesar de ter sido originalmente associado a casos de doença entérica, a patogenia do vírus mostra que sua atuação essencial está relacionada a processos reprodutivos. Logo, o maior impacto econômico é de fato causado no aspecto reprodutivo (ELLIS et al., 1995), pois toda a epidemiologia da doença está relacionada à infecção fetal e ao nascimento de bezerros PI (Figura 5) (FLORES, 2003).

Figura 5: Perdas reprodutivas relacionada à infecção pelo BVDV em fêmeas prenhes não imunes



Fonte: FLORES, 2003

O epitélio do trato respiratório superior (porta de entrada preferencial do vírus), orofaringe e o tecido linfóide regional parecem ser os sítios primários de replicação após a infecção pela via oro-nasal, (RIDPATH, FLORES, 2007). Por isso as lesões ocorrem primariamente no trato gastrointestinal, no sistema linfático e no trato respiratório superior (HIRSH; ZEE, 2003).

Animais portadores eliminam o vírus na descarga nasal, leite, urina e saliva. Ocorre então penetração do vírus no organismo pelas vias nasal e oral. A multiplicação se inicia nas células epiteliais das tonsilas e no tecido linfóide da boca e da faringe. Na sequência, o vírus atinge a corrente sanguínea (associada aos leucócitos) pelos vasos linfáticos. Muitas concentrações do vírus aparecem nas vias respiratórias, no baço, nos linfonodos e nas glândulas salivares (MARQUES, 2003).

Diversos fatores estão interligados na patogenia do vírus. Alguns fatores do hospedeiro influenciam na consequência da infecção, sendo eles: hospedeiro imunocompetente (ou imunotolerante) frente ao vírus, idade do animal, infecção transplacentária no momento da infecção, idade gestacional do feto, indução de tolerância imune no feto e o surgimento de competência imunofetal (aproximadamente em 180 dias de gestação), *status* imune e presença de fatores ambientais estressantes no momento da infecção (RADOSTITS et al., 2002).

Portanto, dentre os inúmeros vírus os quais infectam bovinos, o BVDV é aquele que apresenta a patogenia mais complexa (DEREGT, 2005).

3.8. ASPECTOS GERAIS DA EPIDEMIOLOGIA DA DIARREIA VIRAL BOVINA

Desde os primeiros relatos de uma nova enfermidade aparentemente transmissível, descritos por Olafson et al., (1946), o BVDV está relacionado a um complexo de síndromes que afetam o sistema reprodutivo, respiratório, digestório, circulatório, imunológico, linfático, musculoesquelético e o sistema nervoso central, sendo denominado como um patógeno que apresenta muitas faces (BROCK, 2004).

Vários estudos epidemiológicos atribuíram ao BVDV o importante papel no complexo respiratório bovino (CAMPBELL, 2004), como agente infeccioso primário ou como agente imunossupressor (FULTON et al., 2006).

Teoricamente, todos os rebanhos bovinos estão infectados ou já sofreram a infecção num determinado momento (NETTLETON; ENTRICAN, 1995). A frequência de animais portadores de anticorpos chega a atingir 70 a 80%, e de rebanhos na América do Norte e em alguns países europeus até 80% (FLORES et al., 2005).

O BVDV foi relatado em diversos países, tais como o Reino Unido, Escócia, Noruega, Dinamarca, Suécia, Alemanha, Áustria, Itália, Suíça, França, Espanha, Portugal, Brasil, Cuba, Uruguai, Chile, Jordânia, Nova Zelândia, Grécia, Bélgica, entre outros (BILLINIS et al., 2005; LETELLIER et al., 2005; GROOMS; BAKER; AMES, 2006).

No Canadá, a prevalência de bovinos com anticorpos neutralizantes contra o BVDV foi de 40,6% (DURHAM; HASSARD, 1990), e no Zimbábue, Muvavarirwa et al. (1995) encontraram 79,2% das amostras reagentes. Paisley, Wells, Schmitt, (1996) verificaram que 68,6% das amostras de bovinos de corte de rebanhos nos EUA apresentavam anticorpos contra o BVDV, e na Croácia, Biuk-Rudan et al. (1998) encontraram 79,2% de bovinos reagentes. A prevalência dos anticorpos antivirais no gado bovino diverge entre países e pode variar também entre regiões geográficas dentro do mesmo país (KAHN, 2007).

Os fatores ambientais tais como a densidade da população, tipo de plantel (leite ou corte), bem como a aplicabilidade das práticas de biossegurança no manejo, influenciam a gravidade bem como a prevalência da doença em determinadas populações (HOUE, 1999; BROCK, 2004).

Por exemplo, a influência do tamanho da população na distribuição do BVDV revelou que os rebanhos de maior dimensão são mais prováveis de serem infectados do que os animais de rebanhos pequenos (RIBEIRO; PEREIRA, 2004; TALAFHA, et al., 2008).

Os primeiros estudos sorológicos da infecção no Brasil descrevem três surtos da doença com quadro clínico-patológico compatível com a infecção pelo BVDV (WIZIGMANN; VIDOR; RICCI, 1971). Desde então, divergentes estudos sorológicos têm sido realizados em várias regiões, demonstrando a ampla distribuição da infecção no rebanho bovino brasileiro (QUINCOZES, 2005).

Pituco e Del Fava (1998), também analisaram cerca de 4065 amostras de rebanhos originados de vários Estados Brasileiros, no Laboratório de Viroses de Bovídeos (LVB) do Instituto Biológico de São Paulo (IB), no período de julho de 1995 a agosto de 1997, com a detecção de 47,7% de reagentes ao BVDV (PITUCO; DEL FAVA, 1998).

Na maioria dos trabalhos realizados no Brasil, foi pesquisado anticorpos apenas contra o BVDV 1, o que possivelmente resultaria na falha da detecção de anticorpos em amostras com títulos baixos ou moderados contra o BVDV 2 (FLORES et al., 2005). Implicação essa que justifica a necessidade da utilização de vírus de ambos os genótipos nos testes de Virusneutralização (VN) (FLORES et al., 2000; FULTON; BURGE, 2000; FULTON et al., 2002; CHASE; CHASE; FAWCETT, 2003).

Portanto, o principal desafio em estudos epidemiológicos, consiste na detecção do estágio em que se encontra a infecção, da forma que está ocorrendo a difusão do BVDV, e da maneira pela qual ocorre a disseminação do vírus entre os rebanhos, além do desafio em quantificar as perdas econômicas (HOUE, 1999).

3.9. ANIMAIS PERSISTENTEMENTE INFECTADOS (PI)

A principal característica do BVDV é a capacidade de induzir infecção fetal persistente, sendo um aspecto único da patogenia do vírus. Este fenômeno consiste no mecanismo básico pelo qual o BVDV é mantido no rebanho, refletindo-se numa importante consequência do ponto de vista epidemiológico, o nascimento de animais PI (DIAS, 2008).

Esses animais são o reservatório primário do BVDV, sendo considerados como a maior fonte de infecção nos rebanhos. Estes animais são imunotolerantes ao vírus, ou seja, seu sistema imunitário não responde ao vírus, logo, o mesmo continua a multiplicar-se, sendo excretado ao longo de toda a vida do animal (CANÁRIO et al., 2009), portanto, a imunotolerância é o mecanismo pelo qual o BVDV mantém-se nos rebanhos por transmissão direta e indireta (BROCK, 2003).

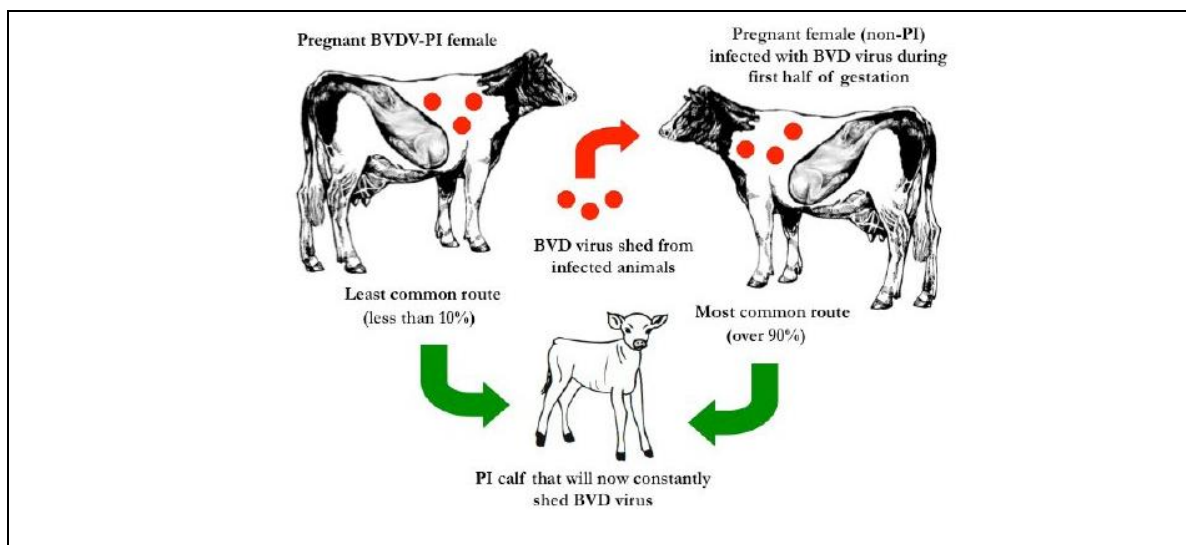
Os animais PI constituem-se no ponto central da epidemiologia da infecção pelos seguintes motivos: são muitas vezes saudáveis, não são facilmente identificáveis, não são reagentes, representam fontes contínuas e abundantes de vírus para outros animais, eliminam grandes quantidades de vírus (secreções e excreções) e fêmeas PI produzem bezerros PI (DONIS, 1989).

Outras fontes de infecção, tais como bubalinos, ovinos, caprinos, suínos (HOUE, 1995) e algumas espécies silvestres, como antílopes, cervídeos, alces, camelos, lhamas, alpacas também são observados (EVERMANN, 2006).

Na presença de um animal PI, a infecção pelo BVDV dissemina-se rapidamente para a maioria dos animais do rebanho, induzindo-os a altos títulos de anticorpos neutralizantes (persistindo por muitos anos). Essa característica é utilizada para a identificação de rebanhos com animais PI, por meio da determinação de títulos de anticorpos em animais denominados sentinelas ou pela detecção de anticorpos no leite (SEKI et al., 2006).

Os bezerros que assim nascem podem parecer clinicamente saudáveis, no entanto são virêmicos, eliminando o vírus constantemente e em grandes quantidades (DEREGT; LOEWEN, 1995; FLORES, 2003; KAHN, 2007). Por isso são considerados os grandes disseminadores da doença. Alguns animais podem até alcançar a idade adulta, e caso isso ocorra com fêmeas PI, a sua progênie também será PI (**Figura 6**).

Figura 6: Duas rotas de nascimento de bezerros PI. Fêmea PI expõe seu feto constantemente ao vírus durante a gestação, porém a fêmea Non-PI pode ser infectada durante o início da gestação

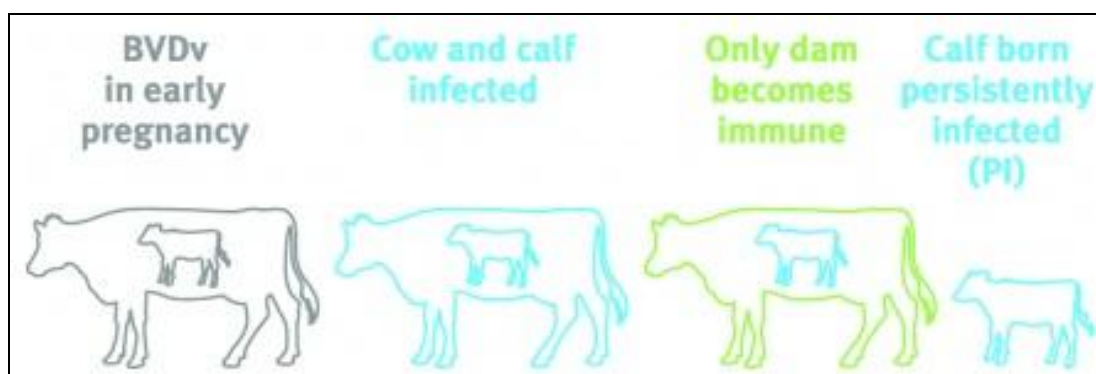


Fonte: http://www.aces.edu/pubs/docs/A/ANR-1367/images/img_3.jpg

O animal PI é resultante da infecção uterina pelo biótipo NCP nos primeiros 125 dias de gestação. Nessa fase, o sistema imune do feto não está totalmente desenvolvido e não reconhece o vírus como estranho (DEREGT; LOEWEN, 1995; GROSS, 2004). Os animais PI têm maior probabilidade de contraírem outras doenças, por isso tem menor tempo de vida (FLORES et al., 2005; KAHN, 2007).

Sobretudo, uma proporção significativa (28%) de animais PI vive até 2 anos ou mais, isto é, na fase produtiva do seu ciclo de vida, propagando-se constantemente (**Figura 7**), sendo que um indivíduo PI produz sempre descendentes PI (BOOTH; BROWNLIE, 2012).

Figura 7: Representação esquemática do ciclo reprodutivo de um animal PI



Fonte: <http://www.bio-genesys.com/diagnostic-solutions/545794d86d218/Disease-Information-Bovine-Viral-Diarrhoea>

A taxa de letalidade dos bezerros PI é maior que 50% no primeiro ano de vida, principalmente porque muitos deles nascem prematuros (BAKER, 1987), fracos, letárgicos ou apresentam algum tipo de malformação congênita. Alguns bezerros morrem após poucos dias ou até mesmo algumas horas após o nascimento. Aqueles que sobrevivem podem apresentar atraso no crescimento e baixa resistência a outras enfermidades, advinda de alterações funcionais de linfócitos e neutrófilos, que causam a imunossupressão (BOLIN, 1985).

Observa-se uma taxa de mortalidade de 50% nos 12 primeiros meses de vida e acredita-se que menos de 10% das novilhas PI atingem a fase reprodutiva (LIEBLER-TENORIO, 2005; GROOMS; BAKER; AMES, 2006).

Embora seja consenso de que os animais PI se constituem nos principais reservatórios e fontes de disseminação do BVDV nos rebanhos (HOUE, 1995), alguns aspectos da biologia da infecção persistente e de seu impacto na transmissão do vírus permanecem pouco conhecidos. Estudos para investigar a persistência e níveis do vírus no sangue ao longo do tempo, assim como os títulos virais excretados nas secreções por um longo período são raros na literatura (BROCK et al. 1991).

Em grande parte destes estudos, o número de animais PI presentes no rebanho, os títulos virais excretados por estes animais, o tempo real de contato e as condições e oportunidades de transmissão viral entre os animais não são controlados ou conhecidos.

Contudo, devido sua importância epidemiológica, os animais PI se constituem nos principais alvos de programas de controle e erradicação do BVDV dos rebanhos (BROCK et al., 1991, HOUE, 1995).

3.10. SINAIS CLINICOS

O BVDV é reconhecido como causador de diversas manifestações clínicas que vão desde infecções subclínicas a infecções aguda (fatais), afetando principalmente o sistema reprodutivo (abortos, má formação, mumificação, crescimento retardado), sistema respiratório, sistema digestivo, sistema circulatório (leucopenia, trombocitopenia e síndrome hemorrágica) e sistema tegumentar (DUBOVI, 1994).

Os bovinos são considerados os seus hospedeiros naturais, porém o vírus pode infectar ruminantes domésticos, silvestres e suínos (RIDPATH; FLORES, 2007).

Desde sua descoberta, uma grande variedade de manifestações clínicas foi associada com a infecção por este agente (RIDPATH; FLORES, 2007). Essas manifestações podem ser agrupadas em três formas principais:

- a) Infecção aguda leve (gastroentérica e respiratória);
- b) Infecção aguda severa (gastroentérica, respiratória e hemorrágica);
- c) Doença das Mucosas.

A infecção aguda leve é frequentemente definida pelas manifestações clínicas que ocorrem em bovinos imunocompetentes que não são PI (LIEBLER-TENORIO, 2005).

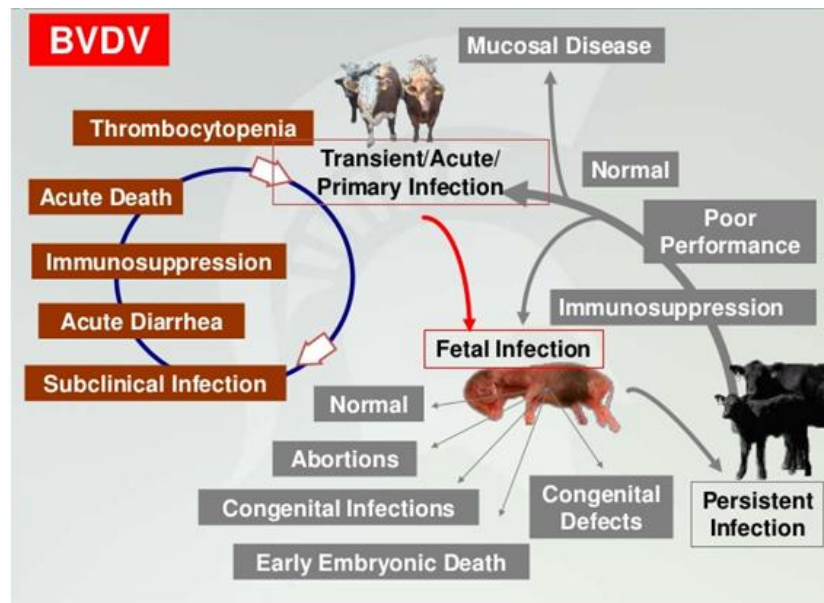
Os animais neste tipo de infecção apresentam os seguintes sinais clínicos, hipertermia, inapetência, depressão, febre, anorexia, diarreia ligeira, leucopenia transitória, descarga oculonasal, decréscimo na produção de leite, erosões e ulcerações orais, interdigitais e nos tetos (BAKER, 1995; CAMPBELL, 2004; EVERMANN; BARRINGTON, 2005), pneumonia e enterite em bezerros (POTGIETER, 1997).

De acordo com Kahn (2007) e OIE (2008), já as infecções agudas severas causadas pelo vírus, podem acarretar a síndrome hemorrágica. A mesma depara-se com alta morbidade e letalidade. Os animais acometidos apresentam divergentes sinais caracterizados como febre (oscilando entre 41-42°C), depressão, leucopenia, trombocitopenia, diarreia sanguinolenta, desidratação, hemorragia ocular, nas superfícies mucosas da boca e vulva epistaxe, equimoses nas mucosas, lesões no trato digestório, hemorragias subcutâneas e nos locais de injeção, gânglios linfáticos aumentados de tamanho e, por fim, a morte (GROOMS; BAKER, AMES, 2006) (**Figura 8**). Nesta forma a pneumonia é o quadro clínico mais observado (RADOSTITS et al., 2002).

Portanto, as consequências bem como a severidade da infecção aguda pelo BVDV dependem de uma série de fatores que incluem desde a cepa viral (e o biótipo), a condição imunológica e reprodutiva do animal até a ocorrência de infecções secundárias (RIDPATH; FLORES, 2007).

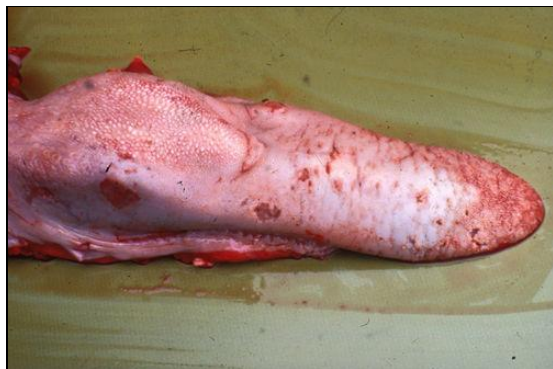
No início acreditava-se que o BVDV 2 era o mais patogênico e causador da síndrome hemorrágica, no entanto hoje sabe-se que ambos causam infecções agudas severas (HOUE, 2003). Segundo a FAO (2014), trata-se de uma doença infecciosa viral de bovinos, manifestando-se em erosões (**Figura 9a**) e secreção ocular (**Figura 9b**).

Figura 8: Representação de alguns sintomas observados na presença do vírus BVDV



Fonte: <https://image.slidesharecdn.com/160405niaabvdgrooms-160420182643/95/dr-dan-grooms-bovine-viral-diarrhoea-bvd-overview-the-disease-history-management-control-8-638.jpg?cb=1461357529>

Figura 9a: Ulceration on the tongue



Fonte: FAO, 2014

Figura 9b: Ocular discharge



Fonte: FAO, 2014

A extensão da doença em rebanhos acomete não só os bovinos de corte, mas também de leite. Além de bovinos jovens, o vírus pode afetar animais adultos (FLORES et al., 2005; OIE, 2008).

3.11. DOENÇA DAS MUCOSAS (DM)

A DM é a forma mais grave da infecção pelo BVDV. Trata-se de uma enfermidade gastroentérica fatal, desencadeada quando um animal PI (portador de um BVDV-NCP) sofre infecção concomitante com BVDV-CP antigenicamente semelhante. O BVDV-CP que determina o desenvolvimento da DM geralmente se origina do BVDV-NCP do próprio animal por mutações. Portanto, nos animais geralmente de seis meses a dois anos de idade, que desenvolvem a DM, os dois vírus (NCP e CP) estão presentes (RIDPATH, FLORES, 2007).

A DM afeta animais entre os 6 meses e os 2 anos de idade, possui baixa morbidade e mortalidade próxima dos 100%, ocorrendo 2-3 semanas após o desenvolvimento do vírus CP antigenicamente homólogo (ANDREWS et al., 2004; FLORES et al, 2005; GONDIM, 2006).

Os bovinos com DM tornam-se progressivamente desidratados e debilitados, geralmente morrendo de 3 a 10 dias. Alguns animais sobrevivem à fase aguda, mas desenvolvem a forma crônica da doença (EVERMANN; BARRINGTON, 2005; GONDIM; GROOMS; BAKER; AMES, 2006).

A ocorrência da DM na sua forma aguda é esporádica, infectando menos de 5% do rebanho. Em casos raros, durante as epizootias podem estar afetados até 25% dos animais da exploração, no entanto seria necessário um grande número de animais PI para que tal fato ocorresse. A taxa de mortalidade na DM aguda aproxima-se dos 100%. (RADOSTITS et al, 2002; GROOMS; BAKER; AMES, 2006).

Por outro lado, os animais com a doença crônica não se desenvolvem sadios, podendo apresentar constantemente fezes amolecidas (ou diarreia intermitente), redução no apetite, perda de peso, apatia progressiva, erosões interdigitais e lesões erosivas crônicas na mucosa oral e na pele (não cicatrizáveis). Estão presentes corrimentos nasais e oculares persistentes.

Os animais acometidos pela forma crônica da DM raramente sobrevivem além dos 18 meses, sendo a morte o resultado da grave debilidade e emaciação (ANDREWS et al., 2004; DEREGT, 2005; EVERMANN; BARRINGTON, 2005). Os bovinos que desenvolvem a DM devido à exposição ao vírus CP de origem externa produzem habitualmente anticorpos antivirais (KAHN, 2007).

3.12. TRANSMISSÃO

A porta de entrada do vírus no organismo é através da mucosa oral ou nasal, por meio da inalação ou ingestão de secreções e excreções de animais infectados. Os primeiros sítios de replicação viral são as tonsilas, os tecidos linfóides e o epitélio da orofaringe (TREMBLAY, 1996). A disseminação no organismo ocorre pelas células linfóides presentes na corrente circulatória (THURMOND, 2005), podendo também ocorrer pela saliva, secreções nasais, oculares, urina, fezes, sêmen, embrião, placenta, sangue e fômites (VOGEL et al., 2001).

A transmissão horizontal do vírus ocorre por contato direto ou indireto através de secreções contaminadas (BROCK et al., 1991; HOUE, 1995), por meio de alimentos contaminados, urina, fezes, secreções, fetos abortados, placenta, entre outros.

A ação maciça do homem também contribui para disseminação do vírus, através da utilização de fômites (luvas de palpação, agulhas, material cirúrgico contaminado, espéculos nasais, uso de vacinas vivas ou contaminadas, ou ate mesmo através dos tratadores) (HOUE, 1999; RADOSTITS et al., 2002; FLORES et al., 2005; THURMOND, 2005; LIEBLER-TENORIO, 2005; EVERMANN, 2006; GROOMS; BAKER; AMES, 2006; KAHN, 2007), na execução da técnica de Inseminação Artificial (IA), Transferência Embrionária (TE), (MOENNIG; PLAGEMANN, 1992), colheita de sêmen de touros PI em Centrais de Inseminação (FLORES et al., 2005; GROOMS; BAKER; AMES, 2006; THURMOND, 2005). Este tipo de transmissão depende da estabilidade do vírus fora do hospedeiro (GONDIM, 2006).

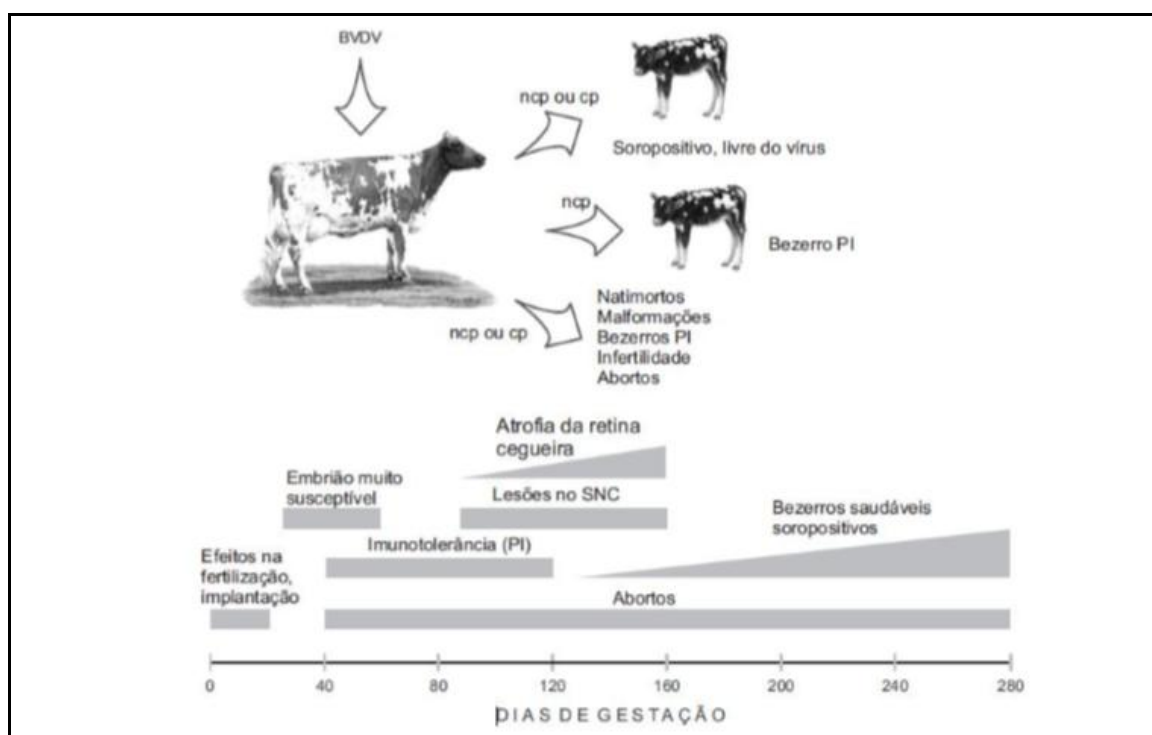
Em touros os efeitos da infecção estão relacionados aos defeitos morfológicos do espermatozoide e a baixa qualidade do sêmen (com diminuição da mobilidade e da concentração espermática) (DONATE; MAZZUCHELLI, 1995; GROSS, 2004). O vírus também se replica nas vesículas seminais e na próstata (TREMBLAY, 1996).

Além da transmissão horizontal, também ocorre a transmissão vertical, onde o vírus é transmitido de forma eficiente através da placenta de fêmeas gestantes, as quais transmitem o vírus para sua descendência (TREMBLAY, 1996), (quando a mesma não possui anticorpos contra o BVDV), ocorrendo dessa maneira a infecção transplacentária do feto (GROOMS; BAKER; AMES, 2006), resultando em infecção embrionária ou fetal com consequências diversas (BAKER, 1995).

O feto é vulnerável à infecção quando fêmeas não imunes entram em contato com o vírus. Em termos gerais, a infecção transplacentária é particularmente prejudicial durante os primeiros 180 dias de gestação, podendo resultar em morte, reabsorção embrionária, mumificação fetal, aborto, deformidades congênitas, imunotolerância (LARSON, 1996; FRAY; PATON; ALENIUS, 2000; GROOS, 2004), nascimento de bezerros fracos, débeis, prematuros e com alterações no crescimento (KRAMPS et al., 1999).

Os abortos podem ocorrer em qualquer fase da gestação, mas a ocorrência maior é no primeiro trimestre (LARSON, 1996; RIDPATH; FLORES, 2007).

Figura 10: Consequências da infecção de fêmeas prenhes pelo BVDV, de acordo com o biótipo do vírus e o tempo de gestação



Fonte: RIDPATH; FLORES, 2007

Quando a infecção fetal ocorre no estágio final de gestação, também existe o comprometimento do sistema imune dos bezerros (FRAY; PATON; ALENIUS, 2000).

O nascimento ou introdução de animais PI dentro de um rebanho pode resultar na rápida disseminação do vírus entre a maioria dos bovinos susceptíveis em menos de seis meses. Mas se a fonte do vírus for apenas bovinos com infecção aguda, a disseminação do BVDV no rebanho é mais lenta (GROOMS; BAKER; AMES, 2006).

Portanto, pode-se dizer que todos os bovinos PI são produzidos pela transmissão vertical. Porém, na maioria dos casos, esta é precedida da transmissão horizontal da mãe e, seguidamente, ocorre a infecção transplacentária do feto, em vacas PI ou com infecção aguda (GONDIM, 2006; GROOMS; BAKER; AMES, 2006).

Já a eliminação do vírus pelos animais TI duram poucos dias ou eventualmente semanas (THURMOND, 2005), porém esses animais podem promover a permanência do vírus no rebanho na ausência de animais PI (MOERMAN et al., 1993), interferindo assim nas estratégias de controle da enfermidade (MOEN; SOL; SAMPIMON, 2005). Portanto, os animais TI são considerados importantes fontes de infecção quando existe um constante trânsito de animais na propriedade (TREMBLAY, 1996).

A transmissão entre bovinos e ovinos já foi demonstrada, apesar da importância desta transmissão ainda não ter sido determinada (BROCK; GROOMS; GIVENS, 2005; LARSON et al., 2005; THURMOND, 2005; GROOMS; BAKER; AMES, 2006).

A forma aérea do vírus também pode ser observada (MARS; BRUSCHKE; OIRSCHOT, 1999), podendo ser influenciada pela estirpe infectante do vírus, pois algumas induzem alterações respiratórias e conseqüentemente desencadeiam tosse nos animais, promovendo assim maior disseminação viral (HOUE, 1995). Os aerossóis que infectam a mucosa nasal encontram-se suspensos no ar e podem manter infecciosidade em distâncias curtas (1,5 a 10 metros) (EVERMANN; BARRINGTON, 2005; GROOMS; BAKER; AMES, 2006).

A introdução de novos animais também é uma importante fonte para introdução do vírus no rebanho (GREISER-WILKE; GRUMMER; MOENING, 2003). A exposição a outros animais através de cerca e pastagens onde convivem, ou até mesmo através do contato em feiras e exposições podem ser importantes vias de transmissão de rebanho a rebanho (HOUE, 1999; GREISER-WILKE; GRUMMER; MOENING, 2003; THURMOND, 2005).

Contudo, na maioria das vezes a disseminação do vírus entre as propriedades em condições naturais ocorre pela aquisição de novos animais PI, ou que estejam prenhes de fetos PI (HOUE, 1999; THURMOND, 2005).

3.13. DIAGNÓSTICO

O BVDV é considerado uma das enfermidades de maior dificuldade tanto para diagnóstico, como também para o controle (PILLARS; GROOMS, 2002). Pode ser isolado através de secreções nasais, sangue, fezes, linfonodos e intestinos (HIRSH; ZEE, 2003), enquanto o diagnóstico pode ser firmado com base no exame clínico e nos achados de necropsia, pois o diagnóstico definitivo requer de duas a três semanas (LIBERTMANN, 1988).

Com o advento dos conhecimentos na biologia, patogenia e epidemiologia do BVDV, foi possível desenvolver técnicas de diagnóstico capazes de detectá-lo mais facilmente (CANÁRIO et al., 2009). Sendo assim, a técnica sendo mais ágil, acelera também os processos que envolvem a exportação de produtos de origem animal, como sêmen e embriões (OLIVEIRA, 2013).

Devido ao curto período de virêmia que ocorre nas infecções agudas pelo BVDV, a detecção de anticorpos neutralizantes é de grande importância para o diagnóstico da enfermidade. Esses anticorpos são detectados no soro sanguíneo após três semanas do início da infecção (CHASE; CHASE; FAWCETT, 2003) e permanecem detectáveis pelo menos por três anos (FREDRIKSEN et al., 1999).

Em virtude da ampla variedade de sinais clínicos, que estão presentes também em outras doenças virais (**quadro 3**) e bacterianas (**quadro 4**), o diagnóstico definitivo do vírus acaba tornando-se árduo (SANDVIK, 1999).

Quadro 3 – Relação de doenças virais (com sinais clínicos semelhantes aos da BVD) para diagnóstico diferencial

DOENÇA	EPIDEMIOLOGIA	ACHADOS CLÍNICOS	PATOLOGIA CLÍNICA
Catarrho maligno de bovinos	Esporádico. Animais adultos e jovens	Estomatite erosiva acentuada difusa; Febre alta; Conjuntivite acentuada; Opacidade Linfonodos enfartados	Leucopenia e neutropenia; Leucocitose tardiamente
Febre Aftosa	Alta morbidade; baixa mortalidade	Febre alta; Sialorreia; Vesículas na boca, nas tetas; Morte na forma miocárdica	Testes de transmissão no animal; Sorologia rápida
Peste bovina	Bovinos jovens e adultos; Surtos; Rápida disseminação; 90% mortalidade	Estomatite erosiva acentuada; Saliva corada de sangue; Diarreia intensa e disenteria	Leucopenia acentuada; Linfopenia
Estomatite vesicular	Morbidade e mortalidade variáveis	Febre moderada; Anorexia; Vesículas na cavidade bucal	Testes de transmissão no animal; Sorologia rápida
Língua Azul	Doença clínica não comum nos bovinos	Febre; Rigidez; Laminite; Coronite; Lesões erosivas na cavidade oral; Edema dos lábios; Salivação; Corrimento nasal e ocular	Testes de transmissão no animal; Sorologia rápida
Estomatite papular bovina	Bovinos jovens (2 semanas a 2 anos); 100% morbidade;	Pápulas redondas vermelho-escuras elevadas no focinho e cavidade bucal	-
Disenteria invernal dos bovinos	Rebanho leiteiro confinado; Inverno; Surto explosivo; Morbidade 100%	Diarreia aquosa profunda aguda e disenteria; Febre moderada; Inapetência e queda na produção de leite	-

Fonte: Adaptado de RADOSTITS et al. (2002)

Quadro 4 – Relação de doenças bacterianas (com sinais clínicos semelhantes aos da BVD) para diagnóstico diferencial

DOENÇA	EPIDEMIOLOGIA	ACHADOS CLÍNICOS	PATOLOGIA CLÍNICA
Estomatite necrótica	Bezerros jovens em condições sujas e pastagens secas	Grandes úlceras necróticas profundas de odor desagradável na língua	Esofagite necrótica
Salmonelose	Todas as idades; Surtos; Mortalidade alta	Forma aguda: febre alta, diarreia, disenteria, dor abdominal; Forma subaguda e crônica: também ocorre diarreia	Leucopenia; Neutropenia; Enterite fibrinoemorrágica
Doença de Johne	Baixa morbidade; Longo curso	Diarreia crônica; Perda de peso; Temperatura e apetite normais	Teste sorológico; Cultura das fezes; Enterite

Fonte: Adaptado de RADOSTITS et al. (2002)

Portanto, o diagnóstico do BVDV baseia-se na verificação de resposta imunológica do hospedeiro à infecção ou na detecção do vírus ou dos componentes virais. Por outro lado, o BVDV deve ser diferenciado de etiologias que causam diarreia, erosões (e/ou ulcerações) no trato gastrointestinal, falhas reprodutivas, efeitos teratogênicos, patologias cutâneas, subdesenvolvimento e patologias respiratórias. Estas etiologias incluem vários agentes infecciosos, parasitas e toxinas (GONDIM, 2006).

Para estabelecer de fato o diagnóstico diferencial depende-se da manifestação clínica da infecção. Esta doença pode ser diferenciada da febre catarral maligna, estomatite papulosa, febre aftosa, peste bovina, infecções por adenovírus, disenteria bovina, e, em neonatos, a Rinotraqueite Infecciosa Bovina (IBR), (LIBERTMANN, 1988).

A Estomatite Vesicular (EV) também deverá ser considerada, pois apresenta erosões orais (PERDRIZET, 1993). A peste bovina e a febre catarral maligna apresentam erosões bucais e diarreia.

Portanto, os métodos utilizados para controle da doença são classificados em indiretos e diretos (RIDPATH, FLORES, 2007).

O diagnóstico indireto realizado para o BVDV geralmente é feito pela técnica de VN ou ELISA. Mas animais infectados de forma aguda, soroconvertem em 14-20 dias após a detecção inicial, assim são necessárias amostras pareadas para confirmar infecção recente (SCHUCH, 2006).

O método indireto baseia-se na detecção de anticorpos contra o BVDV no soro ou no leite dos animais, informando a titulação viral. Já o método direto baseia-se na detecção do BVDV ou de seus componentes (proteínas e ácidos nucléicos) constituindo a forma mais objetiva no diagnóstico da infecção (RIDPATH, FLORES, 2007).

A chave para o sucesso desse teste é uma amostra clínica que tenha quantidade suficiente de antígeno presente a fim de gerar um sinal positivo. O teste deve identificar também uma região alvo do vírus que seja conservada o suficiente para ser encontrada na maioria das estirpes virais circulantes, além disso, o antígeno alvo deve ter região altamente conservada para que seja encontrada em todas as estirpes virais (DUBOVI, 2013). Já sua desvantagem diz respeito a captura do antígeno por um anticorpo monoclonal específico. Anticorpos policlonais contra o vírus que estão na amostra teste podem bloquear a detecção do antígeno. A possibilidade de falsos negativos deve ser sempre motivo de preocupação (DUBOVI, 2013).

A VN por sua vez, tem como desvantagem ser trabalhosa, requerendo a manutenção de linhagens celulares e maior tempo para a obtenção dos resultados. Um problema que existe em relação a essa técnica é que, sem padrões estabelecidos, existe uma grande variação nos resultados de diferentes laboratórios, pois tudo baseia-se na linhagem celular e estirpe viral, usadas para a detecção dos anticorpos contra o vírus (DUBOVI, 2013).

Além dos testes de VN e ELISA, outros testes sorológicos também são empregados no diagnóstico do BVDV, tais como Imunodifusão em gel de agar (IDGA), fixação de complemento, imunofluorescência indireta e “*Western blotting*”. Os testes de IDGA e de fixação de complemento detectam anticorpos contra o antígeno da proteína NS2-3, porém a sensibilidade desses testes é baixa (EDWARDS et al., 1991; SANDVIK, 1999; SALIKI; DUBOVI, 2004).

Esses testes devem ser sensíveis o suficiente para evitar resultados falso-negativos (principalmente quando os títulos de anticorpos são baixos), sobretudo quando são comprometidos pela interferência dos anticorpos maternos, sendo que os animais PI não são corretamente identificados até que a imunidade colostrar tenha diminuído (LINDBERG et al., 2006).

Métodos de diagnóstico molecular, incluindo a PCR e mais recentemente a RT-PCR estão sendo universalmente adotados para o diagnóstico etiológico de diversas viroses animais, pois apresentam como vantagem a rapidez na obtenção dos resultados, detectando tanto partículas infecciosas quanto não infecciosas e, quando devidamente padronizadas, são muito específicos e sensíveis (TAKIUCHI et al., 2005).

A RT-PCR é utilizada como método rotineiro para o diagnóstico do BVDV, por ser um método com alta sensibilidade e os resultados são obtidos mais rapidamente do que no isolamento viral (SALIKI; DUBOVI, 2004). Qualquer tipo de amostra, como leite, soro sanguíneo, urina, sangue total, suabes, pele e tecidos, pode ser utilizada na RT-PCR. Porém, é necessária a utilização de metodologias específicas para cada tipo de amostra (GOYAL; RIDPATH, 2005).

Assim sendo, é de grande importância a identificação e tipificação das estirpes virais através dessas provas moleculares mais sensíveis, precisas e exatas, tanto para a vigilância da doença quanto para selecionar e estudar essas novas estirpes com o objetivo de desenvolvimento de vacinas mais efetivas e seguras (OLIVEIRA, 2013).

3.14. PREVENÇÃO E CONTROLE

Não existe tratamento específico para animais que apresentem sinais clínicos da infecção com o BVDV (RADOSTITS et al., 2002), portanto nenhum tratamento é de fato eficaz no combate ao vírus, mas alguns casos são auto-limitantes (CANÁRIO et al., 2009).

Os objetivos do tratamento em animais suspeitos são apenas de suporte, visando amenizar alguns sinais clínicos decorrentes da infecção, tais como, desidratação, febre, apatia, etc, e prevenção de divergentes infecções secundárias (GROOMS; BAKER; AMES, 2006).

Em qualquer medida profilática empregada no combate ao vírus, devem ser ponderadas as diferenças existentes entre os rebanhos (leiteiros e de corte) (BROCK, 2004).

Nos rebanhos leiteiros, os animais jovens sofrem a separação de sua progenitora logo ao nascimento, limitando por sua vez, qualquer contato junto ao grupo de reprodutoras durante a gestação (LARSON et al., 2005; SMITH et al., 2009). Já em rebanhos de corte, o principal objetivo no controle do BVDV está relacionado a prevenção de infecções fetais, de modo a eliminar as perdas reprodutivas (e, assim também prevenir o nascimento de animais PI).

Ao evitar a exposição de fêmeas gestantes ao vírus nos primeiros 5 meses de gestação, o ciclo da persistência é desfragmentado (BROCK; GROOMS; GIVENS, 2005). Assim, o isolamento dessas fêmeas prenhes de outros animais portadores de infecção aguda, são fatores vitais para minimizar a exposição ao vírus.

A entrada, troca ou retirada de constante de animais (especialmente fêmeas prenhes), são a forma mais comum de introdução do vírus na propriedade. A compra de novilhas, vacas ou touros apresentam menor risco de introdução do vírus, quando estes animais são submetidos a testes para assegurar que realmente não estejam infectados, e quando permanecem em período de quarentena (BROCK et al, 2006; KAHN, 2007; OIE, 2008). O período de quarentena deve ser à base de todos os procedimentos de biossegurança, prevenindo a entrada de infecções transitórias (BROCK; GROOMS; GIVENS, 2005).

Outros métodos de transmissão do vírus tais como o emprego de biotecnologias (IA, IATF, TE, etc) devem ser considerados como fontes potenciais de introdução do vírus no plantel (SANDVIK, 2004; SMITH et al, 2009).

Uma vacina eficaz contra o BVDV deve proteger não só contra a viremia (evitando a disseminação do vírus no hospedeiro), como também impedir a infecção das células do sistema reprodutivo e linfático, conseqüentemente evitando a ocorrência da infecção fetal e da imunossupressão (KELLING, 2004). Já no combate a infecções secundárias, são ministrados antibióticos de largo espectro, fluidoterapia, eletrólitos suplementares e vitaminas (KAHN, 2007).

Portanto, a prevenção da doença ainda é de fato a forma mais eficaz de erradicá-la, ou até mesmo impedir a reintrodução no rebanho. O cumprimento das normas rigorosas dos programas de controle, também são estratégias positivas. Inúmeros esforços estão sendo empregados em relação à proteção fetal através da vacinação (CANÁRIO et al., 2009).

3.15. EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEÍNAS

Após a euforia provocada pelo sequenciamento do genoma de vários organismos, a comunidade científica percebeu que, para se compreender a função gênica em toda sua plenitude, era necessário o estudo em larga escala das proteínas expressas. Constatou-se que, embora importante, a análise das sequências de nucleotídeos nem sempre reflete uma relação direta com os níveis de proteínas expressas e, conseqüentemente, de atividade biológica (GYGI et al., 1999).

O genoma foi o alvo primário das explorações pelas bases moleculares de doenças (AZAD et al., 2006), já que os genes são o material genético essencial para o controle das características biológicas da célula, porém, são as proteínas que realizam funções celulares vitais, sendo que todos os comportamentos celulares em vida podem em geral ser interpretados no nível protéico (DENG et al., 2006).

Não obstante, o genoma de um organismo apresenta um caráter permanente e relativamente estável ao longo da vida, pois é totalmente transferido durante a replicação celular. Ao contrário disso, o proteoma é extremamente dinâmico e variável, sendo entendido como o conjunto de proteínas produzidas por uma célula e dependendo de fatores tais como: o estágio de desenvolvimento (e diferenciação) e condições específicas e temporais do ambiente (BISCH, 2004).

Por sua vez, tornou-se evidente que a disponibilidade de genomas totalmente sequenciados apenas estimulou a motivação científica por informações globais adicionais. A genômica foi, então, dividida em estrutural (caracterizando a natureza física dos genomas), e funcional caracterizando o transcriptoma (toda a gama de transcritos produzidos por um determinado organismo) e o proteoma (toda a gama de proteínas codificadas) (GRIFFITHS et al., 2002).

O termo proteína origina-se do grego “proteios” e significa “a mais importante”. De fato, as proteínas compõem um conjunto de moléculas indispensáveis para todos os seres vivos. Devido a essa diversidade de funções, as moléculas de proteínas são co-polímeros de condensação de até 20 aminoácidos de ocorrência natural, distintos apenas pelas suas cadeias laterais. Existem bilhões de combinações possíveis e milhares de diferentes tipos de proteínas, sendo cada um com uma função específica a desempenhar no organismo (ATKINS; JONES, CARACELLI, 2001).

São essenciais para todos os seres vivos, possuindo imensa gama de variações de atividades que determinam o padrão de transformação química na célula.

Dentre suas funções principais estão: a catálise enzimática, transporte, o armazenamento de moléculas e íons, sustentação mecânica, proteção imunitária, geração e transmissão dos impulsos nervosos e controle do crescimento da célula (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2004).

Algumas estimativas sugerem que mais de um milhão de diferentes tipos de proteínas estão presentes nas células, nos tecidos e nos fluídos corporais em condições e/ou momentos distintos (BARBOSA et al., 2012).

Segundo De Sousa et al., (2003), as proteínas são as biomoléculas mais abundantes, ocorrendo em grande diversidade, podendo agir como enzimas, anticorpos, hormônios, componentes estruturais e receptores celulares. Catalisam uma extraordinária quantidade de reações químicas, fornecendo rigidez estrutural à célula. Controlam o fluxo do material através da membrana, regulam as concentrações dos metabolitos, atuam como sensores, produzem movimentos e controlam a função genética (NELSON; COX, 2002). Nesse sentido, a identificação das diferenças na expressão protéica é uma área de estudo relevante na pesquisa proteômica.

3.16. PROTEOMA

O termo proteoma foi proposto por Wilkins e, colaboradores em 1997, como sendo todo o conjunto de proteínas expressas por um genoma ou, no caso de organismos multicelulares, ao complemento protéico expresso por um tecido ou células diferenciadas (WILKINS et al., 1997).

O proteoma indica as proteínas expressas em um genoma ou tecido, podendo ser alterado com o estado de desenvolvimento do tecido ou mesmo sob as condições nas quais o indivíduo se encontra (GALDOS, 2009). Além de sua grande complexidade, o proteoma é dinâmico e seu perfil se altera de acordo com o status fisiológico e as fases da diferenciação celular. Uma descrição completa do proteoma de um organismo fornece, não apenas um catálogo do conjunto de proteínas, mas uma imagem dinâmica com dados da expressão de proteínas sob condições definidas e sua distribuição na célula (CASH, 2002).

Ao contrário do que ocorre com o genoma relativamente estático e idêntico nas células somáticas de um organismo, a expressão protéica ou proteoma, encontra-se em estado dinâmico, respondendo à estímulos externos e internos. Portanto, o proteoma permite maior aproximação dos processos metabólicos intracelulares (LARSEN, 1997).

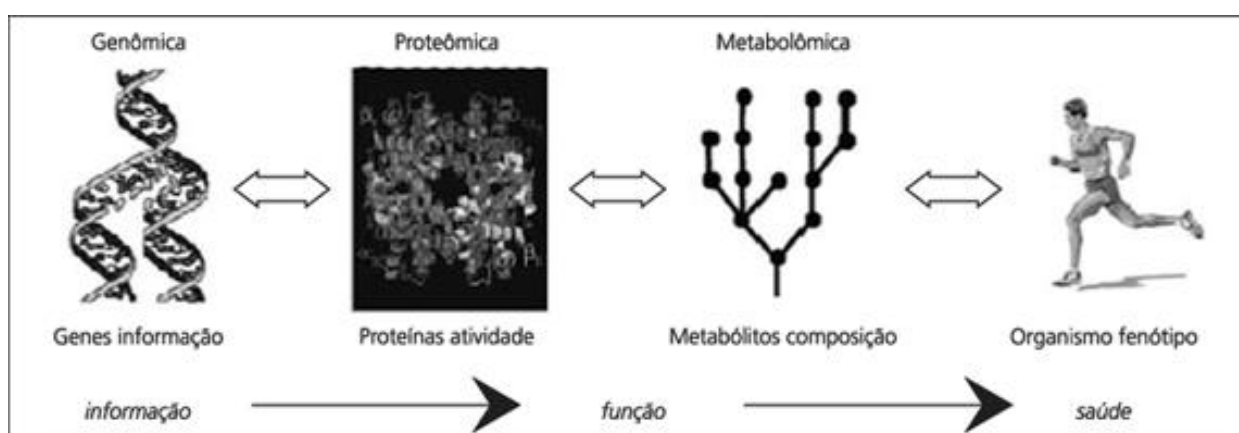
De fato, o proteoma não é apenas a soma dos produtos traduzidos a partir das sequências genômicas, mas inclui também as proteínas resultantes de processos pós-transcricionais e pós-traducionais, bem como complexos formados por essas biomoléculas (BARBOSA et al., 2012).

O objetivo inicial dos estudos proteômicos baseia-se na identificação em larga escala de todas as proteínas presentes em uma célula ou tecido. Atualmente, consistem na análise simultânea de misturas complexas de proteínas como as provenientes de lises celulares e extratos de tecidos com o intuito de detectar diferenças quantitativas e qualitativas na expressão protéica (WESTERMEIER; NAVEN, 2002).

3.17. PROTEÔMICA

Nos últimos anos, grandes esforços têm sido realizados no desenvolvimento de novas metodologias para o estudo e entendimento da estrutura e função de proteínas em diferentes amostras biológicas (KATZ-JAFFE et al., 2009). Nesse sentido, a proteômica, que visa caracterizar o conjunto de proteínas expressas em um dado momento, surge como mais uma ramificação entre as “ômicas” (**Figura 11**) para complementar os estudos sobre a biologia molecular das células (WILKINS et al.,1996).

Figura 11: Ferramentas “ômicas” (Genômica, Proteômica e Metabolômica) integradas na promoção da saúde

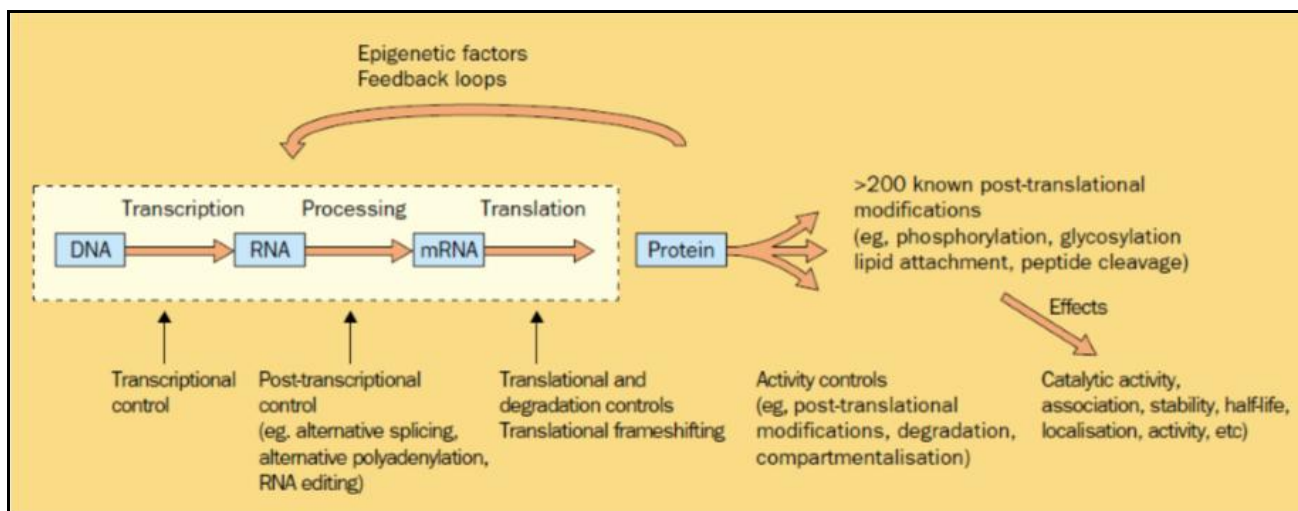


Fonte: KUSSMAN et al, 2006

Os complexos de proteínas são o primeiro nível de organização do proteoma celular (KUHNER et al., 2009), deste modo, a proteômica fornece uma ligação entre proteínas e seus genes codificadores e, portanto, uma ligação entre a fisiologia celular e a genética.

Surgiu no final de 1970, quando pesquisadores começaram a criar as bases de dados de proteínas usando naquela época a moderna técnica Eletroforese Bidimensional (2DE) (O’FARREL, 1975). Seu início fora marcado pela caracterização de perfis protéicos (**Figura 12**), passando, posteriormente, a focar outros aspectos como a quantificação de proteínas, as interações entre proteínas e as modificações Pós-Traducionais (MPT) (SALVATO; CARVALHO, 2010).

Figura 12: Maneiras em que a expressão do gene e da proteína pode ser regulada ou modificada na transcrição ou na pós-tradução



Fonte: BANKS et al., 2000

A proteômica estuda de forma descritiva e quantitativa desde o conjunto de proteínas de uma organela subcelular até aquelas de um ecossistema, suas variações na população, mudanças em resposta a um ambiente ou decorrentes do desenvolvimento (normal ou alterado), e modificações e interações com outras proteínas (BARBOSA et al., 2012), fornecendo informação em nível molecular da variabilidade genética que é efetivamente expressa do genoma (PENNINGTON; DUNN, 2001).

Esta relacionada com o conjunto de tecnologias, que têm por objetivos separar e identificar proteínas em amostras biológicas complexas (ISFOR et al., 2002), além de ser associada à exibição de um grande número de proteínas de uma linhagem celular ou organismo em géis bidimensionais (ANDERSON; ANDERSON, 1996; CELIS et al., 1996; WILKINS et al., 1996; WILKINS; WILLIAMS, 1997; GALDOS, 2009). Tem potencial para além de complementar, ampliar as informações geradas pela genômica no conhecimento da fisiologia de tecidos normais e de várias doenças (BERTUCCI; BIRNBAUM; GONÇALVES, 2006).

A análise proteômica tem sido utilizada em diversas áreas e com variadas finalidades. O potencial demonstrado por esta metodologia, para complementar as informações obtidas com o sequenciamento de genomas e para fornecer um novo panorama sobre as interações intracelulares, abriu muitas portas tanto para a bioquímica e a biologia celular como para a genética, tendo se tornado uma ferramenta importante na área da saúde humana. É hoje um dos meios mais eficientes para o estudo funcional dos genes e genomas de organismos complexos (ROCHA, 2005).

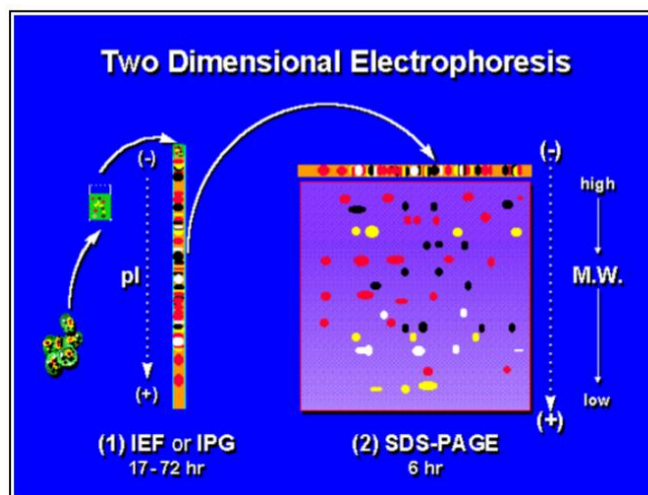
O campo de atuação desta ciência estende-se à descoberta de novas drogas, terapias, diagnósticos, microbiologia, bioquímica. A pesquisa proteômica torna possível a identificação e caracterização de marcadores biológicos, ou seja, moléculas endógenas ou exógenas específicas de um determinado estado patológico (GALDOS, 2009).

As abordagens proteômicas oferecem ainda um grande potencial para decifrar problemas biológicos complexos tais como a natureza de complexos moleculares particulares ou dos caminhos na patogênese da doença (NEUBAUER et al., 1998), e de complexos nucleares de leveduras (ROUT et al., 2000). Sendo assim, a análise proteômica permite saber se um gene está sendo expresso, a concentração relativa desse produto e, por fim, as modificações que podem ocorrer nessas proteínas após a sua tradução (GALDOS, 2009).

Além disso, a proteômica é uma poderosa ferramenta no melhoramento genético, pois, diferentemente do que ocorre quando são utilizados marcadores fenotípicos ou baseados em DNA, a proteômica fornece informação em nível molecular da variabilidade genética que é efetivamente expressa do genoma (PENNINGTON; DUNN, 2001). Tais fatos impulsionaram o desenvolvimento de novas tecnologias para o estudo deste conjunto de proteínas expressas. Estas ferramentas passaram então, a ser denominadas instrumentos da proteômica (AEBERSOLD; HOOD; WATTS, 2000).

Em linhas gerais, o estudo da proteômica pode ser realizado por meio de técnicas como a Eletroforese Bidimensional em Gel de Poliacrilamida (2D-PAGE), (**Figura13**), seguida da Espectrometria de Massas (MS), ou ainda, mais recentemente, a associação de métodos de ionização e cromatografia, entre outros, que aumentam ainda mais a sensibilidade de detecção (KATZ-JAFFE et al., 2009).

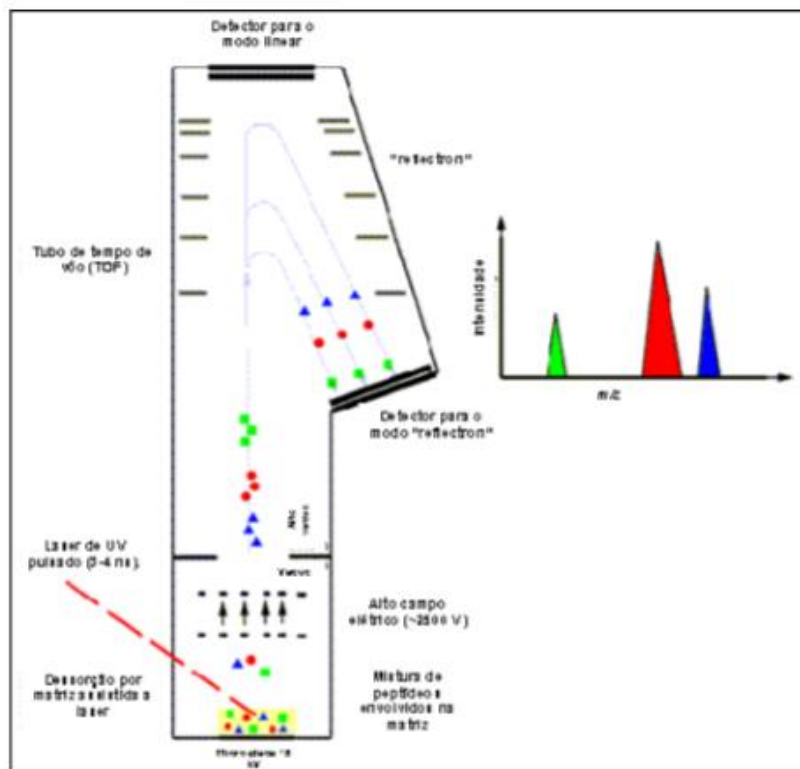
Figura 13: 2D-PAGE utilizado na análise de proteomas



Fonte: GALDOS, 2009

No contexto da proteômica comparativa, onde o objetivo é identificar diferenças quantitativas e qualitativas entre amostras de proteínas, a técnica de 2D-PAGE é o método de escolha usual, gerando dados em um formato que possibilita uma boa avaliação visual (para amostras pouco complexas), fornecendo comparações quantitativas (RABILLOUD, 2002). Contudo, entre todas as técnicas de proteoma de uso atual, a mais utilizada é a 2D-PAGE, acoplada a MS do tipo MALDI-TOF (**Figura 14**).

Figura 14: Espectrômetro de massas MALDI-TOF



Fonte: KARAS; HILLENKAMP, 1988

3.18. INSTRUMENTOS DA PROTEÔMICA

As técnicas proteômicas estão inseridas em diversas áreas da biologia, bioquímica, toxicologia. São comumente aplicadas em estudos de proteoma de organismos na análise de sua patogenicidade e adaptação ao hospedeiro. Além disso, são aplicadas na análise de diversas doenças como as cardiovasculares, neurológicas, diabetes e obesidade, parasitárias e infectocontagiosas, rejeição em transplantes e na oncologia (TAVARES, 2010).

Muitas das técnicas empregadas em proteômica têm como foco a identificação de biomarcadores, mas são limitadas nas aplicações médicas diretas. Outras têm potencial para automatização e utilização na rotina clínica com propósitos diagnósticos e permitem a análise de muitos tipos de amostras e de alterações no padrão de expressão proteica associadas a uma doença. De maneira geral, as metodologias empregadas em proteômica podem ser classificadas nos tipos *bottom-up* ou *top-down*.

O primeiro, também denominado *shotgun*, inclui separação por cromatografia líquida dos peptídeos obtidos após digestão de soluções proteicas complexas, seguida de análise por MS. Já o *top-down*, ao contrário, é um processo no qual as proteínas intactas (e não os peptídeos) são submetidas à análise por MS (BARBOSA et al., 2012).

As abordagens *bottom-up* possuem muitas vantagens, tais como sensibilidade e reprodutibilidade, mesmo para proteomas complexos como os de soro e lisados celulares. Entretanto, as respostas obtidas são fragmentos de um todo e, embora seja possível a identificação de uma proteína com base em alguns peptídeos, as MPT não são reconhecidas. Além disso, um peptídeo pode ser perdido durante a cromatografia ou não gerar espectros de massas adequados, motivo pelo qual a proteômica *top-down* tem recebido recentemente grande atenção da comunidade científica (BARBOSA et al., 2012).

Portanto, as limitações dessa técnica podem estar associadas à cobertura incompleta da sequência das proteínas, e nas degradações como resultado da digestão proteolítica (SALVATO; CARVALHO, 2010).

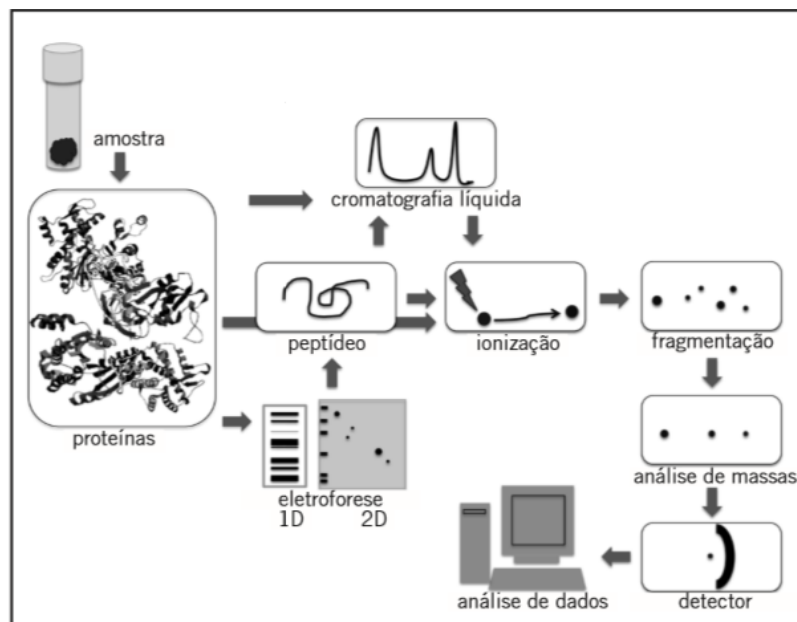
Já a abordagem *top-down*, ao contrário, é um processo no qual as proteínas intactas (e não os peptídeos) são submetidas à análise por MS. A análise *top-down* permite deduzir a estrutura primária da proteína. No entanto, essa estratégia é limitada pela energia de colisão necessária na fragmentação da proteína que é insuficiente para proteínas maiores que 50kDa, ficando restrita sua aplicação à análise de proteínas purificadas (NESATY; SUTER, 2008).

Para separação de proteínas por Eletroforese Unidimensional (1-DE) e 2-DE, as moléculas devem ser inicialmente isoladas de materiais biológicos, tais como tecidos e fluidos corporais. A extração adequada de proteínas é fundamental para obtenção de bons resultados (BARBOSA et al., 2012).

Na 2DE a massa e a carga das proteínas são utilizadas em duas etapas, sendo elas: focalização isoeletrica (IEF) e eletroforese em gel de poliacrilamida, (**Figura 15**), a fim de promover a separação de misturas complexas com melhor resolução. O resultado da 2DE é um perfil de distribuição de spots formados por proteínas únicas ou misturas simples de proteínas (PENNINGTON & DUNN, 2001).

Os spots resolvidos nos géis 2D podem ser considerados marcadores genéticos ou fisiológicos, sendo úteis no acesso à variabilidade genética, bem como no estabelecimento de distâncias genéticas e relações filogenéticas entre linhagens, espécies e gêneros (THIELLEMENT et al., 2002).

Figura 15: Diferentes metodologias podem ser combinadas em estudos proteomicos



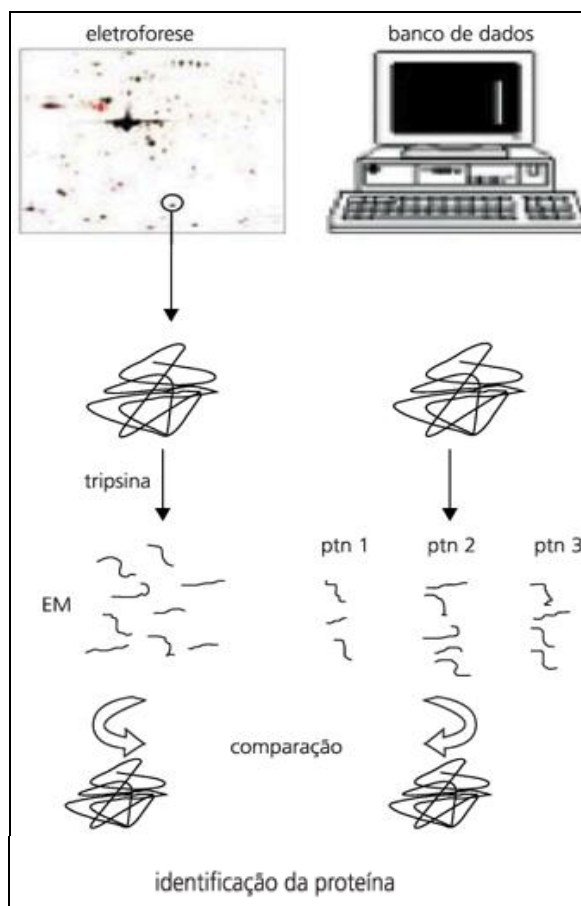
Fonte: BARBOSA et al., 2012

Embora capaz de gerar muitas informações, as técnicas de Eletroforese 1-D e 2-D possuem limitações. Uma das mais importantes é a presença de algumas proteínas em concentrações elevadas, especialmente em certos fluidos corporais, o que dificulta a migração eletroforética das menos abundantes (BARBOSA et al., 2012).

Os softwares de análise de géis determinam os spots, identificam aqueles diferencialmente expressos e seus volumes, inferindo uma quantificação relativa da expressão daquela proteína em comparação ao mesmo spot de outro gel (LÓPEZ et al., 2002).

Em 1990 a MS emergiu como um poderoso método analítico que removeu a maioria das limitações da análise de proteínas (**Figura 16**), (DI CIERO; BELLATO, 2003). Este desenvolvimento, associado com a disponibilidade e o completo sequenciamento do código genético humano em bases de dados públicas, marcou o começo de uma nova era (GALDOS, 2009).

Figura 16: Análise de proteínas por MS em um gel bidimensional.



Fonte: CARBONARO, 2004

Por meio da bioinformática, as sequências obtidas através das análises de MS, são comparadas e armazenadas em um banco de dados (CARBONARO, 2004).

A identificação de proteínas por meio da MS depende da digestão proteolítica que produz uma coleção de peptídeos que são ionizados por Eletronebulização ou por Dissorção a laser auxiliada por matriz (PENNINGTON; DUNN, 2001). Após a ionização, analisadores de massas detectam as relações m/z e os espectros resultantes e relacionam a abundância dos fragmentos versus a relação m/z , os quais são então confrontados nos bancos de dados para a identificação das proteínas.

3.19. APLICAÇÕES NO ESTUDO DE DOENÇAS

A proteômica na pesquisa clínica além de fornecer um conjunto potente de ferramentas para o estudo em larga escala da função genética diretamente ao nível protéico, tem como objetivo a comparação, a nível molecular, o nível protéico celular em situações normais e patológicas (BARBOSA et al., 2012).

A perspectiva oferecida pela técnica tem sido utilizada na pesquisa de diferentes áreas da medicina, incluído a biomedicina. Estas pesquisas poderiam classificar-se de distintas formas: em função do tipo de amostra empregada, do tipo de doenças que se abordam, da técnica (ou das técnicas utilizadas), do uso ou da aplicação (GALDOS, 2009).

Embora a literatura sobre esse assunto seja extensa e muitos dados relevantes já foram obtidos, incluindo a caracterização, embora parcial, das proteínas de diferentes tecidos e condições e de sub-proteomas como o de fosfoproteínas e o de glicoproteínas, esse quadro aspira a mudança, uma vez que as metodologias bem como as tecnologias nessa área têm progredido muito nos últimos anos e alcançado níveis elevados de resolução e potencial de aplicação (BARBOSA et al., 2012).

Na pesquisa com linhagens celulares, a proteômica tem caracterizado os perfis de expressão de proteínas em diferentes tipos destas linhagens como base para futuros experimentos comparativos (ISSAQ et al., 2003; CHAURAND et al., 2004). As linhagens celulares são variantes derivadas das células cancerosas ou de células normais fixadas pela inibição dos mecanismos celulares que causam a interrupção do crescimento.

Estudos têm demonstrado que o número de proteínas identificadas em cada proteoma varia de forma importante, o que provavelmente seja o reflexo da existência de diferenças no nível de expressão das distintas proteínas em cada linhagem celular (MOORE; MINOWADA, 1992).

Além das pesquisas em linhagens celulares humanas, a proteômica é aplicada atualmente na análise de tecidos e fluidos para o estudo de situações fisiológicas (durante o desenvolvimento, em diferentes estágios metabólicos, frente a diversas respostas ambientais) ou patológicas (câncer, auto-imunidade, infecções) (GONZÁLEZ-BUITRAGO, 2006; GONZÁLEZ-BUITRAGO; FERREIRA; LORENZO, 2007).

Sobretudo, o objetivo destas pesquisas utilizando tecidos e fluidos são similares às pesquisas com linhagens celulares (identificação de biomarcadores, farmacoproteômica) (GALDOS, 2009).

Nos últimos anos, muitas questões biológicas importantes têm sido respondidas pela proteômica e centenas de biomarcadores foram descobertos. Entretanto, poucos desses marcadores têm ultrapassado a fase de identificação. Sua aplicação com sucesso na prática clínica dependerá de plataformas sensíveis, desenvolvimento de painéis de proteínas e estudos colaborativos que incluam médicos, epidemiologistas, biólogos moleculares, com uma questão clínica relevante e com parâmetros bem definidos de recrutamento e caracterização de pacientes e amostras (BARBOSA et al., 2012).

Biomarcadores específicos e sensíveis, contudo, não são facilmente identificados por abordagens proteômicas. É o que revelam, por exemplo, os dados obtidos em câncer de cabeça e pescoço, mama, cólon e ovário, que, apesar de serem condições diferentes, mostram alterações similares. Além disso, para desenvolvimento de testes clínicos, dificilmente um marcador isolado terá sensibilidade e especificidade suficientes para predições ou diagnósticos; provavelmente, serão necessários painéis de proteínas associadas a condições específicas (BARBOSA et al., 2012).

Apesar desses desafios, não existem dúvidas de que os resultados de abordagens proteômicas são potencialmente úteis em diversas áreas da pesquisa clínica, entre elas, diagnóstico, monitoramento de resposta à terapia, predição de desfecho clínico, classificação de subtipos de doenças, determinação de riscos, caracterização de vias metabólicas, quantificação de biomarcadores e geração de alvos terapêuticos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos realizados no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto Biológico (CETEA-IB), registrado sob o número do protocolo, CETEA 136/14, aprovado em 03/09/2014 (ANEXO 1).

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal (CPDSA), do Instituto Biológico, durante o período de julho de 2013 a maio de 2017.

4.1. LINHAGEM ESTABELECIDADA DE RIM BOVINO (MDBK)

As células MDBK (CCL-22¹) foram cedidas, gentilmente, pelo LBV, Dra. Edviges Maristela Pituco, no período de 01 a 05 de fevereiro de 2016. As células da linhagem de epitélio renal bovino foram provenientes da “American Type Culture Collection” (ATCC, Manassas, EUA), livre de *Pestivirus*.

As células foram cultivadas em monocamadas em garrafas de poliestireno, com volume de 25cm⁴/60ml, próprias para cultivo celular (TPP, Techno Plastic Products AG[®], Switzerland) em meio de crescimento, composto por Meio Essencial Mínimo (MEM; Nutricell[®], Campinas, Brasil), tamponado com 25 de ácido 4-(2- hidroxietil)- 1-piperazineetanossulfônico (HEPES - Biosolve[®], Westford, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Nutricell[®], Campinas, Brasil) e mantidas em estufa à temperatura de 37°C e 5% de CO₂.

Para a manutenção da linhagem, o repique das células foi realizado entre três e cinco dias, na proporção de 1:3, utilizando-se solução de Tripsina-Versene para a individualização das mesmas. As culturas foram mantidas em câmara estufa (Eletrolab[®]), à temperatura média de 37°C. O volume final foi determinado após a contagem das células em câmara de Neubauer (Optik Labor[®], Friedrichshofen, Alemanha), e os subcultivos feitos com concentração aproximada de 2x10⁵ células/mL.

4.2. VÍRUS

Utilizou-se o vírus BVDV CP, estirpe NADL isolado pelo “National Animal Disease Laboratory” (NADI, Ames, EUA)), mantida em meio Eagle MEM sem soro à – 80°C. A titulação viral utilizada foi de 6.47 (02/07/2015). O vírus foi gentilmente cedido pelo LBV do CPDSA, do Instituto Biológico.

O título infeccioso do vírus estirpe NADL obtido foi de $10^{6.47}$ DICT₅₀/mL, calculado segundo o método de Reed e Muench (REED; MUENCH, 1938).

4.3. TITULAÇÃO VIRAL

A estirpe NADL foi titulada em placas de microtitulação de poliestireno, de fundo chato com 96 cavidades (Corning[®], New York, EUA).

Inicialmente, em banho de gelo, foi diluído 0,5 mL da suspensão viral em 4,5 mL de meio de manutenção Eagle- MEM sem adição de SFB (diluição 10^{-1}), seguido posteriormente por diluições seriadas sucessivas até a diluição 10^{-8} . Na placa de microtitulação foram adicionados, nas oito primeiras colunas, respectivamente das diluições 10^{-1} a 10^{-8} , 50 µL de cada diluição por cavidade, em oito repetições. As cavidades da coluna seguinte foram mantidas vazias (coluna divisória), e as últimas três colunas foram destinadas ao controle da suspensão celular, nas quais foram adicionados 50 µL de meio de manutenção Eagle-MEM sem SFB.

Realizada a distribuição das diluições virais, foram adicionados, em todas as cavidades da placa, com exceção das cavidades da coluna divisória, 50 µL de uma suspensão de células contendo 3×10^5 células/mL em meio de manutenção Eagle-MEM contendo 10% de SFB. A placa foi então incubada em estufa a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂ e umidade controlada (Thermo Electron Corporation, Waltham, EUA) por 96 horas.

Decorrido esse período, a leitura do ECP foi realizada em microscópio invertido. O título viral foi calculado utilizando-se o método de Reed e Muench (REED; MUENCH, 1938).

4.4. EXPOSIÇÃO DAS CÉLULAS MDBK AO BVDV

Inoculou-se o vírus BVDV, CP, estirpe NADL e titulação $10^{6.47}$ DICT₅₀/mL em garrafas contendo monocamadas já pré-formadas de células MDBK com concentração de 2×10^5 células/mL, preparada com 24 horas de antecedência à inoculação.

Inoculou-se 0,5 mL do vírus em quatro garrafas de poliestireno próprias para cultivo celular (TPP, Techno Plastic Products AG®, Switzerland) cujo volume era de T25cm² num total de oito garrafas (4 com o vírus BVDV e 4 sem o vírus).

Dispensou-se todo meio contido nas garrafas contendo as células MDBK em um frasco coberto com filtro estéril. As garrafas foram mantidas em estufa à 37°C, acrescidas de 8 mL de manutenção MEM. Descongelou-se rapidamente em banho-maria à temperatura de 37°C, o tubo de criogenia contendo a suspensão viral do vírus BVDV. A suspensão viral descongelada foi gotejada cuidadosamente, em sentido oposto ao tapete celular.

As garrafas permaneceram em estufa a 37°C durante 60 minutos para a adsorção do vírus a células. Durante esse período, a cada 15 minutos, foram realizados pequenos movimentos nas garrafas, a fim de promover uma melhor adsorção do vírus ao tapete celular.

Transcorrido o período de 1 hora, adicionou-se 5 mL de meio de manutenção MEM às garrafas, acrescido de 1% de antibióticos e suplementado com 2% de SFB. As mesmas retornaram para estufa a temperatura de 37°C.

Os cultivos celulares foram observados diariamente através do microscópio óptico invertido (CK Olympus, Tokyo), segundo os horários já pré-estabelecidos aleatoriamente, até o surgimento do ECP.

Nos horários descritos no **quadro 5**, foram retirados 2 mL de meio de cultivo das 8 respectivas garrafas (com e sem o vírus) e transferidos para tubos cônicos de 15 mL (Kasvi). Os tubos foram centrifugados por 10 min, a 16000 x g e o sobrenadante removido e fracionado em alíquotas de aproximadamente 1,8 mL em tubos criogênicos de 2 mL (Kasvi), e armazenados em ultrafreezer -80°C (Ultra-Low, Sanyo, MDF-U 56VC; Serie N. 111170058).

Quadro 5 – Cronograma de coleta de meio de células MDBK inoculadas com o vírus BVDV

DIA	DATA OBSERVAÇÃO	HORÁRIO	COLETA
D0	02.02.2016	09h00	Inoculação do vírus
D0	02.02.2016	16h30	1. Coleta
D1	03.02.2016	17h00	2. Coleta
D2	04.02.2016	16h00	3. Coleta
D3	05.02.2016	08h00	4. Coleta
D3	05.02.2016	16h00	5. Coleta

Fonte: Próprio autor

4.5. ANÁLISE PROTEÔMICA

Todos os procedimentos a seguir relacionados foram desenvolvidos em parceria com o Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza

Utilizaram-se *pools* das alíquotas de meio contendo, pelo menos, 100 µg de proteínas totais em cada pool, com 4-5 repetições.

4.5.1. Determinação da concentração de proteínas

Uma alíquota do meio de cultivo foi utilizada para a determinação de proteína total (BRADFORD, 1976). Primeiramente, uma curva analítica de calibração foi obtida a partir de soluções padrões, com concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA) e as amostras, mensuradas em triplicata depois de diluídas numa proporção de 1:80 (v/v) em água milli-Q (Millipore, EUA).

As amostras já diluídas (100 µL) foram misturadas com 2,5 mL do reagente de Bradford e lidas depois de 10 minutos a 595 nm (Ultraspec III, GE *Life Sciences*, Piscataway, New Jersey, EUA).

4.5.2. Eletroforese bidimensional

Para eletroforese bidimensional, foi utilizado o protocolo previamente descrito (MOURA et al., 2006, 2010; VAN TILBURG et al., 2013). Um volume de amostra contendo 100 µg de proteínas foi adicionado a uma solução de rehidratação contendo ureia (7 M), tiourea (2 M), anfólitos livres 0,8% (IPG buffer, 3-10), CHAPS (2% w/v), ditioneitol (DTT) 16 mM e traços de azul de bromofenol. A solução foi adicionada às canaletas da bandeja de hidratação e incubada com tiras de 13 cm e faixa de pH 3-10 linear (IPGs; GE *Health care Life Sciences*) por 17 h.

Para a focalização isoelétrica, utilizou-se o equipamento, ETTANTMIPGphorIITM (GE *Health care Life Sciences*), com a seguinte programação: 250 V, 500 V, 800 V por 1 hora, 1000 V por 1 hora, 10000 V (22000 Volts hora – Vh), 10000 V (40.000 Vh) totalizado 40000 Vh.

Após a focalização, as tiras foram incubadas no tampão de equilíbrio, por duas vezes, contendo (75 mM Tris-HCl, pH 8,8; glicerol 29,3%, uréia 6 M, dodecil sulfato de sódio (SDS) 2%, azul de bromofenol (traços) e água ultrapura (q.s.p. 200 mL).

Numa primeira etapa, as tiras mantiveram-se, sob leve agitação, em solução de equilíbrio (10 mL/tira) adicionada de 2% de DTT, por 20 min, sendo, em seguida, incubadas por mais 20 min, com a solução de equilíbrio contendo 2,5% de iodo acetamida. Logo após, as proteínas foram separadas em géis de poliacrilamida SDS-PAGE 10% (SE 600 Ruby Amersham *Bio Science*, EUA) acrescido de SDS, em sistema vertical (ETTAN™ DALT six, GE *Health care Life Sciences*). Os géis foram colocados em tampão de corrida contendo (0,25 M) de Tris Base, (2 M) glicina e (1 %) SDS, que foi conduzido como se segue: 15 mA/gel durante 1h e 40 mA/gel por mais 5-6 h, adicionados de marcadores moleculares variando de 12 a 225 kDa (Amersham™ Full-Range Rainbow™ Molecular Weight Markers; GE *Life Sciences*, EUA), com base em sua massa molecular (GE *Health care Life Sciences*).

4.5.3. Coloração dos géis com Coomassie Blue G-250

Os géis foram corados com Coomassie Blue G-250 (MOURA et al., 2006, 2010; VAN TILBURG et al., 2013). Após a segunda dimensão, os géis foram lavados três vezes (20 min cada) com uma solução contendo ácido fosfórico (2%) e etanol (30%) em água, seguidos de mais três lavagens com ácido fosfórico (2%) em água. Os géis foram imersos por 72h em solução com ácido fosfórico (2%), etanol (18%) e sulfato de amônio (15%), adicionados de 2 mL de solução de Coomassie Blue G-250 (2% w/v). Depois deste período, descartou-se a solução contendo o corante, e os géis foram lavados com água destilada.

4.5.4. Digitalização e análise das imagens dos géis pelo aplicativo PDQuest

Os géis bidimensionais foram digitalizados utilizando o Image Scanner II (GE *Life Sciences*, EUA) na resolução de 600 dpi, modo transparente e filtro verde. As imagens foram salvas em arquivos de formato (.tiff) e analisadas pelo aplicativo PDQuest (versão 8.0.1; Bio-Rad Laboratories, EUA).

De acordo com metodologia previamente descrita (MOURA et al., 2010), todos os mapas bidimensionais foram avaliados em um único *match set*. Um gel representativo foi criado com base nos géis de todos os indivíduos e *spots* presentes de forma consistente nos mapas também foram adicionados ao gel *master*.

Proteínas presentes em diferentes regiões dos géis foram utilizadas como marcos de localização de forma a permitir o alinhamento correto de cada *spot* nos diferentes géis. A quantificação dos *spots* foi dada em ppm, da densidade óptica integrada total de cada gel, conforme definido pelo aplicativo.

4.5.5. Análise estatística

A intensidade dos *spots* obtida após a análise com o aplicativo PDQuest foi avaliada quanto à normalidade de sua distribuição, por meio do teste Kolmogorov-Smirnov, assimetria e curtose. Transformações logarítmicas foram realizadas para ajuste da normalidade (quando necessário).

Os *spots* foram avaliados por meio de ANOVA e as médias, comparadas entre os tratamentos por meio de teste de Tukey ($P < 0,05$), utilizando o software Graph Pad Prism 5.

4.5.6. Digestão das proteínas

Os *spots* com os parâmetros de interesse do estudo foram cortados e digeridos com tripsina (MOURA et al., 2006, 2010; VAN TILBURG et al., 2013). Os *spots* de interesse foram cortados individualmente dos géis em pedaços de aproximadamente 1 mm^3 e completamente descorados com $400 \text{ }\mu\text{L}$ de solução contendo acetonitrila 50% (ACN)/bicarbonato de amônio (50% a 25 mM , pH 8,0) ficando nesta solução aproximadamente 16 horas.

Desidratou-se os *spots* duas vezes com $200 \text{ }\mu\text{L}$ de acetonitrila absoluta durante 5 minutos e secos à temperatura ambiente. As proteínas foram incubadas por, aproximadamente, 20 horas, a 37°C , com solução contendo tripsina (20 ng per *spot*; Promega, cat #v511; Madison, EUA), ácido acético 50 mM (solução estoque $200 \text{ ng}/\mu\text{L}$) e diluída com bicarbonato de amônio 50 mM.

Os peptídeos foram então extraídos através de lavagens com solução de 5% de ácido trifluoroacético (TFA), 50% de ACN em solução de bicarbonato de amônio (50 mM) por 30 min, sendo submetidos a três lavagens.

Acondicionaram-se os extratos em micro tubos (Eppendorf, EUA) e secos utilizando o equipamento *speed vacuum concentrator* (Eppendorf, Hauppauge, NY, EUA). O sobrenadante contendo os peptídeos extraídos foram então seco utilizando o equipamento *Speed Vacuum Concentrator* (Eppendorf, Hauppauge, NY, EUA).

Um pedaço de gel sem *spots* e um *spot* referente a albumina proveniente do marcador molecular usado na segunda dimensão, foram submetidos ao mesmo procedimento e utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente.

4.5.7. Identificação das proteínas por espectrometria de massas ESI-Q-TOF (Electro spray ionization quadrupole-time-of-flight)

As amostras contendo os peptídeos foram injetadas utilizando um *Nano Acquity UPLC* e uma separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna UPLC C18 (75 µm x 10 cm) com um fluxo de 0,6 µL/minuto. Os espectros de massa foram adquiridos em um instrumento *Synapt G2 HDMS Acquity UPLC* (Waters Co., Milford, Massachusetts, EUA), utilizando uma aquisição dado-dependente em que os três picos principais foram submetidos ao MS/MS. As fases móveis A e B consistiam em 0,1% de ácido fórmico em água e 0,1% de ácido fórmico em ACN, respectivamente. As condições dos gradientes os quais foram usados estão como se segue: 0 minuto, com 3% de B, aumentando linearmente para 30% de B em 20 minutos, em seguida, aumentou-se para 70% B em 40 minutos em que se mantém até 50 minutos e, no minuto seguinte foi diminuído para 3% de B.

4.5.8. Pesquisa em banco de dados e classificação das proteínas

Os dados obtidos foram processados utilizando o *Protein Lynx Global Server* (Waters Co., Milford, Massachusetts, EUA) e submetidos a busca utilizando o MASCOT (Matrix Science Inc., Boston, MA, EUA; www.mascot.com).

Os parâmetros de busca utilizados incluem o máximo de uma clivagem perdida da tripsina, peptídeos monoisotópicos com +1, +2 e +3, com modificação variável de oxidação da metionina e variação fixa de carbamidometilação das cisteínas. Os limites selecionados de tolerância para variação da massa dos peptídeos e dos fragmentos foram de $\pm 1,2$ Da e $\pm 0,6$ Da, respectivamente.

A identificação foi considerada não ambígua quando o escore da proteína for significativo ($p < 0,05$), e pela coincidência próxima da massa molecular e pI teóricos e experimentais da proteína.

4.5.9. Ontologia Gênica

Os dados obtidos com a identificação das proteínas do meio de cultivo por MS e pesquisa com o sistema “MASCOT” foram analisados utilizando o aplicativo para a pesquisa de anotações de proteínas (STRAP; aplicativo de código-fonte aberto). Os termos para a ontologia gênica associadas a processos biológicos, componentes celulares e funções moleculares foram obtidos a partir do banco de dados The Uni Prot Knowledge base (UniProtKB) e EBI GOA (MOURA et al., 2006, 2010; VAN TILBURG et al., 2013).

4.5.10. Análise *in silico* das redes de interação das proteínas

As interações interproteicas foram analisadas por meio do banco de dados STRING 9.0 (<http://string-db.org>), a partir de predições coletadas baseando-se em associações diretas (físicas) ou indiretas (funcionais), integrando evidências de várias fontes, bem como contexto genômico, experimentos em larga escala, co-expressão e dados obtidos a partir de publicações de pesquisa (REGO et al., 2014). A análise das redes de interação só foi realizada para as proteínas mais expressas, baseando-se no percentual de intensidade e quantidade de *spots*.

5. RESULTADOS

5.1. EXPOSIÇÃO DAS CÉLULAS AO VÍRUS

Para a primeira etapa do experimento, foram analisadas 8 garrafas já contendo as células MDBK, sendo 4 destinadas ao controle e 4 expostas ao vírus BVDV. Desse modo, foram coletados (e, posteriormente armazenados), os meios de cultivo para processamento posterior do perfil protéico (segunda etapa do experimento).

No dia 0 (**D0**), isto é, o primeiro dia, as garrafas foram recebidas do setor de cultivo celular do Laboratório de Vírus dos Bovídeos do Instituto Biológico, às 8h00, e a inoculação do vírus ocorreu às 9h00, sendo que a primeira observação (e, posterior coleta de meio de cultivo), foi realizada no mesmo dia às 16h30 para que houvesse adsorção do vírus às células MDBK.

Decorridas 7 horas após a inoculação do vírus, não se observou ECP nas células, portanto, o tapete celular apresentava-se sem alterações aparentes, com as monocamadas celulares intactas, tanto para o controle negativo como para o grupo exposto ao vírus.

No dia subsequente (**D1**), após 32 horas de inoculação do vírus, observou-se pequenos focos de infecção nas células (cerca de 10%) (**Figura 17**). Um aumento gradativo de 5% (ainda que muito discreto) no efeito danoso das células expostas ao vírus foi observado após 51 horas de inoculação (**D2**), (**Figura 18**), atingindo um ECP de aproximadamente 15%. As células apresentavam-se pequenas, com formas irregulares, isoladas ou em grupos, com poucas alterações nucleares evidentes e características.

No último dia de observação (**D3**), duas coletas foram realizadas, porém em horários divergentes, haja visto o esgotamento de substrato necessário para desenvolvimento celular.

Após 71 horas de inoculação, sucedeu a primeira observação às 8h00. Neste momento as células evidenciaram um ECP de 60%.

Observamos focos de lise celular, vacuolização e arredondamento, circundadas em meio a um tapete celular ainda íntegro, além de células com corpúsculo de inclusão e formação de sincícios. As células infectadas apresentavam-se grandes, arredondadas. Havia presença de "pontes citoplasmáticas" intercelulares, conferindo a algumas células, a forma estrelada (**Figura 19**).

Já na última coleta, às 16h00, (anterior ao esgotamento dos componentes celulares), o ECP já havia atingido 100%, evidenciando vários focos aleatórios de infecção, sugestivos de picnose celular (**Figura 20**), com núcleos em graus variáveis de degeneração.

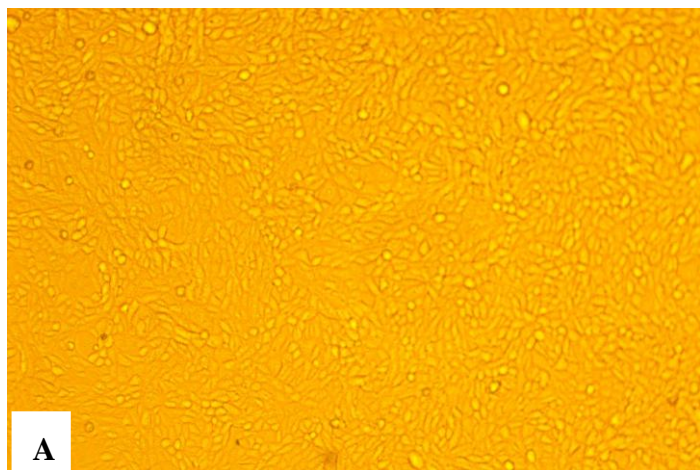
Os cultivos celulares do controle negativo mantiveram-se íntegros, sem índices de contaminação, preservando o desenvolvimento normal do tapete celular.

Tabela 2 – ECP em Células MDBK expostas ao vírus BVDV

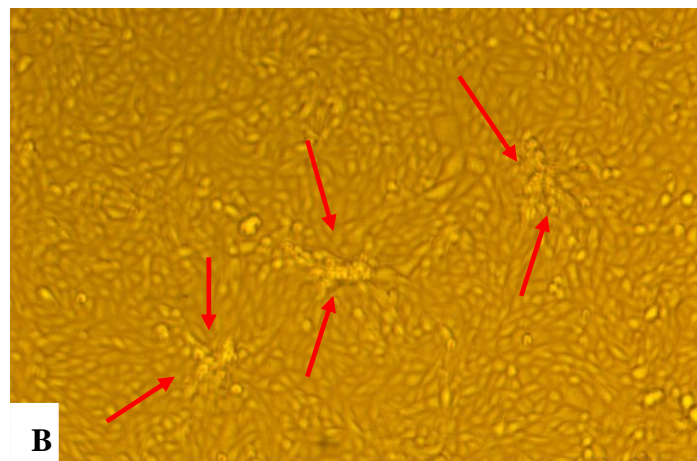
D	DATA OBSERVAÇÃO	HORÁRIO	PERÍODO (após inoculação viral)	ECP
D0	02.02.2016	09h00	Inoculou-se vírus	-
D0	02.02.2016	16h30	7:30h	-
D1	03.02.2016	17h00	32h	10%
D2	04.02.2016	16h00	51h	15%
D3	05.02.2016	08h00	71h	60%
D3	05.02.2016	16h00	79h	100%

Fonte: Próprio autor

Figura 17: Observação ECP em monocamadas de células MDBK. Controle negativo (**A**) e infectadas com o vírus BVDV CP (**B**) 32h de exposição ao vírus (100x, 4x zoom).

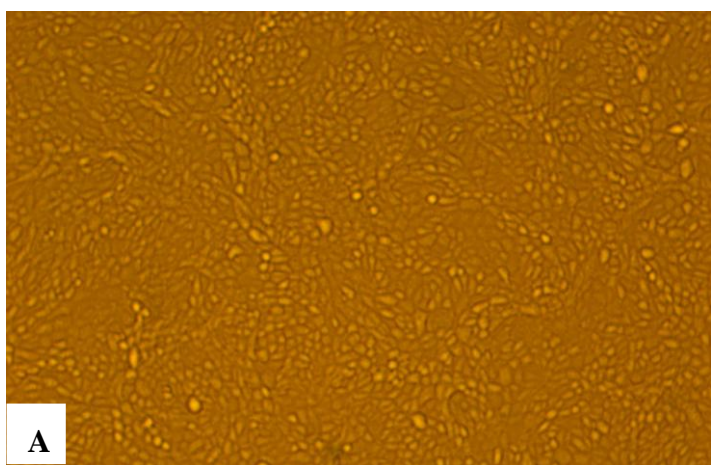


Fonte: Próprio autor

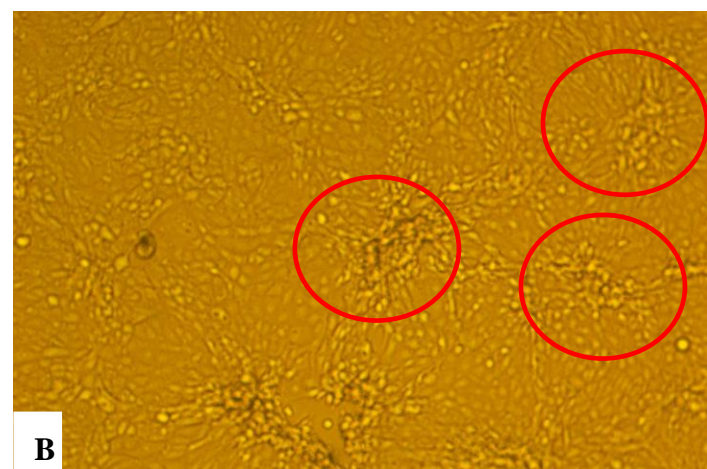


Fonte: Próprio autor

Figura 18: Observação ECP em monocamadas de células MDBK. Controle negativo (**A**) e infectadas com o vírus BVDV CP (**B**) 51h de exposição ao vírus (100x, 4x zoom)



Fonte: Próprio autor

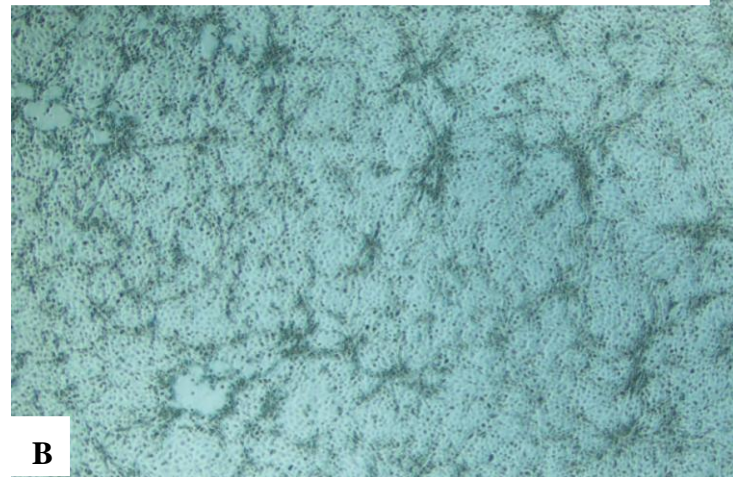


Fonte: Próprio autor

Figura 19: Observação ECP em monocamadas de células MDBK. Controle negativo (**A**) e infectadas com o vírus BVDV CP (**B**) 71h de exposição ao vírus (100x, 4x zoom)



Fonte: Próprio autor

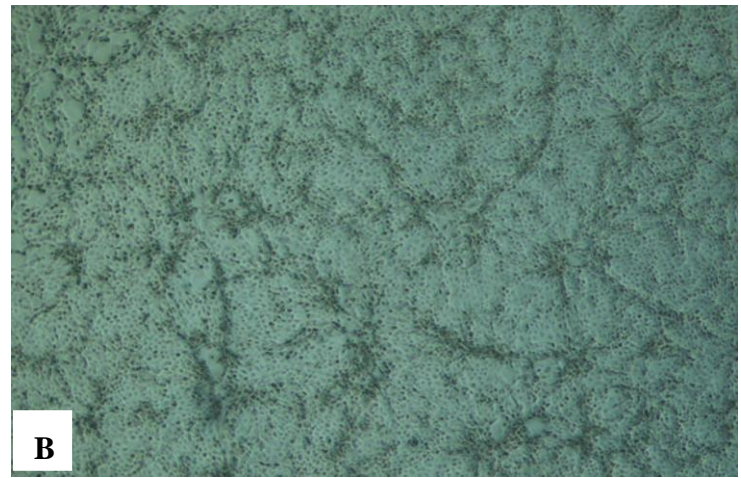


Fonte: Próprio autor

Figura 20: Observação ECP em monocamadas de células MDBK. Controle negativo (**A**) e infectadas com o vírus BVDV CP (**B**) 79h de exposição ao vírus (100x, 4x zoom).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Contudo, os resultados obtidos na primeira fase deste trabalho (relacionados ao isolamento viral), demonstram visivelmente um aumento progressivo de ECP nas células MDBK, quando expostas ao vírus BVDV CP.

5.2. ANÁLISE PROTEÔMICA

5.2.1. Eletroforese 2D e identificação das proteínas por espectrometria de massas ESI-Q-TOF (Electrospray ionization quadrupole-time-of-flight)

Amostras de meio de cultivo de células MDBK, na condição controle negativo e inoculado, foram coletadas nos tempos (conforme abaixo), após a inoculação viral e então, submetidas à extração de proteínas para análise proteômica.

- 7:30h;
- 32h;
- 51h;
- 71h;
- 79h

A **Tabela 3** apresenta os valores médios em ug/mL presente em cada amostra de meio de cultivo.

Tabela 3 – Teor de proteínas solúveis extraídas de meio de cultivo de células MDBK, controle (C) e exposto (E) com o vírus BVDV, em diferentes tempos de amostragem

IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	HORÁRIO COLETA	TEMPO COLETA	TEOR PROTEÍNAS (valores ug/mL)	ECP
1C	16h30	7:30h	2076,88	-
1E	16h30	7:30h	634,24	-
2C	17h00	32h	1554,08	10%
2E	17h00	32h	819,44	10%
3C	16h00	51h	2446,08	15%
3E	16h00	51h	787,2	15%
4C	16h00	79h	1738,2	100%
4E	16h00	79h	1247,6	100%

Fonte: Próprio autor

Para cada amostragem experimental representada pelo grupo, controle e inoculado no referido tempo de coleta, foram obtidos mapas bidimensionais representativos destas condições.

No conjunto do experimento, escolhemos aleatoriamente, o primeiro e último dia de coleta do meio de cultivo de células MDBK, na condição controle e inoculado com o vírus (7h30 e 79 horas após inoculação).

Obtivemos 10 géis bidimensionais representativos, isto é, 5 géis pertencentes ao grupo controle e 5 géis para o grupo inoculado, totalizando 20 géis, que foram digitalizados e analisados com relação à expressão diferencial de proteínas.

Com relação ao número total de *spots*, foram encontrados no experimento 745 ± 25 e 741 ± 24 para os tratamentos controle e inoculado, respectivamente. Não houve diferença significativa ($p \leq 0,01$; teste de Tukey) entre os grupos controle e inoculado nos respectivos tempos de experimento.

A abundância relativa dos *spots* nos respectivos tratamentos, durante os tempos de coleta, foi submetida à análise estatística e 93 *spots* apresentaram expressão alterada. Os *spots* selecionados para análise proteômica seguiram os seguintes parâmetros:

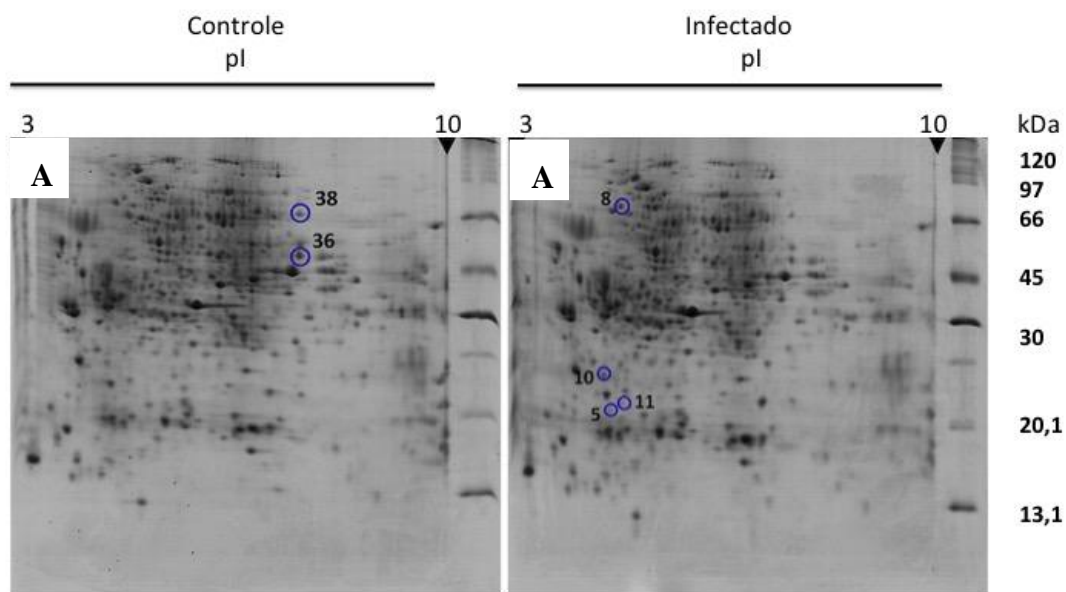
- a. Alteração da expressão em consequência do fator de tratamento (grupo controle e inoculado) dentro do tempo;
- b. Apenas os *spots* que foram registrados pelo software PDQuest;
- c. Consenso na expressão ao longo dos tempos de estudo (expressão relativa).

Por conta de não atender alguns dos parâmetros acima, principalmente o primeiro, 32 *spots* foram eliminados. Um grande número de proteínas, com expressão alterada devido ao tempo de cultivo, não foram consideradas, pois não estavam relacionadas à infecção pelo BVDV. Assim, um total de 61 *spots* foi cortado dos géis, digerido com tripsina e processado por MS.

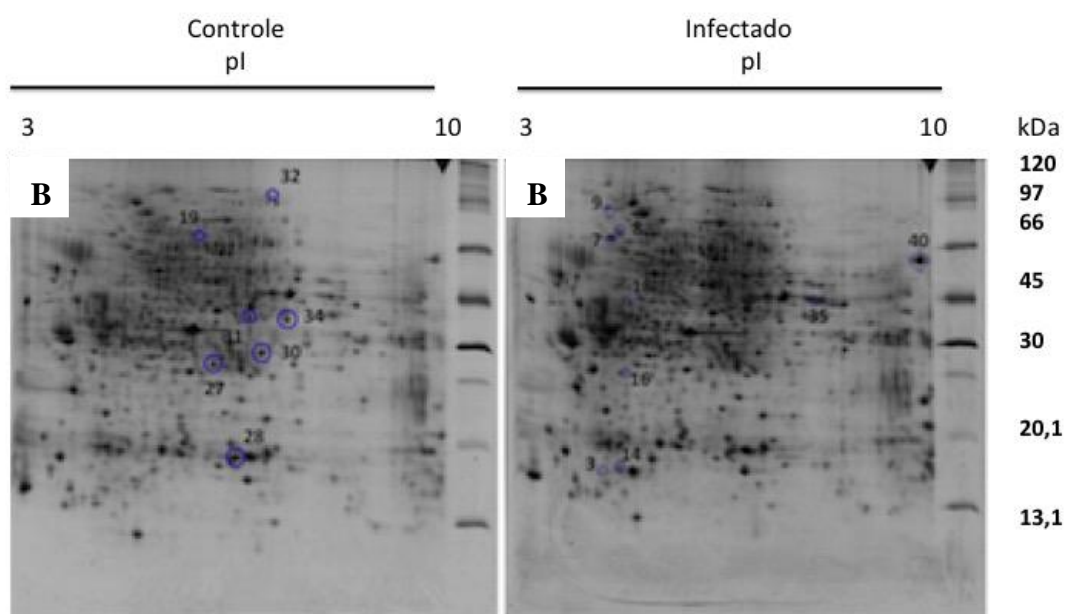
A análise utilizando a MS identificou 55 proteínas, aproximadamente, 90% da quantidade de *spots* diferencialmente expressos.

Na **Figura 21**, são apresentados os mapas proteicos de cada condição do estudo (controle e inoculado).

Figura 21: Perfil bidimensional de proteínas extraídas de meio de cultivo de células MDBK, infectadas ou não com o vírus BVDV. Cada mapa bidimensional foi obtido por separação de 100 µg de proteína em tiras de 13 cm, pH 3-10, seguido por SDS-PAGE (10%). Os géis foram corados com Coomassie Blue G-250. **(A)** 7:30h após a inoculação; **(B)** 79 horas após a inoculação.



Fonte: Próprio autor



Fonte: Próprio autor

A maior parte das proteínas identificadas apresentou expressão alterada. O programa PDQuest registrou e analisou os dados relativos à intensidade dos *spots* em cada gel, calculando o índice de variação de cada proteína, com expressão diferencial, em comparação aos respectivos valores de intensidade do spot nos géis dos grupos controle.

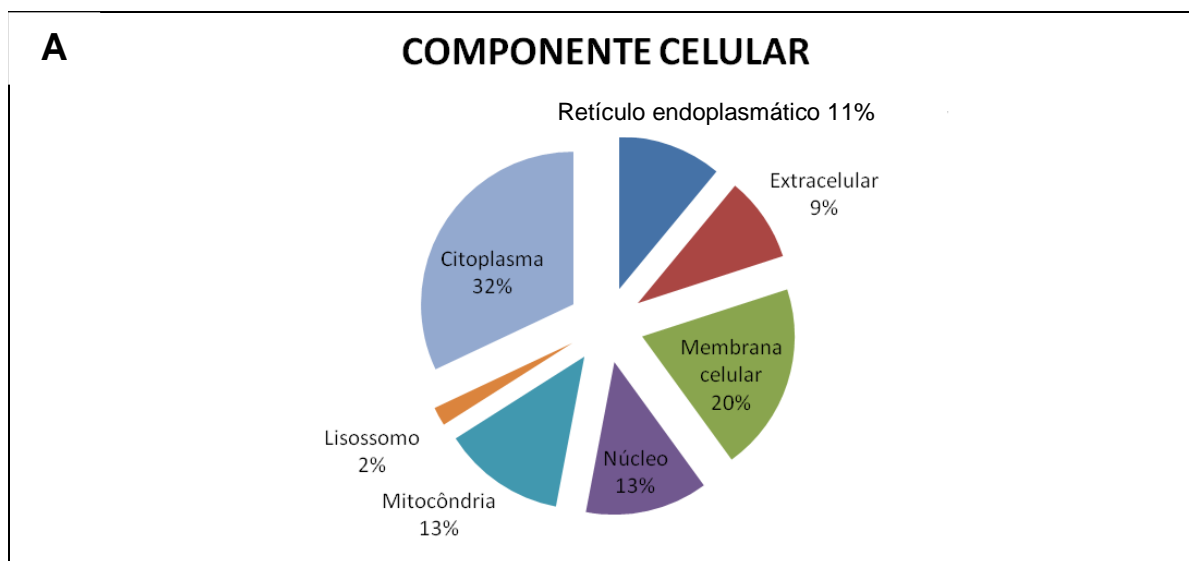
Cada proteína identificada está representada na **tabela 4** (ANEXO), conforme busca de similaridade com outras sequencias de proteínas já depositadas no NCBI. Na tabela também consta, número de acesso no banco de dados, símbolo e índice de variação (infectado vs. controle).

5.2.2. Análise da Ontologia Gênica

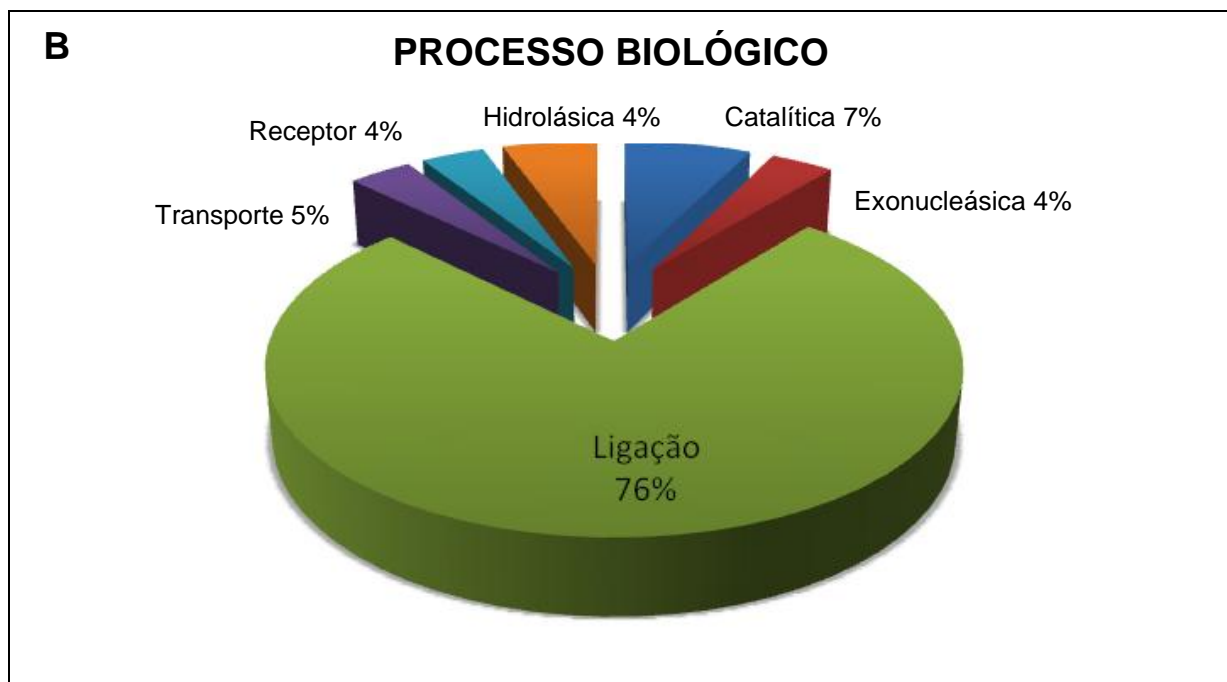
A localização celular fornece importantes informações a respeito da função fisiológica das proteínas. Muitas das proteínas identificadas pertencem a diferentes componentes celulares, entre os quais, citoplasma (18), membrana celular (11), mitocôndria (7), núcleo (7), retículo endoplasmático (6), região extracelular (5) e lisossomo (1).

Na **Figura 22** a classificação das proteínas identificadas é indicada em relação ao componente celular, processo biológico e função molecular. Tais proteínas atuam principalmente em processo biológicos associados à ligação (76%) e apresentam funções de defesa ao vírus (31%), processo de apoptose (14%) e resposta imune (13%), entre outras.

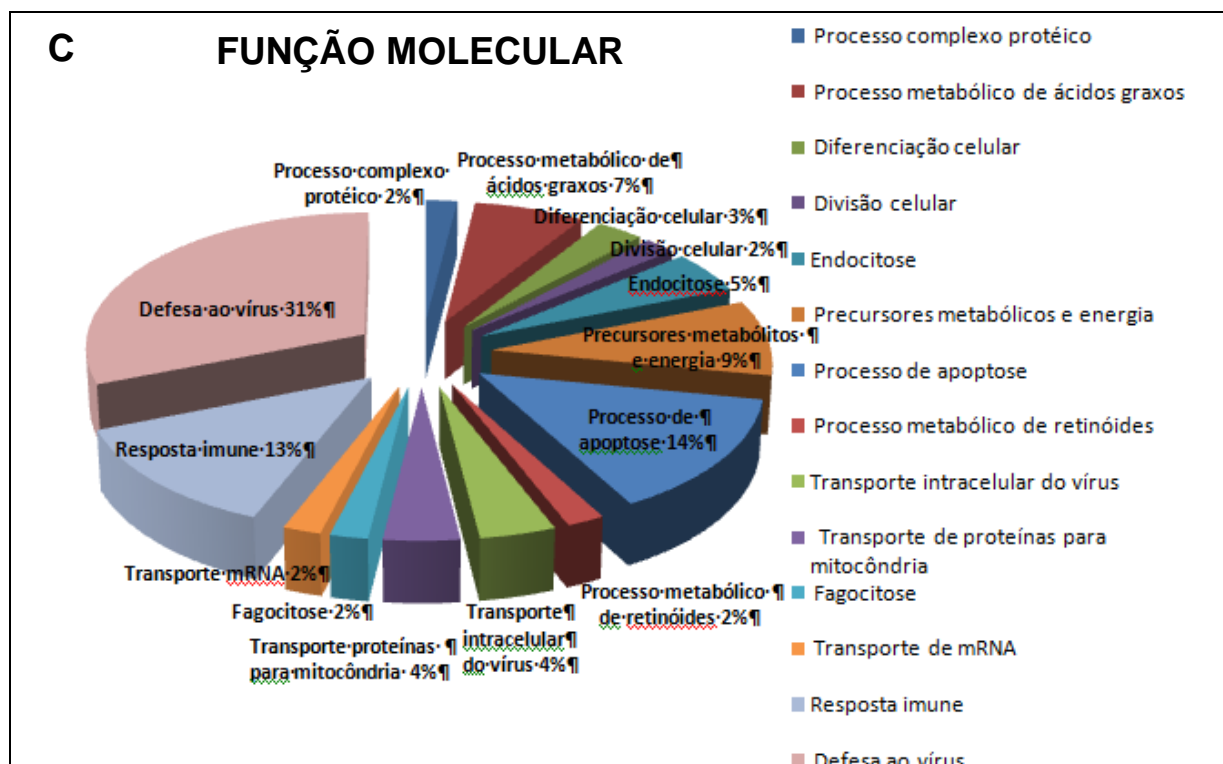
Figura 22: Gráficos das anotações da ontologia gênica das proteínas do meio de cultivo de células MDBK infectadas ou não com o vírus BVDV com base nos componentes celulares, funções moleculares e processos biológicos.



Fonte: Próprio autor



Fonte: Próprio autor



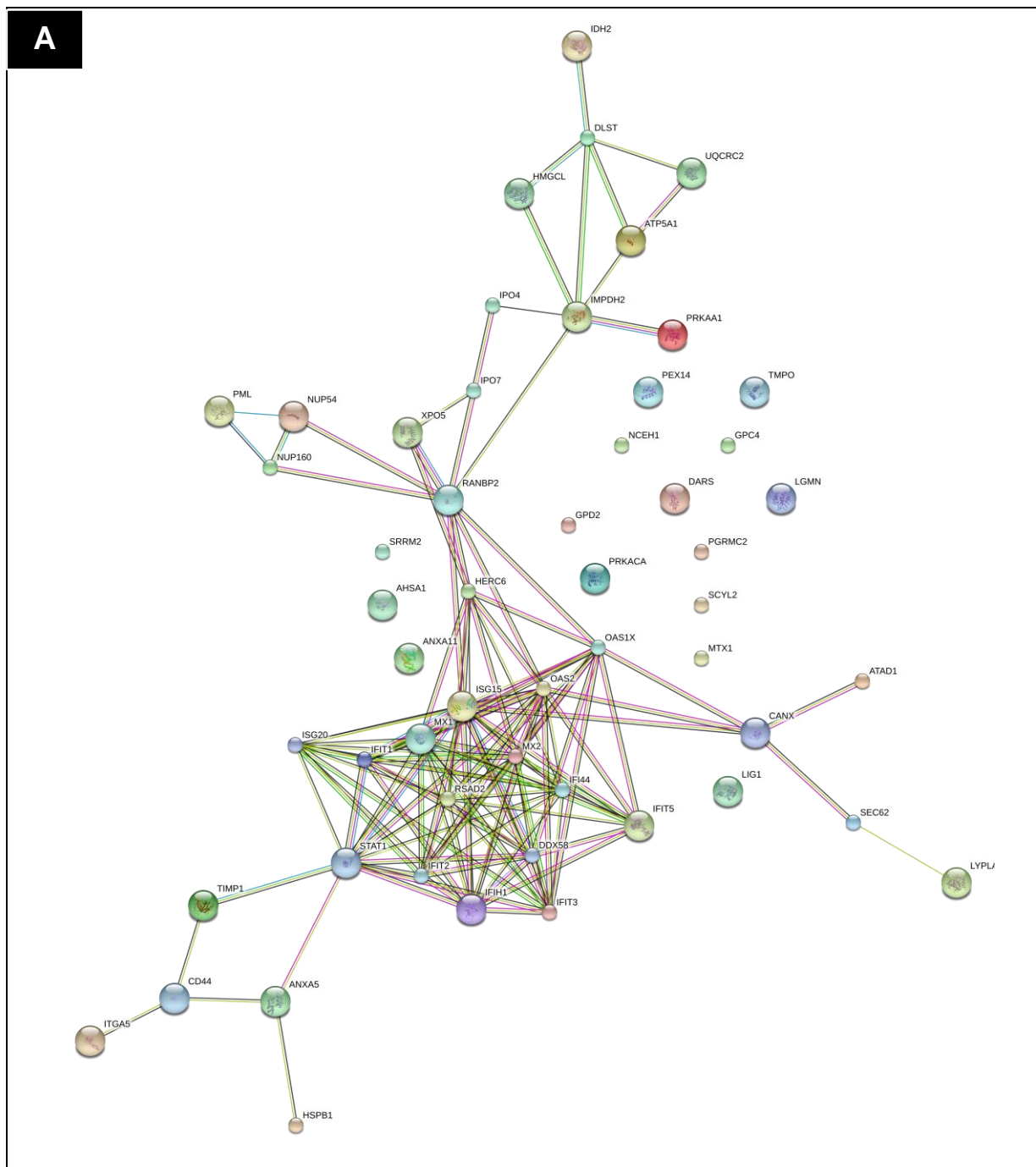
Fonte: Próprio autor

As proteínas identificadas por MS foram analisadas pelo STRAP. Os termos da ontologia gênica foram obtidos a partir de banco de dados UniProtKB e EBI GOA.

5.2.3. Análise *in silico* das redes de interação das proteínas

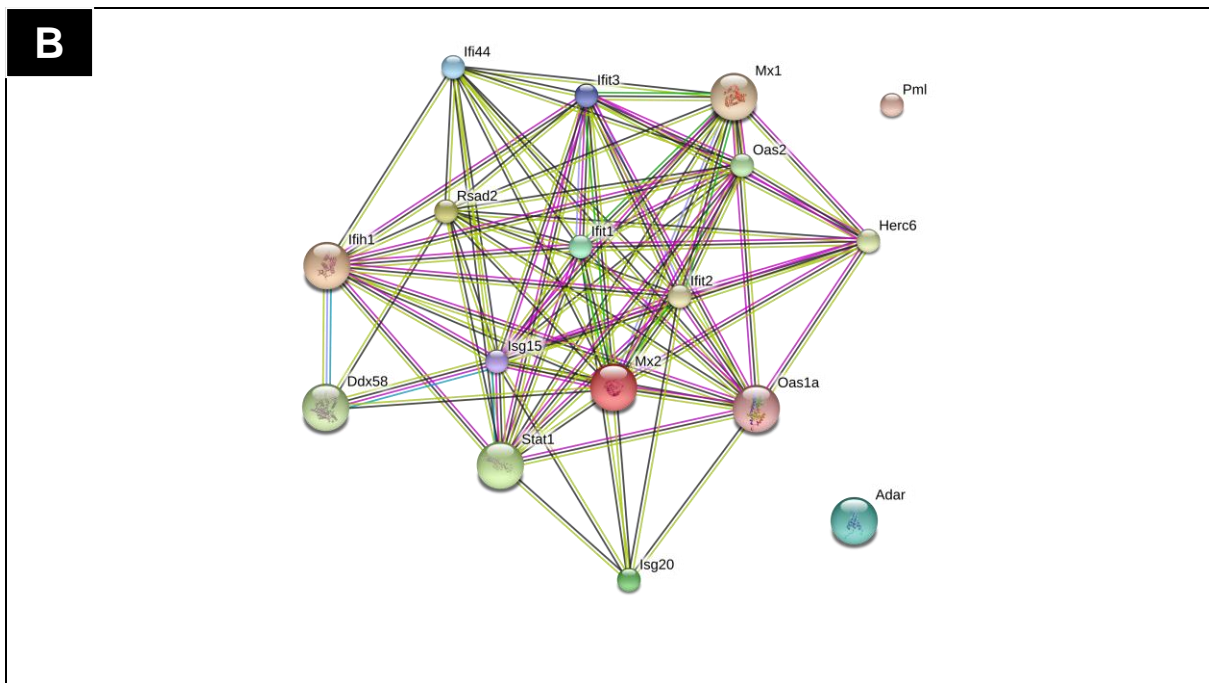
As proteínas foram analisadas com o software STRING. A pesquisa das interações foi estabelecida em *médium confidence* (**Figura 23**). A figura B mostra um grupo de proteínas que interagem mais fortemente, família ISG que é regulado pelo interferon e compreendem as proteínas IFIT1, IFIT2, IFIT3, IFIT5, IFI44, IFIH1, STAT1, ISG15, ISG20, OAS1, OAS2, Mx1, Mx2, DDX58, ADAR, HERC6, RSAD2 e PML. Essa proteína tem importante papel nas respostas de defesa ao vírus e resposta imune também.

Figura 23: Rede de interação proteína-proteína analisada pelo software STRING. Linhas de diferentes cores representam diferentes evidências de associação: verde, evidência de vizinhança; vermelha, evidência de fusão; azul, evidência de coocorrência; preta, evidência de coexpressão; roxa, evidência experimental; azul claro, evidência em banco de dados; amarela, evidência em mineração de texto; roxa clara, evidência de homologia. **(A)** a rede completa; **(B)** mostra a família ISG que é regulada pelo interferon.



Fonte: Próprio autor

Figura 23: Rede de interação proteína-proteína analisada pelo software STRING. Linhas de diferentes cores representam diferentes evidências de associação: verde, evidência de vizinhança; vermelha, evidência de fusão; azul, evidência de coocorrência; preta, evidência de coexpressão; roxa, evidência experimental; azul claro, evidência em banco de dados; amarela, evidência em mineração de texto; roxa clara, evidência de homologia. **(A)** a rede completa; **(B)** mostra a família ISG que é regulada pelo interferon



Fonte: Próprio autor

6. DISCUSSÃO

Historicamente, o isolamento viral em cultura de células de bovinos tem sido utilizado como padrão em comparação com outros testes disponíveis (RIDPATH, 2010), sendo o teste diagnóstico de excelência e o método recomendado pela OIE em casos comércio internacional (OIE, 2009).

No presente trabalho, inoculou-se o vírus BVDV CP exatamente em células MDBK, haja visto seu potencial de replicação viral.

Não existem evidências que comprovem haver relação entre a citopatogenicidade e a virulência, uma vez que estirpes NCP do vírus em geral, causam a forma mais grave da enfermidade (RIDPATH et al., 2010). Já as amostras CP causam alterações celulares características, que são visíveis cerca de 48 horas após a inoculação viral (RADOSTITIS et al., 2007).

Observa-se ECP significativo nas células após 51h de inoculação viral, isto é, dentro dos padrões sugeridos por Radostitis et al. (2007). Ainda relatado por Stephens et al, 2004, com base no efeito de replicação em cultivos celulares, o BVDV provoca extensos danos nas células do cultivo, como vacuolização citoplasmática e destruição celular completa entre 48 a 72 horas (STEPHENS et al., 2004).

Não obstante, outro fator que afeta o cultivo do BVDV é seu método de inoculação. A sensibilidade do método é inversamente proporcional à distância que as partículas virais têm de percorrer no meio de cultura até alcançar a camada de células. Mas esse problema pode ser evitado se o inóculo for adsorvido diretamente na camada de células por 1 a 2 horas antes de se adicionar todo o meio de cultura (SALIKI; DUBOVI, 2004).

Inoculou-se o vírus em monocamadas de células MDBK, e o mesmo esteve incubado em estufa 1h antes de se inserir o meio de cultura. Essa etapa fora realizada de forma sensível, para que justamente houvesse adsorção completa do vírus.

O processo de adsorção do vírus à célula se deu através de uma ligação entre uma molécula presente na superfície da partícula viral com os receptores específicos da membrana celular do hospedeiro. Para haver a adsorção é necessária uma ponte entre as proteínas mediadas por íons livres de cálcio e magnésio, uma vez que as proteínas apresentam carga negativa. Outros fatores também podem influenciar diretamente na adsorção do vírus na membrana celular, tais como, temperatura, pH e envoltório com glicoproteínas (STEPHENS et al., 2004).

No primeiro dia de observação, o tapete celular encontrava-se sem alterações, corroborando as descrições da literatura, pois nesta primeira observação, o tempo que o vírus havia sido inoculado era de 7h, tempo esse insuficiente para o surgimento dos primeiros efeitos deletérios nas células.

No segundo dia de observação, já com 32h de inoculação viral, pequenos focos de infecção, ainda que esparsos, já eram observados em meio ao tapete celular, evoluindo gradativamente até que o ECP alcançasse 15% no terceiro dia de observação.

Neste momento, se observou o início de formas irregulares, conforme mostram as Figuras 17 e 18, 10% e 15% de ECP, respectivamente.

A partir do quarto dia foram observadas aderências na parede da garrafa da cultura inoculada, nas áreas onde havia os focos de efeito citopático, com vários focos de lise celular, vacuolização, arredondamento, sugerindo um ECP de 60%, conforme observamos na Figura 19.

O arredondamento celular ocorre devido às alterações na estrutura e função das fibras do citoesqueleto, que podem levar ao desprendimento das células da monocamada celular e em estágios avançados da patologia celular (FLORES, 2007).

No mesmo dia de observação, porém às 16h, já havia vários focos aleatórios de infecção, com núcleos sugestivos de degeneração celular, havendo o desprendimento das células da monocamada celular, conforme visualização na Figura 20, além de se observar também a suspensão de células mortas.

Neste momento, se verificou o comprometimento de 100% da monocamada de células. Devido à degeneração celular e necrose, as células apresentaram arredondamento na morfologia celular, citólise e destacamento de células da monocamada. As células infectadas apresentaram desorganização e marginalização da cromatina para região da membrana perinuclear e o centro do núcleo com aspecto mais claro e pálido, indicando a presença da inclusão viral.

No âmbito reprodutivo, há relatos que em embriões no estágio de mórula e blastocisto ainda não eclodido, não foram observados efeitos citopáticos em 48 horas após exposição ao BVDV CP (BIELANSKI; HARE, 1988).

Estudos *in vitro* mostraram que a zona pelúcida intacta protege as células embrionárias da infecção pelo BVDV e permite o desenvolvimento normal (SINGH et al., 1982; POTTER et al., 1984).

Archbald et al. (1979) deram evidências de que o BVDV pode interferir no desenvolvimento embrionário inicial. Vacas superovuladas tiveram BVDV infundido em um corno uterino e a qualidade dos embriões coletados do corno infectado foi reduzida em relação aos coletados do corno não infectado.

Embora o BVDV possa ter um efeito direto no desenvolvimento embrionário, as alterações inflamatórias no útero após a infecção podem resultar em um ambiente incompatível com o desenvolvimento embrionário. Em estudos experimentais, alterações histológicas foram evidentes no útero e no oviduto, de 6 a 21 dias pós-infecção (ARCHBALD et al., 1973).

Contudo, avaliando os resultados obtidos na primeira etapa desse trabalho, obtivemos os efeitos citopáticos compatíveis aos descritos na literatura e encontrado em outros trabalhos, entretanto, é válido ressaltar que as células do controle se mantiveram em desenvolvimento sadio, sem alterações morfológicas ou indícios de contaminação.

Na segunda etapa do presente estudo foi caracterizado o perfil protéico do meio de cultivo de células MDBK inoculadas ou não com o vírus BVDV. A diarreia viral bovina, causada pelo BVDV-1 ou BVDV-2, representa um grande impacto econômico no agronegócio. Diversos pesquisadores investigam essa virose com o objetivo de desenvolver melhores estratégias e padronizadas no controle sanitário de rebanhos. No entanto, o mecanismo da patogênese ainda não está totalmente elucidado.

Também foram descritos, neste estudo, a identificação das proteínas detectadas nos géis bidimensionais, a ontologia gênica, as redes de interações das proteínas mais expressas. Utilizando a MS (ESI-Q-Tof), noventa e três spots foram identificados e correspondem a cinquenta e cinco proteínas distintas, as quais apresentam diversidade funcional de acordo com a ontologia gênica.

Os principais processos biológicos em que estas proteínas atuam, de acordo com a análise pelo software STRING, estão associados à resposta de defesa ao vírus (17%), regulação negativa da replicação do genoma viral (11%), regulação negativa de processos de apoptoses (14%), processos metabólicos de moléculas pequenas (32%), resposta imune (17%) e resposta ao interferon (9%). Enquanto que pela análise da ontologia gênica, foi demonstrado que o processo de ligação foi o predominante (76%).

Ainda analisando a ontologia gênica, a maior parte das proteínas identificadas é componente do citoplasma (32%), membrana celular (20%), mitocôndria (13%) e núcleo (13%). A defesa ao vírus foi a função molecular que teve mais destaque (31%), assim como a resposta imune (13%) e o processo de apoptose (14%).

Os mecanismos bioquímicos e fisiológicos de células animais infectadas pelo vírus BVDV, ainda estão pouco esclarecidos. Associado ao fato da defesa celular ao ataque de patógenos ter como base alterações em vias metabólicas chaves, em decorrência da reprogramação da expressão proteica (FREDERICKSEN et al., 2015), o estudo da identidade dessas moléculas fornece um conjunto de informações que podem auxiliar na melhor elucidação desses processo. Os mesmo autores utilizaram o cultivo de células MDBK como modelo *in vitro* no intuito de estudar a ativação da resposta imune e o perfil da expressão da citocina.

Os resultados demonstraram que a inoculação do BVDV em cultura de células MDBK induziram a produção de BCL3, IL-1 β , IL-8, IL-15, Mx-1, IRF-1 e IRF-7. Esses resultados e a análise *in silico*, sugeriram que o BVDV-1 regula a expressão genética em bovinos utilizando a ativação de vários fatores de transcrição, principalmente pelo mecanismo do NF-kB.

A maioria das proteínas identificadas está relacionada à defesa celular ao vírus, dentre elas temos: ISG20, IFIT2, IFIT3, MX1, MX2, ISG15, IFIT1, IFIH1, OAS1, DDX58, IFIT5, NCEH1, OAS2, AHSA1, ATAD1, SLRIP, HERC6 e IMPDH2. Após a infecção, o RNA do vírus é detectado pelos receptores de reconhecimento do hospedeiro e algumas proteínas são recrutadas, desencadeando uma cascata de sinalização.

O presente trabalho identificou diversos interferons (IFIT2, IFIT3, MX1, MX2, IFIT1, IFIH1, IFIT5), citocinas que estão relacionadas a resposta imune do hospedeiro contra infecções por patógenos, principalmente vírus. A resposta imune é a primeira etapa de defesa contra o vírus, envolvendo a produção de IFN do tipo 1 e outras citocinas, assim como a resposta gerada pelas células T e B (FREDERICKSEN et al., 2015).

A produção de IFN em resposta à infecção do vírus é desencadeada pelo reconhecimento de padrões moleculares associados aos patógenos pela célula infectada (AKIRA et al., 2006; YONEYAMA ; FUJITA, 2009; VITOUR et al., 2014). Estudos recentes mostraram que o BVDV pode levar a imunossupressão em células infectadas por diversos mecanismos, incluindo os interferons (PERLER et al., 2000; PETERHANS; SCHWEIZER, 2013; CHIKE et al., 2015).

No entanto, as vias de sinalização e os mecanismos responsáveis pela produção de IFN em resposta à BVDV ainda não são completamente compreendidos. Do IFN-1ao receptor (IFNAR), iniciando uma cascata de sinalização que resulta na expressão de centenas de genes estimulados pelos ISGs. Os ISGs são componentes-chave da resposta imune inata do hospedeiro e servem como a primeira linha de defesa contra a infecção viral.

No presente estudo, foram identificadas 18 proteínas ISG controladas e um das principais redes de interação entre proteínas (análise *in silico*). Entre estes, os ISG15, ISG20, Mx1, Mx2, RSAD2, OAS1 e OAS2, foram documentados como proteínas antivirais em células (SCHOGGINS et al., 2011).

A proteína ISG20 (Interferon-stimulated gene 20 kDa; 3'to 5'exonuclease) e diversas outras proteínas dessa mesma família estão relacionadas à inibição da replicação viral em diversas fases do ciclo viral (DEGOLS et al., 2007; SILVERMAN, 2007).

Devido ao grande número de ISGs, a relação vírus-hospedeiro pode alcançar uma grande complexidade. Novos ISGs são constantemente adicionados a lista e ainda faltam diversas informações e estudos para melhor elucidação dos processos e funções biológicas envolvendo esse grupo. O ISG20 pode atuar como um antivírus na Hepatite B, envolvendo outros interferons, com atividade enzimática mediada pelo ExoII e evitando a toxicidade celular (LEONG et al., 2016; LIU et al., 2017).

O ISG20 também foi relacionado na inibição da replicação dos alphavírus, via IFN-β (ZHANG et al., 2007). Células com expressão dessa proteína são resistentes em algumas RNA viroses, tais como, vírus da estomatite vesicular (VSV), influenza vírus, vírus da encefalomiocardite (EMC), vírus da hepatite A e C (HAV e HCV), vírus da febre amarela, HIV, mas o mesmo não ocorre com DNA vírus e adenovírus (ESPERT et al, 2003; ZHOU et al., 2011; ESPERT et al., 2007). ZHOU e colaboradores (2011) estudaram os efeitos da proteína ISG20 no cultivo de células MDBK com o vírus BVDV, observaram que essa proteína restringiu a propagação do vírus no cultivo celular, mas ainda faltam mais estudos para compreender melhor o papel dessa proteína na interação MDBK/BVDV.

As proteínas IFIT também demonstraram inibir a replicação do vírus por ligação e regulação das funções das proteínas e RNAs celulares e virais (FENSTERL; SEN, 2015). O DDX58 (RIG-1) desempenha um papel importante no reconhecimento do RNA do vírus em várias células e foi identificado como um receptor de DNA viral (TAKAHASI et al., 2008). A HERC6, presente no citoplasma, faz parte da família de proteínas envolvidas com a ubiquitinação. A ubiquitinação apresenta um conjunto de ações de uma cascata enzimática envolvendo as ubiquitinas E1, E2 e E3 (HOCHRAINER et al., 2005).

Essa proteína também foi identificada com função tanto na espermatogênese (RODRIGUEZ; STEWART, 2007), quanto na infertilidade masculina (ARIMOTO et al., 2015).

No presente estudo se demonstrou que as proteínas OAS1, OAS2, DDX58, NCEH1, AHSA1, ATAD1, SLRIP e IMPDH2 apresentam como principal processo biológico a ligação, seja ao ATP, RNA ou íons. Todas essas proteínas também desempenham um importante papel na infecção viral e na cascata da resposta antiviral, indução do interferon e citocinas, assim como na apoptose, cinética celular, diferenciação e regulação genética. Também podem desenvolver uma importante função na produção de granulócitos e regulação da migração celular (DONOVAN et al., 2013).

Outra função molecular avaliada no presente estudo foi o de proteínas relacionadas ao processo de apoptose, entre elas: STAT1, PML, LGMN, HSP27, TIMP1, PRKAA1, CD44, ANXA5, ANXA11. A apoptose das células hospedeiras desempenha um papel importante na regulação da patogênese de muitas doenças infecciosas. A apoptose desencadeada por infecção por vírus leva diretamente a patogênese viral. No entanto, bloquear a apoptose pode evitar a morte prematura de células infectadas, permitindo um alto teor de replicação do vírus ou infecção persistente (AMARA; MERCER, 2015).

Tanto a proteína STAT1, quanto a PML, estão também relacionadas a família de proteínas ISG e reguladas pelo interferon. Existem alguns relatos da STAT1 e viroses humanas e um trabalho recente relatando a importância dessa proteína e células infectadas com o vírus da diarreia epidêmica suína (PEDV), (GUO et al., 2016). Esses autores infectaram células Vero E6 e células IPEC-J2 com o vírus PEDV por 1 hora e puderam constatar que a expressão da STAT1 foi reduzida. A proteína PML está envolvida em diversos mecanismos, inclusive na resposta do dano e reparo do DNA, mas os mecanismos moleculares e as exatas funções ainda não estão totalmente esclarecidos (CHANG et al., 2017).

LGMN está relacionada ao lisossomo e utiliza a via do receptor 6-fosfato manose, mas pouco se sabe da função dessa proteína em viroses. Essa proteína pode estar relacionada com a translocação da MMP-12 em células infectadas por vírus em humanos (DALL; BRANDSTETTER, 2016). Em bovinos a proteína LGMN está relacionada a remodelação do endométrio, esse estudo descreveu várias proteínas e genes relacionados a amostras de endométrio de animais prenhez e não (BAUERSACHS et al., 2008).

Stress ou proteínas de choque térmico (HSPs) são as proteínas mais conservadas presentes em procariotas e eucariotas. Sua expressão é induzida em resposta a uma grande variedade de processos fisiológicos e ambientais. Os HSPs têm uma função dupla dependendo da localização intracelular ou extracelular, assim como uma função protetora. Diversos mecanismos foram propostos para explicar as funções citoprotetoras dos HSPs.

Vários HSPs também demonstraram interagir diretamente com vários componentes do mecanismo de morte celular programada. Por outro lado, HSPs extracelulares localizados ou ligados à membrana podem apresentar funções imunológicas (SCHMITT et al., 2007). Até o presente momento, não se encontrou nenhum relato da proteína HSP27 relacionada a nenhuma virose, apesar da sua importância na apoptose viral.

A TIMP1 funciona formando complexos um a um com metaloproteinases alvo, tais como colagenases, e as inativa irreversivelmente por ligação ao seu cofator (catalítico de zinco). Atua sobre MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9, MMP10, MMP11, MMP12, MMP13 e MMP16. Não age na MMP14. Também funciona como um fator de crescimento que regula a diferenciação celular, migração e morte celular e ativa as cascatas de sinalização celular via CD63 e ITGB1. Reproduz uma função na sinalização de integrina (ZHENG et al., 2011).

Interessantemente LIN e colaboradores (2015) realizaram um estudo para investigar como o EBV (vírus Epstein-Barr) poderia regular a expressão da proteína TIMP1, utilizando microarrayDNAC e citocinas. Nesse estudo, os autores verificaram uma atividade anti-apoptose quando houve tratamento com cisplatina ou estimulação com choque frio, isto é, a indução da expressão da TIMP1 pelo EBV poderia auxiliar na sobrevivência das células infectadas.

A proteína PRKAA1 é uma subunidade catalítica de proteína quinase ativada por AMP (AMPK), que desempenha um papel fundamental na regulação do metabolismo energético celular (YUAN et al., 2016). Em resposta à redução dos níveis de ATP intracelular, o AMPK ativa as vias produtoras de energia e inibe os processos que consomem energia: inibe a proteína, carboidratos e biossíntese lipídica, bem como o crescimento celular e a proliferação. A AMPK atua através de fosforilação direta de enzimas metabólicas e por efeitos de longo prazo por meio da fosforilação de reguladores de transcrição. Regula a transcrição e a estrutura da cromatina através da fosforilação dos reguladores de transcrição envolvidos no metabolismo energético, tais como CRTC2 / TORC2, FOXO3, histona H2B, HDAC5, MEF2C, MLXIPL / ChREBP, EP300, HNF4A, p53 / TP53, SREBF1, SREBF2 e PPARGC1A (MCDONALD et al., 2010; YUAN et al., 2016).

A CD44 é um receptor para ácido hialurônico (HA), importante nas interações célula-célula e célula-matriz. A CD44 também está relacionada como receptor para outras proteínas, tais como, a osteopontina, colágeno e metaloproteinases de matriz (MMPs). A adesão ao HA desempenha um papel importante na migração celular, crescimento, progressão do tumor e na ativação de linfócitos (VIKESAA et al., 2006).

Outra proteína relacionada à apoptose em nosso estudo, foi a ANXA5, uma proteína que também está relacionada com a anticoagulação atuando indiretamente como inibidor do complexo da tromboplastina, na cascada da coagulação. Essa proteína se liga à membranas que contém fosfolipídios com cargas negativas, principalmente fosfatidilserina, cálcio dependente (BOUTER et al., 2015).

Foram identificadas 7 proteínas com função molecular de resposta imune pela ontologia gênica, TMPO, SRRM2, UQCRC2, RSAD2, PGRMC2, SEC62 e IFI44. A IFI44 também pertence à família dos interferons e está associada com algumas viroses, mas seu exato papel ainda não está bem esclarecido (POWER et al., 2015). TMPO pode estar envolvido na organização estrutural do núcleo, além de ter um importante papel no desenvolvimento células T (YUAN et al., 2016). A proteína SRRM2 está relacionada ao RNAm e está relacionada com a catálise (BLENCOWE et al., 2000). UQCRC2 é uma proteína da cadeia respiratória do citocromo que desempenha um importante papel na fosforilação oxidativa (CREANEY et al., 2015); até o momento não encontramos nenhum estudo demonstrado seu possível papel em viroses.

A RSAD2 é uma proteína antiviral de ligação ao aglutinante de ferro e ao interferon, desempenhando uma importante função antiviral, podendo inibir uma ampla gama de vírus de DNA e RNA, incluindo citomegalovírus humano (HCMV), vírus da hepatite C (HCV), vírus do Nilo oeste (WNV), vírus da dengue, vírus Sindbis, vírus da gripe A, vírus Sendai, vírus da estomatite vesicular (VSV), e o vírus da imunodeficiência humana (HIV-1). Exibe atividade antiviral, inibindo o surgimento do vírus da membrana plasmática, atuando nas ligações lipídicas. Isto é realizado, pelo menos em parte, através da ligação e inibição da enzima farnesil difosfato sintase (FPPS), que é essencial para a biossíntese de lípidos derivados de isoprenóides. Promove a produção dependente de TLR7 e TLR9 da produção de IFN-beta em células dendríticas plasmocitóides (pDCs), facilitando a ubiquitinação ligada a Lys-63 'de IRAK1 (GRANDVAUX et al., 2002; HELBIG; BEARD, 2014).

Não existem muitos estudos relatando a provável função da proteína PGRMC2 e resposta imune, principalmente em animais. Keator e colaboradores (2012) relataram que essa proteína pode ter uma função no endométrio de macacas e na imunidade. SEC62 é uma proteína da membrana do retículo endoplasmático e tem alguns estudos relacionando essa proteína com tumores e a manutenção e recuperação da homeostase do retículo endoplasmático (FUMAGALLI et al., 2016).

O presente estudo forneceu uma visão global das alterações protéicas em células MDBK infectadas com BVDV. A identificação de proteínas reflete uma rede abrangente de interação células/vírus. Para o nosso conhecimento, muitas das proteínas expressas estão relacionadas à resposta imune após a infecção por BVDV. Muitas delas são novas e não foram detectadas em estudos anteriores, proporcionando assim novos alvos de proteína para a avaliação no futuro.

Esse trabalho é apenas um início de uma linha de pesquisa, utilizando técnicas como a espectrometria de massa na identificação de proteínas e no estudo da interação dessas proteínas. No entanto, o desafio ainda está em validações funcionais do grande número de proteínas identificadas. O objetivo da validação funcional é diferenciar as respostas celulares diretas dos processos celulares secundários indiretos relacionados à infecção do vírus.

As validações funcionais podem destacar as proteínas envolvidas nas respostas celulares diretas sobre infecções por vírus proporcionando novos conhecimentos aos conjuntos de dados proteômicos. No que diz respeito a outros esforços, deve-se dar muito efeito à expansão dos proteomas de vírus de diferentes famílias, elucidando as funções das proteínas-chave envolvidas na patogênese viral e descobrindo biomarcadores sensíveis.

7. CONCLUSÕES

Observou-se um aumento progressivo de ECP nas células MDBK, quando expostas ao vírus BVDV CP.

A análise utilizando a MS identificou 55 proteínas, sendo que grande parte delas apresentou expressão alterada.

Os resultados demonstraram que a inoculação do BVDV em cultura de células MDBK induziram a produção de BCL3, IL-1 β , IL-8, IL-15, Mx-1, IRF-1 e IRF-7. Esses resultados e a análise *in silico*, sugeriram que o BVDV-1 regula a expressão genética em bovinos utilizando a ativação de vários fatores de transcrição, principalmente pelo mecanismo do NF-kB.

O presente trabalho identificou diversos interferons (IFIT2, IFIT3, MX1, MX2, IFIT1, IFIH1, IFIT5), citocinas que estão relacionadas à resposta imune do hospedeiro contra infecções por patógenos, principalmente vírus.

-A elucidação das funções dessas proteínas nas interações vírus-célula hospedeira também pode abordar novas estratégias terapêuticas, além da identificação de biomarcadores moleculares mais eficazes

8. REFERÊNCIAS

AEBERSOLD, R.; HOOD, L. E.; WATTS, J. D. Equipping scientists for the new biology. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, n. 4, p. 359, 2000.

AKIRA, S.; UEMATSU, S. TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783-801, 2006.

ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. Cultivo celular. In: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. (Orgs.). **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. v.2. Rio de Janeiro: EPSJV, 2010. p. 215-253.

ALVES, P. M. M.; CARRONDO, M. J. T.; CRUZ, P. E. Introdução à tecnologia de cultivo de células animais. In: MORAIS, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do cultivo de células animais**: de biofármacos à terapia gênica. São Paulo: Roca, 2008. p. 2-14.

AMARA, A.; MERCER, J. Viral apoptotic mimicry. **Nature reviews**. Microbiology, London, UK, v. 13, n. 8, p.461-469, 2015.

AMARAL, J.B.; MACHADO-SANTELLI, G.M. A cultura de células em 3 dimensões e a sua aplicação em estudos relacionados a formação do lúmen. **Naturalia**, Rio Claro, v. 34, p.1-20, 2011.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. Manassas, 2012. Disponível em: <https://www.atcc.org/en.aspx>. Disponível em: <https://www.atcc.org/en.aspx>. Acesso em: 5 mar. 2016.

ANDERSON, N. G.; ANDERSON, N. L. Twenty years of two dimensional electrophoresis: past, present and future. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 17, n.3, p. 443-453, 1996.

ANDREWS, A.H.; BLOWEY R.W.; BOYD H.; EDDY R.G. **Bovine Medicine**: diseases and husbandry of cattle. 2. ed. Oxford: Blackwell Science, 2004.

ARCHBALD, L.F.; GIBSON, C.D.; SCHULTZ, R.H.; FAHNING, M.L.; ZEMJANIS, R. Effects of intrauterine inoculation of bovine viral diarrhea-mucosal disease virus on uterine tubes and uterus of nonpregnant cows. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.34, p.1133–1137, 1973.

ARCHBALD, L.; FULTON, R.; SEGER, C.; AL-BAGDADI. F.; GODKE, R. Effect of the bovine viral diarrhea virus on preimplantation embryos: a preliminary study. **Theriogenology**, Stoneham, v. 11, p.81–89, 1979.

ARIMOTO, K.; HISHIKI, T.; KIYONARI, H.; ABE, T.; CHENG, C.;YAN, M.;FAN, J.B.; FUTAKUCHI, M.;TSUDA,H.; MURAKAMI,Y.; SUZUKI, H.; ZHANG, D.E.; SHIMOTOHNO, K. Murine Herc6 Plays a Critical Role in Protein ISGylation In Vivo and Has an ISGylation-Independent Function in Seminal Vesicles.**Journal of interferon & cytokine research**: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research, New York, v. 35, n.5, p.351–358, 2015.

ASSIS, M.F.L.; SANTO, E.C.O.; JESUS, I.M. et al. Uso da cultura de células em testes diagnósticos laboratoriais em medicina e biologia. **Cadernos de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 3, p. 425-432, 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES. Brasília, 2012. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/>. Acesso em: 10 jan. 2017.

ATKINS, P. W.; JONES, L.; CARACELLI, I. **Princípios de química**: questionando a vida moderna e o meio ambiente. Porto Alegre: Bookman, p. 914, 2001.

AZAD, N. F.; RASOOL, N.; ANNUNZIATA, C. M.; MINASIAN, L.; WHITELEY, G.; KOHN, E. C. Proteomics in clinical trials and practice, present uses and future promise. **Molecular & Cellular Proteomics**, Bethesda, v. 5, n. 10, p. 1819-1829, 2006.

BACELLAR, F.; DE SOUSA, R. A importância do isolamento por cultivo celular e identificação de rickettsias através de técnicas de biologia molecular para o conhecimento das rickettsioses. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 13, suplemento 1, p. 190-192, 2004.

BAKER, J.C. Bovine Viral Diarrhea Vírus: a Review. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 190, n. 11, p. 1449-1458. 1987.

BAKER, J. C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 11, n. 3, p. 425-445, 1995.

BANKS, R. E; DUNN, M. J; HOCHSTRASSER, D. F.; SANCHEZ, J; BLACKSTOCK, W; PAPPIN, D. J; SELBY, P. J. Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. **The Lancet. Oncology**, London, v. 356, p. 1749-1756, 2000.

BARBOSA B. S.; SANTOS, S. A.; PIMENTAL, M. M. L. et al. Histórico do desenvolvimento do cultivo de células de animais: uma revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, Fortaleza, v. 9, n. 2, p. 334-347, 2012.

BARBOSA, E. B.; VIDOTTO A.; POLACHINI, G. M. et al. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 58, n. 3, p. 366-375, 2012.

BAUERSACHS, S.; MITKO, K.; ULBRICH, S.E.; BLUM, E.; WOLF, E. Transcriptome Studies of Bovine Endometrium Reveal Molecular Profiles Characteristic for Specific Stages of Estrous Cycle and Early Pregnancy. **Experimental and clinical endocrinology & diabetes** : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association, Heidelberg, v. 116. n. 7, p. 371-384, 2008.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 1059 p.

BERTUCCI, F.; BIRNBAUM, D.; GONÇALVES, A. Proteomics of breast cancer: principles and potential clinical applications. **Molecular & Cellular Proteomics**, Bethesda, v. 5, n. 10, p. 1772-1786, 2006.

BIELANSKI, A.; HARE, W.C. Effect *in vitro* of bovine viral diarrhea virus on bovine embryos with the zona pellucida intact, damaged and removed. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 12, p.19-24, 1988.

BILLINIS, C.; LEONTIDES, L.; AMIRIDIS, G.S.; SPYROU, V.; KOSTOULAS, P.; SOFIA, M. Prevalence of BVDV infection in Greek dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 1, n. 72, p. 75-79, 2005.

BISCH, P. M. Proteômica. In: LUÍS M. I. R. (Org.). **Genômica**. São Paulo: Atheneu, 2004. 162 p.

BIUK-RUDAN, N.; CVETNIC, S.; MADIC, J.; RUDAN, D. Prevalence of antibodies to IBR and BVD viruses in dairy cows with reproductive disorders. **Theriogenology**, Stoneham, v. 51, n. 5, p. 875-881, 1998.

BLENCOWE, B.J.; BAURÉN, G.; ELDRIDGE, A.G.; ISSNER, R.; NICKERSON, J.A.; ROSONINA, E.; SHARP, P.A. The SRm160/300 splicing coactivator subunits. **RNA**, New York, v. 6, n. 1, p. 111- 120, 2000.

BOLIN, S. R. The current understanding about the pathogenesis and clinical forms of BVD. **Veterinary Medicine**, Kansas City, v. 85, n. 10, p. 1123 - 1132, 1985.

BOLIN, S. R.; GROOMS, D. L. Origination and consequences of bovine viral diarrhea virus diversity. **Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, n. 1, p. 51-68, 2004.

BOROJEVIC, R. Terapias Celulares e Bioengenharia. **Gazeta Médica da Bahia**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 1, p. 42-46, 2008.

BOUTER, A.; CARMEILLE, R.; GOUNOU, C.; BOUVET, F.; DEGRELLE, S.A.; EVAINBRION, D.; BRISSON, A.R. Review: Annexin-A5 and cell membrane repair, **Placenta**, London, Suppl 1:S43-9, 2015.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v.72, p. 248-254, 1976.

BRETAS, R. M. **Avaliação da capacidade instalada para a produção e certificação de células animais**. 2011. 170 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos) - Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011.

BROCK, K.V.; REDMAN D.R.; VICKERS, M.L.; IRVINE, N.E. Quantitation of bovine viral diarrhea virus in embryo transfer flush fluids collected from a persistently infected heifer. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 3, p. 99-100, 1991.

BROCK, K.V. The persistence of bovine viral diarrhea virus. **Biologicals, journal of the International Association of Biological Standardization**, London, v. 31, n. 2, p. 133-135, 2003.

BROCK, K. V. The many faces of bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, n. 1, p. 1-3, 2004.

BROCK K. V.; GROOMS, D. L.; GIVENS, M. D. Reproductive Disease and Persistent Infections. In: GOYAL S. M.; RIDPATH J. F. **Bovine Viral Diarrhea Virus: diagnosis, management and control**. Oxford: Blackwell, 2005. p. 145-156.

BROCK KV, MCCARTY K, CHASE CCL, et al. Protection against Fetal Infection with Either Bovine Viral Diarrhea Virus Type 1 or Type 2 Using a Noncytopathic Type 1 Modified-Live Virus Vaccine. **Veterinary Therapeutics**, Trenton, v. 7, n. 1, p. 27-34, 2006.

BRUM, M.C.; WEIBLEN. Detecção, Identificação e Quantificação de Vírus In: FLORES, E.F (org.). **Virologia Veterinária**: Santa Maria: UFSM, p. 80, 2007.

BUTLER, M(Ed.). **Cell culture and upstream processing**. New York: Routledge, 2007. 250p.

BUTLER, M.; MENESES-ACOSTA, A. Recent advances in technology supporting biopharmaceutical production from mammalian cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 96, n. 4, p. 885-894, 2012.

CAMPBELL, J. R. Effect of bovine viral diarrhea virus in the feedlot. **Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, n. 1, p. 39-50, 2004.

CANÁRIO, R.; SIMÕES, J.; MONTEIRO, M. H. et al. **Diarreia viral bovina: uma afecção multifacetada**. Mirandela: Veterinaria.com.pt, 2009. v. 1.

Disponível em: http://www.veterinaria.com.pt/media/DIR_27001/VPC-I-2-e6.pdf.

Acesso em: 05 de fev. 2016.

CANDEIAS, J.A.N. **Laboratório de virologia: manual técnico**. São Paulo: EDUSP, 1996. 165 p.

CARBONARO, M. Proteomics: present and future in food quality evaluation. **Trends in Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 15, n. 3-4, p. 209-216, 2004.

CASH, P. Proteomics: the protein revolution. **Biologist**, London, v. 49, n. 2, p. 58-62, 2002.

CELIS, J. E; GROMOV, P.; ØSTERGAARD, M.; MADSEN, P.; HONORÉ, B. DEJGAARD, K.; OLSEN, E.; VORUM, H.; KRISTENSEN, D. B.; GROMOVA, I.; HAUNSØ, A.; VAN DAMME, J.; PUYPE, M.; VANDEKERCKHOVE, J.; HOLM RASMUSSEN, H. Human 2-DPAGE databases for proteome analysis in health and disease. **Federation of European Biochemical Societies**, Amsterdã, v. 398, n. 96, p. 129-134, 1996.

CHANG, H.R.; MUNKHJARGAL, A.; KIM, M.J.; PARK, S.Y.; JUNG, E.; RYU, J.H.; YANG, Y.; LIM, J.S.; KIM, Y. The functional roles of PML nuclear bodies in genome maintenance. **Mutation research**, Amsterdam, n. 17, p. 30040-4, 2017.

CHASE, C. C. L.; CHASE, S. K.; FAWCETT, L. Trends in the BVDV serological response in the Upper Midwest. **Biologicals, journal of the International Association of Biological Standardization**, London, v. 31, n. 2, p. 145-151, 2003.

CHASE, C. C. L.; ELMOWALID, G.; YOUSIF, A. A. A. The immune response to bovine viral diarrhea virus: a constantly changing picture. **Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, n. 1, p. 95-114, 2004.

CHAURAND, P.; SANDERS, M. E.; JENSEN, R. A.; CAPRIOLI, R. M. Proteomics in diagnostic pathology: Profiling and imaging proteins directly in tissue sections. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 165, n. 4, p. 1057–1068, 2004.

CHIKE, F. OGUEJIOFOR; ZHANGRUI, CHENG; AYIMUGULI, ABUDUREYIMU; OLIVIA, L. ANSTAETT; JOE, BROWNLIE; ALI, A., FOULADI-NASHTA; D. CLAIRE, WATHES. Global Transcriptomic Profiling of Bovine Endometrial Immune Response *In Vitro*. II. Effect of Bovine Viral Diarrhea Virus on the Endometrial Response to Lipopolysaccharide1. **Biology of reproduction**, Champaign, v. 93, n. 4, p. 1-16, 2015.

CHILDS, T.X. Disease in cattle. **Canadian Journal of Comparative of Medicine and Veterinary Science**, Gardenvale, v. 10, n. 12, p. 316–319, 1946.

CORREA W.V., NETO L.Z.; BARROS H.M. Nota clínico-patológica de uma enfermidade das mucosas em São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 141-151, 1968.

CORREA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. **Enfermidades Infeciosas dos Mamíferos Domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Médica e Científica, 1992. 539-547 p.

DALL, E.; BRANDSTETTER, H. Structure and function of legumain in health and disease. **Biochimie**, Paris, v.122, p. 126-150, 2016.

COSTA, R.C.C.; MIGUEL, F.B.; ROSA, F.P. Estratégias de bioengenharia tecidual na reconstrução óssea. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 4, n. 1, p.70- 76, 2010.

CREANEY, J.; MA, .;S.; SNEDDON, S.A.; TOURIGNY, M.R.; DICK, I.M.; LEON, J.S.; KHONG, A.; FISHER, S.A.; LAKE, R.A.; LESTERHUIS, W.J.; NOWAK, A.K.; LEARY, S.; WATSON, M.W.; ROBINSON, B.W. Strong spontaneous tumor neoantigen responses induced by a natural human carcinogen. **Oncoimmunology**, Austin, v. 4, n. 7, 2015.

DENG, S. S.; XING, T. Y; ZHOU, G. Y.; XIONG, R. H.; LU, YG.; WEN, B.; LIU, S. Q.; YANG, HJ. Comparative proteome analysis of breast cancer and adjacent normal breast tissues in human. **Genomics, Proteomics Bioinformatics**, Beijing, v. 4, n. 3, p. 165-172, 2006.

DEREGT, D.; LOEWEN, K.G. Bovine viral diarrhea virus: biotypes and disease. **The Canadian Veterinary Journal**, Guelph, v. 36, n. 6, p. 371-378, 1995.

DEREGT, D. **Introduction and History**. In: GOYAL SM, RIDPATH JF. Bovine Viral Diarrhea Virus: diagnosis, management and control. Oxford, UK: Blackwell, 2005. p. 3-33.

DE SOUSA, M. V.; FONTES, W.; RICART, C. A. Análise de Proteomas: o despertar da era pós-genômica. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 2, n. 7, p. 12-14. 2003.

DEGOLS, G.; ELDIN, P.;MECHTI, N. ISG20, an actor of the innate immune response. **Biochimie**, Paris, v.89, n. 6-7, p. 831-835, 2007

DIAS, F. C.; SAMARA, S. I. Detecção de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina no soro sanguíneo, no leite individual e no leite de conjunto em tanque de expansão de rebanhos não vacinados. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 161-168, 2003.

DIAS, F. C. **Diarreia Viral Bovina (BVD): aspectos epidemiológicos da infecção persistente, avaliação sorológica da resposta imune e caracterização molecular do vírus**. 2008. 157 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

DI CIERO, L.; BELLATO, C. M. PROTEOMA: Avanços Recentes em Técnicas de Eletroforese Bidimensional e Espectrometria de Massas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 29, p. 158-164. 2003.

DONATE, J.; MAZZUCHELLI, F. Actualización em diarrea vírica bovina. **Medicina Veterinária**, Kansas City, v. 12, n. 9, p. 486-500, 1995.

DONIS, R. Bovine viral diarrhea: the unraveling of a complex of clinical presentations. **Bovine Proceedings**, Ithaca, v. 20, p. 16-22, 1989.

DONOVAN, J. ; DUFNER, M.; KORENNYKH, A. Structural basis for cytosolic double-stranded RNA surveillance by human oligoadenylate synthetase 1. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 29, n. 5, p. 1652-1657, 2013.

DUBOVI, EJ. Impact of bovine viral diarrhea virus on reproductive performance in cattle. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 10, n. 3, p. 503-514, 1994.

DUBOVI, E.J. Laboratory Diagnosis of Bovine Viral Diarrhea virus. **Biologicals, journal of the International Association of Biological Standardization**, London, v. 41, n. 1, p. 8-13, 2013.

DULBECCO R, VOGT M. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 99, n. 2, p. 167-182, 1954.

DURHAM, P. J. K.; HASSARD, L. E. Prevalence of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza 3, bovine respiratory syncytial, and bovine viral diarrhea viruses in cattle in Saskatchewan and Alberta. **The Canadian Veterinary Journal**, Guelph, v. 31, n. 12, p. 815-820, 1990.

EDWARDS, S.; WOOD, L.; BROCKMAN, S. et al. Clinical and virological observations of a mucosal disease outbreak with persistently-infected seropositive survivors. In: LIESS, B.; MOENNIG, V.; POHLENZ, J. et al. (Eds.). **Ruminant Pestivirus Infections: virology, pathogenesis and perspectives of profilaxis**. Wien: Springer-Verlag, 1991. p. 125-132.

ELLIS, J. A.; MARTIN, K.; NORMAN, G. R.; HAINES, D. M. Comparison of detection methods for bovine viral diarrhoea virus in bovine abortions and neonatal death. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 7, n. 4, p. 433-443, 1995.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2015. Disponível em: <https://www.embrapa.br/> Acesso em: 20 de jun. 2015.

ESPERT, L.; DEGOLS, G.; GONGORA, C.; BLONDEL, D.; WILLIAMS, B.R.; SILVERMAN, R.H. , MECHTI, N. ISG20, a new interferon-induced RNase specific for single-stranded RNA, defines an alternative antiviral pathway against RNA genomic viruses. **The Journal of biological chemistry**, Rockville, Maryland, v. 278, n. 18, p. 16151-8, 2003.

ESPERT, L.; DEGOLS, G.; LIN, Y.L.; VINCENT, T.; BENKIRANE, M.; MECHTI, N. Interferon-induced exonuclease ISG20 exhibits an antiviral activity against human immunodeficiency virus type 1. **The Journal of general virology**, London, v. 86, n.8, p. 2221-9, 2005.

EVANS, M.; Kaufman, M. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, London, v. 292, n. 5819, p. 154-156, 1981.

EVERMANN, J. F. Pestiviral infection of llamas and alpacas. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 61, n. 2-3, p. 201-206, 2006.

EVERMANN, J.F.; BARRINGTON, G. Clinical features. In: GOYAL S.M., RIDPATH J.F. **Bovine Viral Diarrhoea Virus: diagnosis, management and control**. Oxford, UK: Blackwell, 2005. p. 105-119.

Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016. Disponível em: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=IT1999060067>. Acesso em: 10 mai. 2016.

FAUQUET C. M.; MAYO M. A.; MANILOFF J. et al. 2005. **Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses**. 8th Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Amsterdam: Elsevier, 2005. 1162 p.

FENSTERL, V.; SEN, G. C. Interferon-induced Ifit proteins: their role in viral pathogenesis. **Journal of virology**, Baltimore, v. 89, n. 5, p. 2462-2468, 2015.

FLORES, E.F.; GIL, L.H.V.; BOTTON, S.A.; WEIBLEN, R.; RIDPATH, J.L.; KREUTZ, L.C.; PILATI, C.; DRIEMEIER, D.; MOOJEN, V.; WENDELSTEINA, C. Clinical, pathological and antigenic aspects of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) type 2 isolates identified in Brazil. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.77 p. 175-183, 2000.

FLORES E. F.; WEIBLEN R.; SCHERER C. F. C. et al. Identificação do vírus da diarreia viral bovina tipo 2 (BVDV-2) no Sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 2, p. 85-89, 2000.

FLORES, E.F. Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV). **O Biológico**, São Paulo, v.65, n. 1-2, p. 3-9, 2003.

FLORES, E. F.; RIDPATH, J. F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F. S. F.; GIL, L. H. V. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhea virus type 2 (BVDV-2) isolates: Evidence for a subgenotype within BVDV-2. **Virus Research**, Amsterdam, v.87, p.51- 60, 2003.

FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F.S.F.; ROEHE, P.M.; ALFIERI, A.A.; PITUCO, E.M. A infecção pelo vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) no Brasil: histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.25. n.3, p.125-134, 2005.

FLORES, E.F. Patogenia das infecções víricas. In: **Virologia Veterinária**: Santa Maria: UFSM. 2007. cap. 8, p.191-235.

FRANCKI, R.; FAUQUET, C.; KNUDSON, D. et al. Classification and nomenclature of viruses. Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Archives of Virology**, Wien, v.2, Supl.2, p.223-427, 1991.

FRAY, M.D.; PATON, D.J.; ALENIUS, S. The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60-61: p.615-627, 2000.

FREDRIKSEN, B.; SANDVIK, T.; LOKEN, T.; ODEGAARD, S. A. Level and duration of serum antibodies in cattle infected experimentally and naturally with bovine virus diarrhoea virus. **Veterinary Record**, London, v. 144, n. 5, p. 111-114, 1999.

FREDERICKSEN, F.; CARRASCO, G.; VILLALBA, M.; OLAVARRÍA, VH. Cytopathic BVDV-1 strain induces immune marker production in bovine cells through the NF- κ B signaling pathway. **Molecular Immunology**, Oxford, Elmsford, v. 68, p. 213-222, 2015.

FREITAS, T. R. P.; CALDAS, L. A.; ESPÍRITOS SANTOS, M. P. **Conceitos básicos, métodos e técnicas em laboratório de virologia animal**. Pedro Leopoldo: Tavares, 2006. 176p.

FRESHNEY, I. **Culture of Animal Cells**: A manual of basic technique and specialized applications, 7 ed. New Jersey, Wiley-Blackwell, 2016, 728p.

FULTON, R.W.; BURGE, L.J. Bovine viral diarrhea types 1 and 2 antibody response in calves receiving modified live virus or inactivated vaccines. **Vaccine**, Guildford, Surrey, UK v.19,n. 2-3, p.264-274, 2000.

FULTON, R. W.; RIDPATH, J. F.; SALIKI, J. T.; BRIGGS, R. E.; CONFER, A. W.; BURGE, L. J., PURDY, C. W.; LOAN, R. W.; DUFF, G. C.; PAYTON, M. E. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) 1b: predominant BVDV subtype in calves with respiratory disease. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 66, n. 3, p. 181-190, 2002.

FULTON, R. W.; HESSMAN, B.; JOHNSON, B. J., et al. Evaluation of diagnostic tests used for detection of bovine viral diarrhoea virus and prevalence of subtypes 1a, 1b, and 2a in persistently infected cattle entering a feedlot. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 228, n. 4, p. 578-584, 2006.

FUMAGALLI, F.; NOACK, J.; BERGMANN, T.J.; CEBOLLERO, E.; PISONI, G.B.; FASANA, E.; FREGNO, I.; GALLI, C.; LOI, M.; SOLDÀ, T.; D'ANTUONO, R.; RAIMONDI, A.; JUNG, M.; MELNYK, A.; SCHORR, S.; SCHREIBER, A.; SIMONELLI, L.; VARANI, L.; WILSON-ZBINDEN, C.; ZERBE, O.; HOFMANN, K.; PETER, M.; QUADRONI, M.; ZIMMERMANN, R.; MOLINARI, M. Translocon component Sec62 acts in endoplasmic reticulum turnover during stress recovery. **Nature cell biology**, London, v. 18, n. 11, p. 1173-1184, 2016.

GALDOS, A. C. R. **Análise proteômica do saco vitelino de bovinos**. 2009. 110f. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

GOENS, S.D. The evolution of bovine viral diarrhoea: a review. **The Canadian Veterinary Journal**, Guelph, v. 43, n. 12, p. 946-954, 2002.

GONDIM A. C. L. O. **Diarréia Viral Bovina**. 2006. 56 f. Monografia (Pós-Graduação "Latu Sensu" em Produção e Reprodução de Bovinos) - Universidade Castelo Branco, Brasília, 2006.

GONZÁLEZ-BUITRAGO, J. M. Multiplexed testing in autoimmunity laboratory, **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, Espanha, v. 44, n. 10, p. 1169-1174, 2006.

GONZÁLEZ-BUITRAGO, J. M., FERREIRA, L.; LORENZO, I. Urinary proteomics, **Clinica Chimica Acta; international journal of clinical chemistry**, Amsterdam, v. 375, n. 1-2, p. 49-56, 2007.

GONZÁLEZ-BUITRAGO, J. M., Proteômica clínica. Barcelona: **SEQC**, 2007. 368 p.

GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Classification and molecular biology**. In: GOYAL, S.M., RIDPATH, J.F., Bovine viral diarrhoea virus. Bovine Viral Diarrhoea Virus: diagnosis, management and control. Ames, IA: Blackwell, 2005. p. 65 -80.

GRANDVAUX, N.; TENOEVEER, B.R.; SERVANT, M.J.; HISCOTT, J. The interferon antiviral response: from viral invasion to evasion. **Current opinion in infectious diseases**, London, v. 15, n. 3, p. 259-267, 2002.

GREISER-WILKE, I.; GRUMMER, B.; MOENING, V. Bovine viral diarrhoea eradication and control programmes in Europe. **Biologicals, journal of the International Association of Biological Standardization**, London, v. 31, n. 2, p. 113-118, 2003.

GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M. **Introdução à genética**. 7. ed. New York: Guanabara Koogan, 2002.

GROOMS, D.L., BAKER, J.C.; AMES, T.R. **Doenças causadas pelo vírus da diarreia viral bovina**. In: Smith BP. Medicina Interna de Grandes Animais. 3. ed. São Paulo: Manole, 2006. p. 707-714.

GROSS, B.A. BioMEMs. Conference Proceedings. Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Piscataway, v. 7, p. 5129, 2004.

GUO, L.; LUO, X. ; LI, R.; LI, R.; XU, Y.; ZHANG, J.; GE, J.; BU, Z.; FENG, L.; WANG, Y. Porcine Epidemic Diarrhea Virus Infection Inhibits Interferon Signaling by Targeted Degradation of STAT1, **Journal of virology**, Baltimore, v. 90, n. 18, p.8281–8292, 2016.

GYGI, S. P.; RIST, B.; GERBER, S. A.; TURECEK, F.; GELB, M. H.; AEBERSOLD, R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. **Nature biotechnology**, New York, v. 17, n. 10, p. 994-999, 1999.

HAY, R.; CAPUTO, J.; CEHN, T.R.; et al. **ATCC Cell Lines and Hybridomas**. 8. ed. Maryland: ATCC, 1994. 640 p.

HARRISON, R.G.; GREENMAN, M.J.; MALL, F. P.; JACKSON, C.M. **Observations on the living developing nerve fiber**. New York: The Anatomical Record, 1907, 116 – 128p.

HELBIG, K.J.; BEARD, M.R. The role of viperin in the innate antiviral response. **Journal of molecular biology**, Amsterdam, v. 426, n. 6, p. 1210-9, 2014.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 360-361 p.

HOCHRAINER, K.; MAYER, H.; BARANYI, U.; BINDER, B.; LIPP, J.; KROISMAYR, R. The human HERC family of ubiquitin ligases: novel members, genomic organization, expression profiling, and evolutionary aspects. **Genomics**, San Diego, v. 85, n. 2, p. :153-164, 2005.

HORZINEK, M.C. *Pestivirus* taxonomic perspectives. **Archives of Virology**, Wien, v. 3, Supl. 3, p. 1-5, 1991.

HORZINEK, M.C. Pestiviruses: taxonomic perspectives. In: LIESS, B.; MOENNIG, V.; POHLENZ, J. et al. (Eds.). **Ruminant Pestivirus Infections**. Wien: Springer, 1991. 271 p.

HOUE, H. Epidemiology of bovine viral diarrhea virus. **The Veterinary Clinics of North América. Food Animal Practice**, Philadelphia , v. 11, n. 3, p. 521-547, 1995.

HOUE, H. Epidemiological features and economical importance of bovine viral diarrhea virus (BVDV) infections. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 64, n. 2-3, p. 89-107, 1999.

HOUE, H. Economic impact of BVD infection in dairies. **Biologicals, journal of the International Association of Biological Standardization**, London, v. 31, n. 2, p. 137-143, 2003.

International Committee on Taxonomy on Viruses, 2015. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Acesso em: 29 jun. 2017.

ISFOR, R. J. Proteomics analysis of striated muscle. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, **Amsterdam**, v. 771, p. 155-165, 2002.

ISSAQ, H. J.; CONRADS, T. P.; PRIETO, D. A. et al. SELDITOF MS for diagnostic proteomics. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 75, n. 7, p. 148-155, 2003.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Produção da Pecuária Municipal, 2017. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/>. Acesso em: 22 de fev. 2017.

JAPANESE COLLECTION OF RESEARCH BIORESOURCES CELL BANK. Ibaraki, 2012. Disponível em: <http://cellbank.nibiohn.go.jp/english/>. Acesso em: 5 jun. 2016.

JUNIOR, T.S.R.J; MELO,W.O; ELIAS, A.K.S; RODRIGUES, L.S; PENTEADO ,L; BARUSELLI, P.S. Considerações técnicas e econômicas sobre reprodução assistida em gado de corte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.33, n.1, p. 53-58, 2009.

KAHN, C.M. **Manual Merck de Veterinaria**. 6. ed. Barcelona: Océano, 2007. 215-218 p.

KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10.000 daltons. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 60, n. 20, p. 2299–301, 1988.

KATZ-JAFFE, M.G.; MCREYNOLDS, S.; GARDNER, D.K.; SCHOOLCRAFT, W.B. The role of proteomics in defining the human embryonic secretome. **Molecular Human Reproduction**, Berlin, v. 15, n. 5, p. 271-277, 2009.

KEATOR, C.S.; MAH, K.; SLAYDEN, O.D. Alterations in progesterone receptor membrane component 2 (PGRMC2) in the endometrium of macaques afflicted with advanced endometriosis. **Molecular human reproduction**, Oxford, v. 18, n. 6, p. 308-319, 2012.

KEELING, C. L. Planning bovine viral diarrhea virus vaccination programs. **Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 91, n. 9, p. 873-877, 1996.

KELLING, C. L. Evolution of bovine viral diarrhea virus vaccines. **Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, n. 1, p. 115-129, 2004.

KESHISHIAN, H. Ross Harrison's "The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement". **Journal of Experimental Zoology Part A: comparative experimental biology**, Hoboken, New Jersey, v.301, n.3, p. 201-203, 2004.

KRAMPS, J. A.; MAANEN, C. V.; WETERING, G. V.; STIENSTRA, G.; QUAK, S.; BRINKHOF, J.; RONSHOLT, L.; NYLIN, B. A simple, rapid and reliable enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) specific antibodies in cattle serum, plasma and bulk milk. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 64, n. 2-3, p. 135-144, 1999.

KÜHNER, S.; VAN NOORT, V.; BETTS, M.J. Proteome organization in a genome reduced bacterium. **Science**, New York, v. 326, n. 5957, p. 1235-1240, 2009.

KUSSMANN M, RAYMOND F, AFFOLTER M. OMICS: driven biomarker discovery in nutrition and health. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 124, n. 4, p. 758-787, 2006.

LARSEN, W.J. **Human Embriology**. 2. ed. [S.l.]: Churchill Lurngstone, 1997. 512 p.

LARSON, B. L. Diagnosing the cause of bovine abortions and other perinatal deaths. **Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 91, n. 4-6, p. 478-486, 1996.

LARSON, R. L.; MILLER, R. B.; KLEIBOEKER, S. B.; MILLER, M. A.; WHITE, B. J. Economic costs associated with two testing strategies for screening feeder calves for persistent infection with bovine viral diarrhea virus. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 226, n. 2, p. 249-254, 2005.

LAUDE, H. Nonarbo-togaviridae: comparative hydrodynamic properties of the pestivirus genus. Brief report. **Archives of Virology**, Wien, New York, v. 62, n. 4, p. 347-352, 1979.

LEIBNIZ-INSTITUT,DSMZ-EUTSCHE,SAMMLUNG,VON,MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GMBH. Braunschweig, 2012.

Disponível em: <https://www.dsmz.de/services/services-human-and-animal-cell-lines.html>. Acesso em: 5 jun. 2016.

LETELLIER, C.; DE. MEULEMEESTER, B.; LOMBA, M.; MIJTEN, E.; KERKHOFS, P. Detection of BVDV persistently infected animals in Belgium: Evaluation of the strategy Implemented. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v.72, n. 1-2, p. 121-125, 2005.

LEONG, CR.; FUNAMI, K.; OSHIUMI, H.; MENGAO, D.; TAKAKI, H.; MATSUMOTO, M.; ALY, HH.; WATASHI, K.; CHAYAMA, K.; SEYA, T. Interferon-stimulated gene of 20kDa protein (ISG20) degrades RNA of hepatitis B virus to impede the replication of HBV *in vitro* and *in vivo*. **Oncotarget**, Albany, N.Y., v.18, n.42, 2016.

LIBERTMANN, H. Infecções por *Pestivirus*: diarréia viral/doença das mucosas dos bovinos. In: BEER, J. **Doenças infecciosas em animais domésticos**. São Paulo: Roca, 1988. 89-93 p.

LIEBLER-TENORIO, E. M. Pathogenesis. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine viral diarrhea virus**. Iowa: Blackwell, 2005. p. 121-143.

LIN, S.J.; WU, S.W.; CHOU, Y.C.; LIN, J.H.; HUANG, Y.C.; CHEN, M.R.; MA, N.; TSAI, C.H. Novel expression and regulation of TIMP-1 in Epstein Barr virus-infected cells and its impact on cell survival. **Virology**, Vienna, v. 481, p. 24-33, 2015.

LINDBERG, A.; BROWNLIE, J.; GUNN, G.J.; HOUE, H.; MOENNIG, V.; SAATKAMP, H.W.; SANDVIK, T.; VALLE, P.S. The control of bovine viral diarrhoea virus in Europe: today and in the future. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, Paris , v. 25, n. 3, p. 961-979, 2006.

LIU, Y.; NIE, H.; MAO, R.; MITRA, B.; CAI, D.; YAN, R.; GUO, J.T.; BLOCK, T.M.; MECHTI, N.; GUO, H. Interferon-inducible ribonuclease ISG20 inhibits hepatitis B virus replication through directly binding to the epsilon stem-loop structure of viral RNA. **PLoS pathogens**, San Francisco, v. 13, n. 4, 2017.

LÓPEZ, J.; MARINA A.; VÁZQUEZ J. et al. A proteomic approach to the study of the marine mussels *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. **Marine Biology**, Heidelberg, v. 141, n. 2, p.217-223, 2002.

MADIN, S.H.; DARBY, N.B. Jr. Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine**, New York. v. 98, n. 3, p. 574-576, 1958.

MALMQUIST, W.A. Bovine viral diarrhoea mucosal disease: Etiology, pathogenesis, and applied immunity. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 152, n. 6, p. 763–768, 1968.

MARQUES, D. C. **Criação de Bovinos**. 7. ed. Belo Horizonte: Consultoria Veterinária e Publicações, 2003. 479 p.

MARS, M. H.; BRUSCHKE, C. J. M.; OIRSCHOT, J. T. Airborne transmission of BHV-1, BRSV and BVDV among cattle is possible under experimental conditions. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 66, n. 3, p. 197-207, 1999.

MCDONALD, A.; FOGARTY, S.; LECLERC, I.; HILL, E.V.; HARDIE, G.; RUTTER, G.A. Cell-wide analysis of secretory granule dynamics in three dimensions in living pancreatic beta-cells: evidence against a role for AMPK-dependent phosphorylation of KLC1 at Ser517/Ser520 in glucose-stimulated insulin granule movement. **Biochemical society transactions**, London, v. 38, n. 1, p. 205-208, 2010.

MIGITA, N. A. **Cultivo celular in vitro: importância para a pesquisa biomédica e dimensão da problemática de autenticação de linhagens celulares**. 2010. 58 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biomédicas) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

MOEN, A. D.; SOL, J. A. N.; SAMPIMON, O. T. L. I. S. Indication of transmission of BVDV in the absence of persistently infected (PI) animals. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 72, n. 1-2, p. 93-98, 2005.

MOENNIG, V.; PLAGEMANN, P.G.W. The pestiviruses. **Advances Virus Research**, New York, v.41, p. 53-98, 1992.

MOERMAN, A.; STRAVER, P. J.; JONG, M. C. M.; QUAK, J.; BAANVINGER, T.; VAN OIRSCHOT, J. T. A long term epidemiological study of bovine viral diarrhoea infections in a large herd of dairy cattle. **The Veterinary Record**, London, v. 132, n. 25, p. 622- 626, 1993.

MOORE, G. E.; MINOWADA, J. Historical progress and the future of human cell culture research, **Human Cell**, Tokyo, v. 5, n. 4, p. 313–333, 1992.

MOURA, A.A.; KOC, H.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Protein sof the cauda epididymal fluid as sociated with fertility of mature dairy bulls. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v.27, p.534-541, 2006.

MOURA, A.A.; SOUZA, C.E.; STANLEY, B.A.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holsteinbulls. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v.73, n.10, p.2006-2020, 2010.

MUVAVARIRWA, P.; MUDENGE, D.; MOYO, D.; JAVANGWE, S. Detection of bovine virus diarrhoea virus antibodies in cattle with an enzyme-linked immunosorbent assay. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, Pretoria, v. 62, n. 4, p. 241-244, 1995.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger. **Princípios de Bioquímica**. 3 ed. New York: WH Freeman and Company, 2002. 117 p.

NESATY, V.J.; SUTER, M.J.F. Analysis of environmental stress response on the proteome level. **Mass spectrometry reviews**, New York, v.27, n. 6, p.556-574, 2008.

NETTLETON, P. F.; ENTRICAN, G. Ruminant pestiviruses - Review. **British Veterinary Journal**, London, v. 151, n. 6, p. 615-642, 1995.

NEUBAUER, G.; KING, A.; RAPPSILBER, J.; CALVIO C.; WATSON, M.; AJUH P.; SLEEMAN, J.; LAMOND, A.; MANN, M. Mass spectrometry and ST database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex. **Nature Genetics**, New York, v. 20, n. 1, p. 46–50, 1998.

NICACIO, A. C. Demandas tecnológicas dos sistemas de produção de bovinos de corte no Brasil: reprodução animal. **Documentos**, Campo Grande, n. 220, p. 1-22, 2016.

O'FARRELL, P. H. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Protein. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, Maryland, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.

OLAFSON, P.; MACCALLUM, A. D.; FOX, F. H. An apparently new transmissible disease of cattle. **The Cornell Veterinarian**, Ithaca, v. 36, p. 205 - 213, 1946.

OLIVEIRA, A. L. R. **Análise da eficiência e do custo-benefício da RT-PCR em tempo real no diagnóstico da diarreia viral bovina**. 2013. 115f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo, 2013.

PAISLEY, L. G.; WELLS, S.; SCHMITT, B. J. Prevalence of bovine viral diarrhea antibodies in 256 U.S. Cow-calf operations: A survey. **Theriogenology**, Stoneham, v. 46, n. 8, p. 1313-1323, 1996.

PELLERIN, C.; VAN DEN HURK, J.; LECOMTE, J.; TUSSEN, P. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. **Virology**, Vienna, v. 203, n. 2, p. 260-267, 1994.

PENNINGTON, S.R.; DUNN, M.J. **Proteomics: from protein sequence to function.** New Delhi: Viva Books, 2001. 297 p.

PERDRIZET, J. A. **Diarréia viral bovina: moléstia das mucosas.** In: SMITH, B. P. Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais. São Paulo: Manole, 1993. 734-740 p.

PERLER, L.; SCHWEIZER, M.; JUNGI, T.W.; PETERHANS, E. Bovine viral diarrhoea virus and bovine herpesvirus-1 prime uninfected macrophages for lipopolysaccharide-triggered apoptosis by interferon-dependent and independent pathways. **The journal of general virology**, London, v. 81, n. 4, p. 881-887, 2000.

PETERHANS, E.; SCHWEIZER, M. BVDV: a pestivirus inducing tolerance of the innate immune response, **Biologicals, journal of the International Association of Biological Standardization**, London, v. 41, n. 1, p. :39-51, 2013.

PILLARS, R. B.; GROOMS, D. L. Serologic evaluation of five unvaccinated heifers to detect herds that have cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 63, n. 4, p. 506-512, 2002.

PITUCO, E. M.; DEL FAVA, C.; OKUDA, L. H.; STEFANO, E.; BILINSKYJ, M. C. V.; SAMARA, S. I. Prevalência da infecção pelo vírus da diarréia bovina à vírus (BVD) em búfalos (*Bubalus bubalis*) no Vale do Ribeira, SP, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.64, p. 23-28, 1997.

PITUCO, E.M.; DEL FAVA, C. Situação do BVDV na América do Sul. In: Simpósio Internacional sobre Herpesvírus bovino (Tipo 1 e 5) e vírus da diarréia viral bovina (BVDV), 1998, Santa Maria, **Anais...** Santa Maria: UFSM, 1998. p. 49-57.

PLANT, J.W.; LITTLEJOHNS, I.E.; GARDINER, A.C.; VANTSIS, J.T.; HUCK, R.A. Immunological relationship between border disease, mucosal disease and swine fever. **The Veterinary Record**, London, v. 92, n. 17, p. 455, 1973.

POTGIETER, L. N. D. Bovine respiratory tract disease caused by bovine viral diarrhoea virus. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 13, n. 3, p. 471-481, 1997.

POTTER, M.L.; CORSTVET, R.E.; LOONEY, C.R.; FULTON, R.W.; ARCHBALD, L.F.; GODKE, R.A. Evaluation of bovine viral diarrhoea virus uptake by preimplantation embryos. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 45, p.1778-80, 1984.

POWER, D.; SANTOSO, N.; DIERINGER, M.; YU, J.; HUANG, H.; SIMPSON, S.; SETH; MIAO, H.; ZHU, J. IFI44 suppresses HIV-1 LTR promoter activity and facilitates its latency. **Virology**, Vienna, v. 481, p. 142-150, 2015.

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.** 117f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2005.

RABILLOUD, T. Two dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, fashioned, but still climbs up the mountains. **Proteomics**, Weinheim, v. 2, n. 1, p. 3-10, 2002.

RADOSTITS O. M.; GAY C. C.; BLOOD D. C. et al. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos.** 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1170 p.

RADOSTITIS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W. ; CONSTABLE, P. **Veterinary Medicine: a text book of the diseases of cathe, horses, sheep, pigs and goats.** 10. Ed. Amsterdam: Elsevier, 2007.

RAMSEY, F.; CHIVERS, W. Mucosal disease of cattle. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 34, p. 629-633, 1953.

REBELLO, M. A. **Fundamentos da Cultura de Cultura de Tecido e das células Animais.** Rio de Janeiro: Rubio, 2014. 208 p.

REGO, J.P.A. et al. Seminal plasma proteome of electroejaculated *Bos indicus* bulls. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.148, p.1-17, 2014.

REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method os estimating fifty per cent edpoints. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v.27,N.3, p. 493- 497, 1938.

RIBEIRO, J.N; PEREIRA, A. Aspectos da epidemiologia da infecção e persistência do vírus da diarreia viral bovina em explorações de bovinos leiteiros. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 99, N. 549, p. 41-51, 2004.

RIDPATH, J. F.; BOLIN, S. R. Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 12, n. 2, p. 101-106, 1998.

RIDPATH, J. F. Classification and molecular biology. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine viral diarrhea virus: diagnosis, management and control.** 1a ed. Iowa: Blackwell Publishing Professional, 2005. 65-80 p.

RIDPATH, J.F.; FLORES, E.F. Flaviviridae. In: FLORES, E.F (org.). **Virologia Veterinária: virologia geral e doenças virilicas.** Santa Maria: UFSM, 2007. p. 564-591.

RIDPATH, J.F. Bovine Viral Diarrhea Virus: global status. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 26, n. 1, p. 105-121, 2010.

RIDPATH, J.F.; FULTON, R.W.; KIRKLAND, P.D. Prevalence and antigenic differences observed between bovine viral diarrhea virus subgenotypes isolated from cattle in Australia and feedlots in the southwestern United States. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v.22, p.184-191, 2010.

RIKEN BIORESOURCE CENTER. Cell line validation testing. Ibaraki, 2012. Disponível em: <http://cell.brc.riken.jp/en/inspection>. Acesso em: 5 abril. 2016.

ROCHA, T. L. Eletroforese bidimensional e análise de proteomas. **Comunicado Técnico**, Brasília, n. 136, p. 1-12, 2005.

ROCHA R. **O direito à vida e a pesquisa com células tronco**: limites éticos e jurídicos. Rio de Janeiro: Campus jurídico, 2008. 141 p.

RODRIGUEZ, C.I.; STEWART, C.L. Disruption of the ubiquitin ligase HERC4 causes defects in spermatozoon maturation and impaired fertility. **Developmental biology**, New York, v. 312, n. 2, p. 501-508, 2007.

ROUT, M. P.; AITCHISON, J.D.; SUPRAPTO, A.; HJERTAAS, K.; ZHAO, Y.; CHAIT, B. T. The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 148, n. 4, p. 635–651, 2000.

SALIKI, J. T.; DUBOVI, E. J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, Philadelphia, v. 20, n. 1, p. 69-83, 2004.

SALVATO F.; CARVALHO, M. C. C. G. Métodos e estratégias em proteômica e suas aplicações na área vegetal. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 3, p. 727-734.

SANDVIK, T. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 64, n. 2-3, p. 123-134, 1999.

SANDVIK, T. Progress of control and prevention programs for bovine viral diarrhea virus in Europe. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, Philadelphia, v.20, n. 1, p.151-169, 2004.

SANTOS, P. M.; TEIXEIRA, M. C.; CORREIA, I. S. A análise proteômica quantitativa na revelação de mecanismos de resposta a stresse químico em microorganismos. **Boletim de Biotecnologia**, Lisboa, n. 77, p. 7-17, 2004.

SCHMITT, E.; GEHRMANN, M.; BRUNET, M.; MULTHOFF, G.; GARRIDO, C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. **Journal of leukocyte biology**, New York, v. 81, n. 1, p.15-27, 2007.

SCHOGGINS, J.W.; WILSON, S.J.; PANIS, M.; MURPHY, M.Y.; JONES, C.T.; BIENIASZ, P.; RICE, C.M. A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. **Nature**, London, v. 472, n. 7344, p. 481-485, 2011.

SCHUCH, L.F.D. Diarreia Viral Bovina. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C.; LEMOS, R.A.A. (org.). **Doenças de ruminantes e equinos**. São Paulo: Varela Editora e Livraria, v. 1, p.64-71, 2006.

SEKI, Y.; SEIMIYIA, Y. N.; YAEGASHI, G.; SATO, C. Identification of herds with cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus by virological evaluation of three calves. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 68, n. 3, p. 255-258, 2006.

SILVA, L.C. Evaluation of the humoral and cell mediated immune response of calves vaccinated with inactivated bovine virus diarrhoea virus using the association of DDA chloride/aluminum hydroxide as adjuvant. **Vírus Reviews and Research**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 1, p. 147, 2000.

SILVERMAN, RH. Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. **Journal of virology**, Baltimore, v. 81, n. 23, p. 12720-9, 2007.

SINGH, E.; EAGLESOME, M.; THOMAS, F.; PAPP-AVIDD, G.; HARE, W. Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections I. The *in vitro* exposure of preimplantation embryos to akabane virus, blue tongue virus, and bovine viral diarrhoea virus. **Theriogenology**, Stoneham, v. 17, p.437-444, 1982.

SMITH, R.L.; SANDERSON, M.W.; RENTER, D.G.; LARSON, R.L.; WHITE, B.J. A stochastic model to assess the risk of introduction of bovine viral diarrhoea virus to beef cow-calf herds. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v.88, n. 2, p.101-108, 2009.

STEPHENS, N. J. K.; et al. **Virologia**. Amsterdam: Elsevier, 2014. 125 - 220p.

TAKAHASI, K.; YONEYAMA, M.; NISHIHORI, T.; HIRAI, R.; KUMETA, H.; NARITA, R.; GALE, M. JR.; INAGAKI, F.; FUJITA, T. Non-self RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses. **Molecular cell**, Cambridge, v.29, n. 4, p. 428-440, 2008.

TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Bovine herpesvirus type 1 abortions detected by a semi nested-PCR in Brazilian cattle herds. **Research in Veterinary Science**, London, v.79, n.1, p 85-88, 2005.

TALAFHA, A.Q.; HIRCHE, S.M.; ABABNEH, M.M.; AL-MAJALI, A.M.; ABABNEH, M.M. Prevalence and risk factors associated with bovine viral diarrhoea virus infection in dairy herds in Jordan. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 41, n. 9, p. 858 - 866, 2009.

TAVARES, C. P. **Análise proteômica de proteínas de membrana de Mycoplasma hyopneumoniae e Mycoplasma synoviae**. 2010. 61 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2010.

THIELLEMENT, H.; ZIVY M.; PLOMION C. Combining proteomic and genetic studies in plants. **Chromatography B Analytical Technologies in Biomedical Life Sciences**. Amsterdam, v.782, n.1-2, p.137-149, 2002.

THURMOND, M. C. **Virus transmission**. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. Bovine viral diarrhoea virus. Iowa: Blackwell, 2005. p. 91-104.

TREMBLAY, R. Transmission of bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 91, n. 9, p. 858-866, 1996.

U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Washington, 2012. Disponível em: <https://www.usda.gov/>. Acesso em: 10 jan. 2017.

VAN TILBURG, M.F.; RODRIGUES, M.A.M.; MOREIRA, R.A.; MOREIRA, F.B.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O.; CANDIDO, M.J.D.; MOURA, A.A. Membrane associated proteins of ejaculated sperm from Morada Nova rams. **Theriogenology**, Stoneham, v.79, n.9, p.1247-1261, 2013.

VIDOR, T. Isolamento e identificação do vírus da Doença das Mucosas no Rio Grande do Sul. **Boletim do Instituto de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor**, Porto Alegre, v. 5, p. 51-58, 1974.

VILCEK, S.; DURKOVIC, B.; KOLESAROVA, M.; PATON, D. J. Genetic diversity of BVDV: consequences for classification and molecular epidemiology. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 72, n. 1-2, p. 31-35, 2005.

VIKESAA, J.; HANSEN, T.V.; JOENSON, L.; BORUP, R.; WEWER, U.M.; CHRISTIANSEN, J.; NIELSEN F.C. RNA-binding IMPs promote cell adhesion and invadopodia formation. **The EMBO journal**, Eynsham, v. 25, n. 7, p. 1456-1468, 2006.

VITOUR, D.; DOCEUL, V.; RUSCANU, S.; CHAUVEAU, E.; SCHWARTZ-CORNIL, I.; ZIENTARA, S. Induction and control of the type I interferon pathway by Blue-tongue virus. **Virus Research**, Amsterdam, v. 182, p. 59-70, 2014.

VOGEL, F.S.F.; SCHERER, C.F.C.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; LIMA, M.; KUNRATH, C.F. Resposta sorológica e avaliação de proteção fetal em ovelhas prenhas vacinadas contra o vírus da diarréia viral bovina (BVDV). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 5, p. 831-838, 2001.

WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. **Proteomics in Practice**: a laboratory manual of proteome analysis. Germany: Reiner Westermeier, Tom Naven, 2002. 329 p.

WILKINS, M. R.; PASQUALI, C.; APPEL, R. D.; OU, K.; GOLAZ, O.; SANCHEZ, J. C.; YAN, J. X.; GOOLEY, A. A.; HUGHES, E.; HUMPHERY-SMITH, I.; WILLIAMS, K. L.; HOCHSTRASSER, D. F. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Nature Biotechnology**, New York, v.14, n. 1, p. 61-65, 1996.

WILKINS, M. R.; WILLIAMS, K. L.; APPEL, R. D.; HOCHSTRASSER, D. F. **Proteome research**: new frontiers in functional genomics. Berlin: Springer-Verlag, 1997. 243 p.

WIZIGMANN, G.; VIDOR, T.; RICCI, Z.M.T. Investigações sorológicas sobre a ocorrência e incidência dos vírus PI-3, IBR e diarréia a vírus enfermidade das mucosas no Estado do Rio Grande do Sul. **Boletim do Instituto de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor**, Porto Alegre, v. 1, p. 52-58, 1971

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **OIE Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks.** [Technical Report]. Geneva, 2010. Disponível em: <http://www.who.int/biologicals/Cell_Substrates_clean_version_18_April.pdf>. Acesso em: 16 mar. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **OIE Listed diseases, infections and infestations in force in 2017.** [Technical Report]. Disponível em: <<http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2017/>> Acesso em: 16 jun. 2017.

ZHANG, Y.; BURKE, C.W.; RYMAN, K.D.; KLIMSTRA, W. B. Identification and characterization of interferon-induced proteins that inhibit alphavirus replication, **Journal of Virology**, Baltimore, v.81, n. 20, p.11246-55, 2007.

YONEYAMA, M.; FUJITA, T. RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. **Immunological reviews**, Copenhagen, v. 227, n. 1, p. 54-65, 2009.

YUAN, J.; ZHANG, Y.; YAN, F.T.; ZHENG, X. Association of PRKAA1 gene polymorphisms with chronic hepatitis B virus infection in Chinese Han population. **The Brazilian journal of the infectious diseases**, Salvador, v. 20, n. 6, p. 564-568, 2016.

ZHOU, Z.; WANG, N.; WOODSON, S.E.; DONG, Q.; WANG, J.; LIANG, Y.; RIJNBAND, R.; WEI, L.; NICHOLS, J.E.; GUO, J.T.; HOLBROOK, M.R.; LEMON, S.M.; LI, K. Antiviral activities of ISG20 in positive-strand RNA virus infections. **Virology**, Vienna, v.409, n. 2, p. 175-188, 2011.

ANEXO



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CETEA-IB

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 136/14** sobre o projeto: “**Perfil Metabólico após infecção por BVDV em células bovinas (oocitos, sêmen e células MDBK)**” sob a responsabilidade de **Eliana Scarcelli Pinheiro**, está de acordo com os princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA), pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA).

São Paulo, 03 de setembro de 2014


Ricardo Spacagna Jordão
Coordenador da CETEA-IB

CETEA - IB

Registro

Número : 136/14

Livro : 02

Folha : 36

Data: 03/09/14

Anexo 3 – Tabela de identificação de proteínas diferencialmente expressas de cultura de células MDBK infectadas com BVDV

Nome da Proteína	Acesso (NCBI)	Símbolo do Gene	Índice de variação Infectados vs. Controle	
			7 HAI	82 HAI
Radical S-adenosylmethioninedomain-containingprotein 2	gi 114052066	RSAD2	14,39	9,05
Interferon-stimulated gene 20 KDaprotein	gi 61829311	ISG20	10,40	14,08
Membrane-associatedprogesterone receptor componente 2-like	gi 149642895	PGRMC2	9,20	8,70
Aspartyl-tRNAsynthetase	gi 74267650	DARS	6,70	6,03
Interferon-inducedproteinwithtetratricopeptiderepeats 2	gi 297490728	IFIT2	6,35	7,43
Translocationprotein SEC62	gi 329663546	SEC62	5,62	5,02
Interferon-inducedproteinwithtetratricopeptiderepeats 3	gi 115495365	IFIT3	5,42	5,39
Acyl-proteinthioesterase 1-like	gi 77736321	LYPLA1	4,95	4,75
Interferon-induced GTP-binding proteinMx1	gi 27806841	MX1	4,58	9,03
Interferon-induced GTP-binding proteinMx2	gi 27806835	MX2	4,15	6,03
Interferon-inducedprotein 44	gi 982979231	IFI44	3,89	7,46
Ubiquitin-likeprotein ISG15	gi 27805955	ISG15	3,46	5,07
Interferon-inducedproteinwithtetratricopeptiderepeats 1	gi 19393038	IFIT1	3,25	7,63
Interferon-inducedhelicase C domain-containingprotein 1	gi 266490601	IFIH1	3,18	6,89
2'-5'-oligoadenylate synthase 1	gi 71067100	OAS1	3,02	4,01

Probable E3 ubiquitin-proteinligase HERC6	gi 84617510	HERC6	2,89	4,97
DNA ligase 1-like	gi 156523208	LIG1	2,82	3,90
Lamina-associated polypeptide 2	gi 146186841	TMPO	2,75	2,90
SCY1-like protein 2	gi 156523170	SCYL2	2,68	1,05
Serine/arginine repetitive matrix protein 2	gi 154757644	SRRM2	2,35	2,85
Dihydrolypoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex	gi 110331881	DLST	2,30	2,90
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX58	gi 741935052	DDX58	2,19	6,87
Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5	gi 115496688	IFIT5	2,01	2,18
Signal transducer and activator of transcription 1	gi 45385786	STAT1	2,08	3,26
Protein PML	gi 330417963	PML	2,08	2,6
Glypican-4	gi 1131299010	GPC4	2,07	2,04
Legumain	gi 83405800	LGMN	2,04	2,05
cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha	gi 27807057	PRKACA	2,03	2,08
Neutral cholesterol ester hydrolase 1-like	gi 174840744	NCEH1	1,97	2,01
2'-5'-oligoadenylate synthase 2	gi 66792906	OAS2	1,93	3,35
Heat shock protein beta-1	gi 71037405	HSP27	1,94	2,48
Metalloproteinase inhibitor 1	gi 27806161	TIMP1	1,92	2,01
Nuclear pore complex protein Nup 160	gi 157785627	NUP160	1,90	1,11
Exportin-5	gi 741900113	XPO5	1,87	2,12

Metaxin-1-like	gi 94967008	MTX1	1,80	1,76
Peroxisomal membrane anchor protein	gi 122692497	PEX14	1,76	1,99
Glycerol phosphate dehydrogenase	gi 151553979	GPD2	1,75	1,94
5'-AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha-1-like	gi 296475781	PRKAA1	1,73	1,89
Integrin alpha-5	gi 262073027	ITGA5	1,73	1,85
Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1	gi 77736277	AHSA1	1,71	1,19
ATPase Family AAA domain-containing protein 1	gi 329663402	ATAD1	1,70	1,22
Annexin A11	gi 27806221	ANXA11	1,67	2,04
Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase	gi 115495073	HMGCL	1,67	1,89
CD44 antigen	gi 291490675	CD44	1,67	1,61
SRA stem-loop-interacting RNA-binding protein	gi 81294255	SLRIP	1,68	2,03
Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	gi 777355779	IMPDH2	1,66	1,21
ATP synthase alpha subunit 1	gi 27807237	ATP5A1	1,64	1,97
Isocitrate dehydrogenase	gi 28461205	IDH2	1,62	1,25
Annexin A5	gi 120474983	ANXA5	1,62	1,49
Calnexin	gi 157279143	CANX	1,61	2,09
Cytochrome b-c1 complex subunit 2	gi 27807143	UQCRC2	1,60	1,96
Importin-4	gi 139947865	IPO4	1,58	2,59
E3 SUMO-protein ligase RanBP2 (Fragment)	gi 284813544	RANBP2	1,56	1,15
Importin-7	gi 300797613	IPO7	1,52	1,68
Nucleoporin p54	gi 115497096	NUP54	1,53	1,40

