

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Veterinária**  
**Programa de Pós-Graduação em Veterinária**



Dissertação

**Desenvolvimento e avaliação de uma vacina inativada, de aplicação intravaginal, contra o *Alphaherpesvirus bovino 5* (BoHV-5) em associação ao hidróxido de alumínio e aos polímeros mucoadesivos Polaxamer 407 e 2-Hidroxietilcelulose**

**Nadálin Yandra Botton**

Pelotas, 2021

**Nadálin Yandra Botton**

**Desenvolvimento e avaliação de uma vacina inativada, de aplicação intravaginal, contra o *Alphaherpesvirus bovino 5* (BoHV-5) em associação ao hidróxido de alumínio e aos polímeros mucoadesivos Polaxamer 407 e 2-Hidroxietilcelulose**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Prof. Dr. Geferson Fischer

Co-orientador: Prof. Dr. José Mario Barichello

Pelotas, 2021

B751d Botton, Nadálin Yandra

Desenvolvimento e avaliação de uma vacina inativada, de aplicação intravaginal, contra o *Alphaherpesvirus bovino 5* (BoHV-5) em associação ao hidróxido de alumínio e aos polímeros mucoadesivos Polaxamer 407 e 2-Hidroxietilcelulose / Nadálin Yandra Botton ; Geferson Fischer, orientador ; José Mario Barichello, coorientador. — Pelotas, 2021.

84 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Imunidade. 2. Superfícies mucosas. 3. Vacinação. I. Fischer, Geferson, orient. II. Barichello, José Mario, coorient. III. Título.

CDD : 636.089447

Nadálin Yandra Botton

Desenvolvimento e avaliação de uma vacina inativada, de aplicação intravaginal, contra o *Alphaherpesvirus bovino 5* (BoHV-5) em associação ao hidróxido de alumínio e aos polímeros mucoadesivos Polaxamer 407 e 2-Hidroxietilcelulose

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 24/02/2021

Banca examinadora:

Prof. Dr. Geferson Fischer (Orientador)  
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dr. Gustavo Marçal Schmidt Garcia Moreira  
Doutor em Ciências pela Technische Universität Braunschweig - Alemanha

Prof. Dr. Mário Celso Sperotto Brum  
Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Marcelo de Lima  
Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dra. Silvia de Oliveira Hübner  
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**Dedico esta pesquisa a meus pais, Jaqueline Paula Seemann Botton e Silvar Antônio Botton, que em momento algum mediram esforços para que eu dispusesse da melhor formação pessoal e profissional, e me tornasse quem sou hoje.**

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus pela benção da vida.

Aos meus pais Jaqueline Paula Seeman Botton e Silvar Antônio Botton por sempre permanecerem ao meu lado.

A minha família, pelo apoio e conforto.

À UFPel e ao PPGV, pela oportunidade de ingressar na Pós-Graduação.

À CAPES, por conceder a Bolsa de Estudos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Geferson Fischer, que é, além de orientador, um amigo. Obrigada por aceitar me orientar durante o Mestrado, por estar sempre ao meu lado desde o primeiro dia de pesquisa e por me incentivar tanto.

Ao meu amigo Dr. Paulo Ricardo Centeno Rodrigues, por me ensinar tanto sobre o laboratório, sobre as relações interpessoais e sobre a vida. És como um pai para mim, Amigão.

Ao Prof. Dr. Marcelo de Lima, que foi o precursor da minha caminhada no Laboratório de Virologia e Imunologia Veterinária da UFPel. Obrigada por me ensinar sobre Imunologia e Virologia, da teoria até a prática.

À Prof. Dra. Silvia Hübner de Oliveira, pelos ensinamentos e questionamentos que sempre me fizeram refletir sobre a pesquisa.

Aos meus amigos e colegas de Labvir Ana Carolina Scariot, Cristina Mendes Peter, Lariane da Silva Barcelos, Matheus Iuri Frühauf, Leonardo Clasen Ribeiro, Tony Picoli e Winnie Oliveira.

À minha irmã de alma, Isadora Eugênia Martins Nunes, que em todos os desafios, desde o ensino técnico, esteve comigo.

À todos aqueles que de uma forma contribuíram para o meu aprimoramento pessoal e profissional.

## Resumo

BOTTON, Nadálin Yandra. **Desenvolvimento e avaliação de uma vacina inativada, de aplicação intravaginal, contra o *Alphaherpesvirus bovino 5 (BoHV-5)* em associação ao hidróxido de alumínio e aos polímeros mucoadesivos Polaxamer 407 e 2-Hidroxietilcelulose.** 2021. f. 84.  
Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

Os alphaherpesvirus bovinos – BoHV - são patógenos que infectam as células epiteliais das mucosas e causam doenças respiratória e reprodutiva (BoHV-1) em bovinos, além de casos de encefalite herpética bovina (BoHV-5) e persistência do genoma viral no organismo hospedeiro, com casos de reativação e excreção da progênie infecciosa. Por serem antigenicamente semelhantes, a resposta imune para BoHV-1 e BoHV-5 pode ser cruzada, e neste âmbito, a imunidade local mediada por anticorpos das classes IgG e IgA é essencial para a efetividade da proteção. Vacinas convencionais, de aplicação parenteral, não são eficazes na indução da produção destas imunoglobulinas nas mucosas, havendo a necessidade da formulação de vacinas que propiciem a imunidade adequada a estas superfícies. Neste estudo, 20 fêmeas bovinas das raças Jersey e Holandês foram divididas em três grupos (G1 – controle positivo – BoHV-5+Al(OH)<sub>3</sub>, G2 – controle negativo – PBS) e G3 – vacina experimental – BoHV-5+Al(OH)<sub>3</sub>+2-Hidroxietilcelulose+Polaxamer 407) e inoculadas três vezes, com intervalos de vinte e um dias, pelas vias parenteral (G1 e G2) e vaginal (G3). A vacina demonstrou-se segura e bem tolerada pelos animais, sem a apresentação de reação adversa. A avaliação da resposta imunológica humoral foi realizada pelos testes de soroneutralização e ELISA. Não houve detecção de anticorpos neutralizantes e anticorpos totais séricos no grupo tratado com a vacina experimental (G3), em nenhum dos períodos experimentais, no entanto, o teste de ELISA indireto demonstrou o incremento na produção dos anticorpos IgG e IgA nas secreções nasal e vaginal (G3) aos 21 dias após a primeira vacinação. Nosso estudo confirma a teoria de que o sistema de mucosas é integrado de forma particular, e ainda, de que pesquisas adicionais que avaliem a capacidade imunomoduladora e imunogênica de outras formulações que possam ser utilizadas na elaboração de um produto comercial seguro e eficaz são necessárias.

**Palavras-chave:** imunidade; superfícies mucosas; vacinação.

## Abstract

BOTTON, Nadálin Yandra. **Development and evaluation of an inactivated vaccine for intravaginal application against Bovine alphaherpesvirus 5 (BoHV-5) in association with aluminum hydroxide and mucoadhesive polymers Polaxamer 407 and 2-Hydroxyethylcellulose.** 2021. f. 84.

Dissertation (Master degree in Sciences) - Veterinary Graduate Program, Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2021.

Bovine alphaherpesviruses - BoHV - are pathogens that infect mucosal epithelial cells and cause respiratory and reproductive diseases (BoHV-1) in cattle, in addition to cases of bovine herpetic encephalitis (BoHV-5) and persistence of the viral genome in the host organism, with cases of reactivation and excretion of the infectious progeny. As they are antigenically similar, the immune response to BoHV-1 and BoHV-5 can be crossed, and in this context, local immunity mediated by antibodies of the IgG and IgA classes is essential for the effectiveness of protection. Conventional vaccines, for parenteral application, are not effective in inducing the production of these immunoglobulins in the mucous membranes, with the need for the formulation of vaccines that provide adequate immunity to these surfaces. In this study, 20 bovine females of the Jersey and Dutch breeds were divided into three groups (G1 - positive control - BoHV-5 + Al (OH) 3), G2 - negative control - PBS) and G3 - experimental vaccine - BoHV-5 + Al (OH) 3 + 2-Hydroxyethylcellulose + Polaxamer 407) and inoculated three times, at intervals of twenty-one days, by parenteral (G1 and G2) and vaginal (G3) routes. The vaccine was shown to be safe and well tolerated by the animals, without presenting an adverse reaction. The evaluation of the humoral immune response was performed by serum neutralization and ELISA tests. There was no detection of neutralizing antibodies and total serum antibodies in the group treated with the experimental vaccine (G3), in any of the experimental periods, however, the indirect ELISA test demonstrated an increase in the production of IgG and IgA antibodies in nasal and vaginal secretions. (G3) at 21 days after the first vaccination. Our study confirms the theory that the mucosal system is integrated in a particular way, and that additional research that evaluates the immunomodulatory and immunogenic capacity of other formulations that can be used in the preparation of a safe and effective commercial product is necessary.

**Keywords:** immunity; mucous surfaces; vaccination



## Lista de Figuras

Figura 1	Apresentação do primeiro teste de concentração para a eleição dos polímeros derivados da celulose, Metilcelulose (Figura A) e 2-Hidroxietilcelulose (Figura B). As concentrações dos materiais (20%, 12,5% e 7,5%) estão demonstradas de acordo com cada imagem.....	71
Figura 2	Óvulos para inoculação intravaginal, contendo o antígeno BoHV-5 (50%), o adjuvante hidróxido de alumínio (15%), o polímero derivado da celulose 2-Hidroxietilcelulose (20%) e o estabilizante Polaxamer 407 (7,5%).....	72
Figura 3	Títulos médios sistêmicos de anticorpos neutralizantes (expressos em Log <sub>2</sub> ), mensurados através da técnica de Soroneutralização, dos animais experimentais.....	73
Figura 4	Níveis médios sistêmicos de Imunoglobulina G (Figura A) e Imunoglobulina A (Figura B), mensurados através do teste de ELISA indireto, dos animais experimentais.....	74
Figura 5	Níveis médios de Imunoglobulina G (Figura A) e Imunoglobulina A (Figura B) mensurados através do teste de ELISA indireto da secreção nasal dos animais experimentais.....	75
Figura 6	Níveis médios de Imunoglobulina G (Figura A) e Imunoglobulina A (Figura B) mensurados através do teste de ELISA indireto da secreção vaginal dos animais experimentais.....	76

## Lista de Tabelas

Tabela 1	Delineamento experimental e composição vacinal para avaliação do incremento na imunidade humoral gerada pela vacina experimental.....	20
----------	---	----

## Lista de Abreviaturas e Siglas

ADCC	Citotoxicidade celular dependente de anticorpos
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Óxido de alumínio
Al(OH) <sub>3</sub>	Hidróxido de alumínio
APC	Célula apresentadora de antígeno
BALT	<i>Bronchus associated lymphoid tissue</i> - Tecido linfóide associado aos brônquios
BEA	2- bromoetilamina hidrobrometo
BEI	Bromoetilamina
BoHV-1	<i>Bovine alphaherpesvirus 1 - alphaherpesvirus bovino 1</i>
BoHV-5	<i>Bovine alphaherpesvirus 5 - alphaherpesvirus bovino 5</i>
BVDV	<i>Bovine viral diarrhea virus</i> - Vírus da Diarreia Viral Bovina
CCR10	Molécula com função receptora CCR10
CD4+	Linfócito T expressando a molécula CD4
CD8+	Linfócito T expressando a molécula CD8
cDNA	<i>Complementary DNA</i> – DNA complementar
CDTec	Centro de Desenvolvimento Tecnológico
CLL28	Molécula com função quimiotática CLL28
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CpHV-1	<i>Caprine alphaherpesvirus 1 - alphaherpesvirus caprino 1</i>
DC	<i>Dendritic cells</i> - Células dendríticas

DICC <sub>50</sub>	Dose Infectante para 50% das Culturas Celulares
dL	Decilitro
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> - Ácido desoxirribonucleico
dsDNA	<i>Double strand DNA</i> - fita dupla de DNA
ECP	Efeito citopático
EDTA K2	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid disodium</i> - Etilenodiamino tetraacético dissódico
EDTA K3	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid trisodium</i> - Etilenodiamino tetraacético trissódico
EHV-4	<i>Equine herpesvirus 4</i> - Vírus da Rinopneumonite Viral Equina
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> - Ensaio de imunoadsorção enzimática
FeHV-1	<i>Feline herpesvirus 1</i> - Vírus da Rinotraqueíte Viral dos Felinos
g	Gramma
GaHV-2	<i>Gallid herpesvirus 2</i> - Vírus da Doença de Marek
GaHV-3	<i>Gallid herpesvirus 3</i> - Vírus da Doença de Marek
GALT	<i>Gut-associated lymphoid tissue</i> - Tecido linfoide associado ao intestino
gB	Glicoproteína B
gD	Glicoproteína D
gE	Glicoproteína E
gG	Glicoproteína G
gH	Glicoproteína H
gI	Glicoproteína I
gK	Glicoproteína K
gL	Glicoproteína L
gM	Glicoproteína M

H <sub>2</sub> O	Água
HSV-2	<i>Herpes-simplex virus 2</i> - Vírus do herpes simples 2
IA	Inseminação artificial
IBR	Rinotraqueíte Infecciosa Bovina
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
IFN I	<i>Interferon type I</i> - Interferon tipo I
IFN $\gamma$	<i>Interferon gamma</i> - Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G classe 1
IgG2	Imunoglobulina G classe 2
IgM	Imunoglobulina M
IL-2	<i>Interleukyn 2</i> - Interleucina 2
IL-4	<i>Interleukyn 4</i> - Interleucina 4
IL-5	<i>Interleukyn 5</i> - Interleucina 5
IL-6	<i>Interleukyn 6</i> - Interleucina 6
IL-13	<i>Interleukyn 13</i> - Interleucina 13
IPB	Balanopostite Pustular Infecciosa
IPV	Vulvovaginite Pustular Infecciosa
kbp	Kilo pares de base
kDa	Kilo Daltons
L	Litro
Labvir	Laboratório de Virologia e Imunologia Veterinária
LAT	<i>Latency associated transcript</i> - Transcrito associado a latência
LTK63	Enterotoxina termolábil da <i>Escherichia coli</i>
LTR	<i>Latency associated transcript</i> - Transcrito associado a latência

M	Molar
MALT	<i>Mucosal associated lymphoid tissue</i> - Tecido linfóide associado à mucosa
MDBK	<i>Madin Darby Bovine Kidney</i> - Células de linhagem de rim bovino
MEM	Meio essencial mínimo
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MOI	Multiplicidade de infecção
NALT	<i>Nasopharynx-associated lymphoid tissue</i> - Tecido linfóide associado aos tecidos nasais e faríngeos
NaN <sub>3</sub>	Azida sódica
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanograma
NK	<i>Natural killer cells</i> - Células natural killer
nm	Nanômetro
OPD	<i>O-phenylenediamine dihydrochloride</i> - Dicloridrato de o-fenilenodiamina
P407	Polímero mucoadesivo Kolliphor® Polaxamer 407 (BASF)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> - tampão fosfato-salino
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
pIgR	<i>Polymeric immunoglobulin receptor</i> - Receptor de imunoglobulina polimérica
pmol	Picomol
PMSF	<i>Phenylmethanesulfonyl fluoride</i> - Fluoreto de fenilmetilsulfonil
qPCR	<i>Real Time quantitative PCR</i> - PCR em Tempo Real

rLTB	Subunidade B recombinante da enterotoxina termolábil da <i>Escherichia coli</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> - Ácido ribonucleico
rpm	Rotação por minuto
SFB	Soro fetal bovino
SIgA	Imunoglobulina A secretora
SN	Soroneutralização
SNC	Sistema nervoso central
SisBi/UFPel	Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Pelotas
SuHV-1	<i>Suid alphaherpesvirus 1</i> – alphaherpesvírus suíno tipo 1
TCID <sub>50</sub>	Dose infectante para 50% dos tecidos celulares
TGF $\alpha$	<i>Transforming growth factor alpha</i> - Fator de transformação do crescimento alfa
TGF $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i> - Fator de transformação do crescimento beta
Th2	Límfócito T CD4+ diferenciado em T <i>helper</i> do tipo 2
UFPel	Universidade Federal de Pelotas
$\mu$ g	Micrograma
$\mu$ L	Microlitro
v	Volume
VHS	Proteína de tegumento dos <i>alphaherpesvirus bovinos 1 e 5</i>
VP16	Proteína de tegumento dos <i>alphaherpesvirus bovinos 1 e 5</i>

## Lista de Símbolos

<	Menor
>	Maior
≥	Maior ou igual
%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
©	Copyright
®	Registrada
™	Trade Mark



## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>Artigos.....</b>	<b>24</b>
<b>2.1</b>	<b>Artigo 1 A infecção pelos alphaherpesvirus bovinos tipo 1 e 5 e a indução de imunidade de mucosa .....</b>	<b>24</b>
<b>2.2</b>	<b>Artigo 2 Desenvolvimento e avaliação de uma vacina inativada, de aplicação intravaginal, contra o alphaherpesvirus bovino 5, em associação ao adjuvante hidróxido de alumínio e aos polímeros mucoadesivos Polaxamer 407 e 2-Hidroxietilcelulose.....</b>	<b>46</b>
<b>3</b>	<b>Considerações Finais.....</b>	<b>81</b>
	<b>Referências.....</b>	<b>82</b>
	<b>Anexos.....</b>	<b>90</b>

## 1 Introdução

Os *alphaherpesvirus bovinos 1* (BoHV-1) e 5 (BoHV-5) são classificados na ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae* e subfamília *Alphaherpesvirinae* (ICTV, 2020). Caracterizam-se como importantes patógenos que acometem os sistemas respiratório e reprodutivo (BATISTA et al., 2010) de bovinos além de serem responsáveis por casos de encefalite herpética bovina (ZAJAC et al., 2010), especialmente o BoHV-5. Estima-se um gasto de US\$ 379 por animal infectado com estes agentes, considerando atendimento veterinário, medicamentos e perdas reprodutivas (CAN et al., 2016).

A característica mais marcante destes vírus é a capacidade de estabelecer infecções latentes em seus hospedeiros (NANDI et al., 2009), com períodos de reativação e excreção que fazem com que os surtos sejam imprevisíveis, especialmente em áreas endêmicas (VIEIRA et al., 2003). Esse mecanismo é, invariavelmente, indispensável para a perpetuação do vírus na natureza (JONES et al., 2011)

A transmissão dos BoHV é relatada através do contato direto entre animais infectados e suscetíveis, por aerossóis e mucosas nasal e genital contaminadas. O contato indireto, com água e alimentos contaminados (MUYLKENS et al., 2007), além do sêmen, durante a técnica de inseminação artificial também pode infectar os animais suscetíveis (KUPFERSCHMIED et al., 1986; OLIVEIRA et al., 2011).

Para o controle dos BoHV são empregadas vacinas com vírus modificado, através da deleção de genes, vacinas atenuadas e vacinas inativadas (FLORES, et al., 2017). A eficiência na imunização de animais que emprega o BoHV-1 como vetor vacinal já foi comprovada (CHOWDHURY et al., 2021). Devido a homologia de 85 – 90% na sequência de nucleotídeos, a imunidade cruzada entre BoHV-1 e BoHV-5 é sugerida por diversos autores (DELHON et al., 2003; ZAJAC et al., 2010). No entanto, falhas vacinais na imunização de animais desafiados com vírus não homólogo são descritas na literatura (CASCIO et al., 1999).

As vacinas majoritariamente utilizadas no mercado veterinário brasileiro são as vacinas atenuadas e as vacinas inativadas (ANZILIERO et al., 2015). As vacinas vivas, que permitem a replicação do vírus no organismo do hospedeiro são aquelas que, também, mimetizam de forma mais concreta a infecção e por isso são compreendidas como mais eficazes no que diz respeito a duração e magnitude da imunidade, em detrimento às inativadas (FLORES et al., 2017). No entanto estas vacinas apresentam um grau de segurança restrito, uma vez que podem reverter à forma virulenta e causar infecção produtiva com possível infecção latente. Além disso descrições relatam o acometimento de aborto em fêmeas prenhes imunizadas, e imunossupressão (CAN et al., 2016).

As vacinas inativadas são consideradas mais seguras, uma vez que sofrem um processo de inativação, que faz com que o vírus não se replique no organismo, podendo ser utilizadas, além de outros, em animais prenhes (ANZILIERO et al., 2015). No entanto, estas vacinas necessitam da adição de substâncias adjuvantes imunopotencializadoras e imunomoduladoras em suas formulações e, neste sentido, os sais de alumínio tem destaque nas formulações de vacinas veterinárias (CHAGAS et al., 2019)

O hidróxido de alumínio ( $Al(OH)_3$ ) é um adjuvante mundialmente conhecido (EDELMAN & TACKETT, 1990), classificado como particulado (COX & COULTER, 1997) e, de acordo com o seu mecanismo de ação, como uma substância que causa depósito do antígeno no local da inoculação (GUPTA & SIBER, 1995). Promove a liberação prolongada do antígeno, facilitando a apresentação para as células apresentadoras de antígenos (APC), além da ativação do sistema complemento e consequente estímulo de macrófagos. A indução de imunidade é provocada através da resposta de linfócitos T CD4+ diferenciados em T *helper* 2 (Th2) (HOGENESCH et al., 2018).

As tecnologias no desenvolvimento de diversos sistemas de liberação utilizando polímeros bioadesivos aplicados em mucosas (ou mucoadesivos) possuem características desejáveis na formulação de vacinas de aplicação local (PEREIRA, 2011). Além de poderem ser utilizados como adjuvantes, acarretam em um íntimo contato com a membrana biológica, representando uma estratégia inteligente para aumentar a concentração local ou a permeabilidade do antígeno, melhorando assim, sua absorção (HAN et al., 2006). O Polaxamer 407 e a 2-Hidroxietilcelulose são

caracterizados como polímeros mucoadesivos e apresentam propriedades adequadas para a utilização em sistemas de entrega de medicamentos nas vias de inoculação mucosas (PEREIRA, 2011)

A indução de imunidade local, que em bovinos é mediada, especialmente, por Imunoglobulina A secretora (SIgA) e Imunoglobulina G (IgG), desempenha um papel fundamental na proteção das superfícies mucosas, através de mecanismos como a exclusão e neutralização de antígenos (DA SILVA CAMPOS et al., 2011). Como esta via é naturalmente a de entrada dos patógenos, BoHV-1 e BoHV-5, no organismo animal, em infecções naturais, a via da administração de vacinas que previna os sinais clínicos da doença deve ser levada em consideração no momento da formulação, e a via das mucosas pode ser preconizada durante este processo (AZEGAMI et al., 2014).

Conhecer as propriedades químicas, físicas e reológicas dos insumos primários que compõem a formulação vacinal, assim como estabelecer um protocolo no processo de produção, está diretamente relacionado ao êxito do produto final (LIMA et al., 2015). O estudo teve como objetivo desenvolver e avaliar uma formulação vacinal composta pelo antígeno inativado BoHV-5, em associação com o adjuvante hidróxido de alumínio, e os polímeros mucoadesivos 2-Hidroxietilcelulose (Sigma-Aldrich®) e Kolliphor® P407 (BASF).

## **2 Artigos**

### **2.1 Artigo 1**

#### **A infecção pelos *Alphaherpesvirus bovinos* tipo 1 e 5 e a indução de imunidade de mucosa**

Nadálín Yandra Botton; Carla Patricia Freitas; Cristina Mendes Peter; Lariane da Silva Barcelos; Leonardo Clasen Ribeiro; Matheus Iuri Frühauf; Paulo Ricardo Centeno Rodrigues; Silvia de Oliveira Hübner; Marcelo de Lima e Geferson Fischer

Artigo aceito na revista Research, Society and Development

# A infecção pelos *Alphaherpesvirus bovinos 1 e 5* e a indução de imunidade de mucosa

Infection by *bovine Alphaherpesvirus 1 and 5* and the induction of mucosal immunity

Infección por *Alphaherpesvirus bovinos 1 y 5* e inducción de inmunidad mucosa

## Resumo

O sistema imune presente nas mucosas representa a barreira inicial frente à infecção por diversos patógenos que utilizam estas superfícies como porta de entrada no organismo hospedeiro, como é o caso dos Alphaherpesvirus bovino 1 (BoHV-1) e Alphaherpesvirus bovino 5 (BoHV-5). Estes vírus infectam os sistemas reprodutivo e respiratório de bovinos e são responsáveis por casos de Rinotraqueíte Infecciosa Bovina, Vulvovaginite Pustular Infecciosa e Balanopostite Pustular Infecciosa, assim como Meningoencefalite Herpética Bovina, respectivamente. A infecção pelos BoHVs ocorre nas cavidades revestidas por células epiteliais de mucosa, principalmente nasal e genital, sendo o ponto inicial de replicação, seguindo-se a disseminação local, viremia eventual e disseminação neuronal, até o estabelecimento da latência. A cooperação dos mecanismos de defesa confere proteção através do sistema integrado de mucosas por meio da ativação dos sítios efetores e especialmente produção de diferentes isotipos de imunoglobulinas, como a SIgA, realiza neutralização nas superfícies mucosas, e a IgG, que desempenha neutralização na mucosa e sistemicamente. A indução da imunidade nas superfícies mucosas através do uso de vacinas torna-se de extrema importância para a prevenção da adsorção do vírus à célula e infecção pelos microrganismos patogênicos e depende, especialmente, do imunógeno, via de imunização e substância adjuvante empregada nas formulações. Esta revisão teve como objetivo abordar os principais aspectos relacionados à infecção pelo BoHV-1 e BoHV-5, assim como os tipos de resposta relacionadas ao sistema imune de mucosas frente a estes vírus e, ainda, estudos relacionados à utilização das vias mucosas para administração de vacinas em diferentes espécies animais.

**Palavras-chave:** Superfície mucosa; Infecção viral; Vacinação; Ensino em saúde.

## Abstract

The immune system present in the mucosa represents the initial barrier against infection by several pathogens that use these surfaces as a gateway to the host organism, such as the case of bovine Alphaherpesvirus 1 (BoHV-1) and bovine Alphaherpesvirus 5 (BoHV-5). These viruses infect the reproductive and respiratory systems of cattle and are responsible for cases of Infectious Bovine Rhinotracheitis, Infectious Pustular Vulvovaginitis and Infectious Pustular Balanopostitis, as well as Bovine Herpetic Meningoencephalitis, respectively. Infection by BoHVs occurs in cavities lined with mucosal epithelial cells, mainly nasal and genital, being the initial point of replication, followed by local dissemination, eventual viremia and neuronal dissemination, until latency is established. The cooperation of defense mechanisms provides protection through the integrated mucosal system through the activation of effector sites and especially the production of different isotypes of immunoglobulins, such as SIgA, which neutralizes mucosal surfaces, and IgG, which plays a neutralization in the mucosa and systemically. The induction of immunity on mucosal surfaces through the use of vaccines is extremely important for the prevention of virus adsorption to the cell and infection by pathogenic microorganisms and depends, especially, on the immunogen, immunization route and adjuvant substance used in the formulations. This review aimed to address the main aspects related to infection by BoHV-1 and BoHV-5, as well as the types of response related to the mucosal immune system against these viruses, and also studies related to the use of the mucosal pathways for administration of vaccines in different animal species.

**Keywords:** Mucosal surface; Viral infection; Vaccination; Health teaching.

## Resumen

El sistema inmunológico presente en la mucosa representa la barrera inicial contra la infección por varios patógenos que utilizan estas superficies como puerta de entrada al organismo huésped, como es el caso del Alphaherpesvirus 1 bovino (BoHV-1) y el Alphaherpesvirus 5 bovino (BoHV-5). Estos virus infectan los sistemas reproductivo y respiratorio del ganado y son responsables de casos de rinotraqueítis infecciosa bovina, vulvovaginitis pustulosa infecciosa y balanopostitis pustulosa infecciosa, así como meningoencefalitis herpética bovina, respectivamente. La infección por BoHVs ocurre en cavidades revestidas por células epiteliales mucosas, principalmente nasales y genitales, siendo el punto de partida de la replicación, seguida de diseminación local, eventual viremia y diseminación neuronal, hasta que se establece la latencia. La cooperación de los mecanismos de defensa brinda protección a través del sistema mucoso integrado a través de la activación de sitios efectores y especialmente la producción de diferentes isotipos de inmunoglobulinas, como SIgA, que neutraliza las superficies mucosas, e IgG, que juega neutralización en la mucosa y sistémicamente. La inducción de inmunidad en las superficies mucosas mediante el uso de vacunas es extremadamente importante para la prevención de la adsorción de virus a la célula y la infección por microorganismos patógenos y depende, especialmente, del inmunógeno, vía de inmunización y sustancia adyuvante utilizada en las formulaciones. Esta revisión tuvo como objetivo abordar los principales aspectos relacionados con la infección por BoHV-1 y BoHV-5, así como los tipos de respuesta relacionados con el sistema inmunológico de la

mucosa frente a estos virus, y también los estudios relacionados con el uso de las vías mucosas de administración de vacunas en diferentes especies animales.

**Palabras clave:** Superfície mucosa; Infecção viral; Vacunación; Enseñanza em la salud.

## 1. Introdução

O aumento da demanda mundial por alimentos impulsionou o vigoroso desenvolvimento que o setor agropecuário tem experimentado nos últimos anos (Allim, 2019). O Brasil possui o maior rebanho bovino do mundo, com cerca de 217 milhões de cabeças (Embrapa, 2021), e a produção de bovinos pode aumentar através, especialmente, do controle de doenças reprodutivas nas propriedades.

Um dos principais patógenos responsáveis por causar transtornos reprodutivos nos bovinos é o Alphaherpesvirus bovino 1 (Bovine alphaherpesvirus 1 – BoHV-1), agente responsável pela Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) e por casos de Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IPV) em fêmeas e Balanopostite Pustular Infecciosa (IPB) em machos. Da mesma família Herpesviridae, o Alphaherpesvírus bovino 5 (Bovine alphaherpesvirus 5 – BoHV-5) está relacionado à Meningoencefalite Herpética Bovina, também responsável por grandes prejuízos econômicos na criação de bovinos, uma vez que causa altos índices de mortalidade (Oliveira et al., 2015). A infecção por estes vírus ocorre através das cavidades mucosas que são revestidas por células epiteliais, onde ocorre o início do processo de replicação viral (Van Engelenburg et al., 1993), seguida pela disseminação local, viremia eventual e disseminação neuronal, onde persistem no núcleo das células nervosas pelo resto da vida do animal. Este mecanismo é denominado de latência e é através dele que o genoma viral pode ser reativado no organismo em situações que acarretaram imunossupressão, voltando a ocorrer a replicação e, conseqüentemente, a disseminação viral (Araújo, 2014; Engels & Ackermann, 1996).

Os mecanismos mais eficientes para evitar a entrada destes Alphaherpesvírus no organismo animal estão relacionados com a imunidade local das superfícies mucosas, que conta com a cooperação de mecanismos inatos e específicos para a efetiva proteção (Hannant, 2002). A necessidade de ativação dos sítios indutores, especialmente para a secreção de imunoglobulina A secretora (SIgA), que atua na neutralização dos agentes patogênicos nas superfícies mucosas (Campos, et al., 2011) e de imunoglobulina G (IgG), que desempenha função, também na neutralização, na mucosa e sistemicamente (Cunha Neto, 2016) tem despertado o interesse em pesquisas que visam a indução vacinal de imunidade nas vias mucosas.

O objetivo desta revisão foi abordar os principais aspectos relacionados à infecção pelo BoHV-1 e BoHV-5, assim como os tipos de respostas relacionadas ao sistema imune de mucosas frente a estes vírus e, ainda, estudos relacionados à utilização das vias mucosas para administração de vacinas em diferentes espécies animais.

## 2. Metodologia

Essa revisão de literatura se caracteriza como integrativa, com análise narrativa (Mariano & Santos, 2017).

Para a condução do estudo fez-se uso do banco de dados “Google acadêmico” executando buscas na aba “pesquisas avançadas” com as seguintes palavras-chave: “*alphaherpesvirus bovino*”, “imunidade contra vírus”, “imunidade de mucosa bovina”, “vacinação animal” e “vacinas de mucosa”.

Como critérios de inclusão, definiu-se que os estudos deveriam encontrar-se nos idiomas português, inglês ou espanhol e tratar sobre imunidade de mucosa contra vírus e/ou alphaherpesvirus bovinos. Como critérios de exclusão, estabeleceu-se que os trabalhos sem a metodologia concreta seriam excluídos, assim como estudos sem acesso gratuito. Não foi estabelecido um recorte temporal para a pesquisa.

## 3. Caracterização dos Agentes Etiológicos

O BoHV-1 e o BoHV-5 são classificados como pertencentes à ordem Herpesvirales, família Herpesviridae, subfamília Alphaherpesvirinae e gênero Varicellovirus (ICTV, 2020). A subfamília Alphaherpesvirinae compreende grande parte dos herpesvírus de interesse veterinário, como o vírus da Doença de Aujeszky (Suid alphaherpesvirus 1 - SuHV-1), Rinopneumonte Viral Equina (Equine herpesvirus 4 - EHV-4), Doença de Marek (Gallid herpesvirus 2 e 3 - GaHV-2 e 3), Rinotraqueíte Viral dos Felinos (Feline herpesvirus 1 - FeHV-1), entre outros (ICTV, 2020). A classificação destas espécies virais dentro da subfamília em questão é dependente de características relacionadas à gama variável de hospedeiros, ciclo replicativo curto, rápida destruição de cultivos celulares, capacidade de invasão neuronal e estabelecimento de infecções latentes em gânglios nervosos sensoriais e autonômicos (Araújo, 2014; Novaes, 2014), além de índice evolutivo superior na sequência de proteínas virais em comparação ao índice de genes nucleares de mamíferos (Thiry et al., 2007).

Os alphaherpesvírus possuem como material genético uma molécula de DNA de fita dupla (double strand DNA - dsDNA) linear (Petrini et al., 2019), com cerca de 137 a 140 kilo pares de bases (kbp), e mais de setenta genes (Crespo et al., 2016) que codificam as proteínas estruturais e as não estruturais, responsáveis pelo arranjo estrutural da partícula vírica e adsorção, replicação e egresso do vírus da célula hospedeira, respectivamente (Cerqueira et al., 2000). O genoma é envolto por um capsídeo icosaédrico, composto por cinco proteínas conservadas que apresentam funções específicas de manutenção da sua estrutura (Zajac et al., 2010). O capsídeo é recoberto pelo tegumento, que se caracteriza como uma camada proteica amorfa composta por oito proteínas, dentre as quais a VP16 e a VHS, que estão envolvidas na replicação viral e ativação dos genes alfa (primeiros genes a serem transcritos na cinética de expressão gênica, seguido pelos genes beta e gama), e na supressão da síntese proteica celular, respectivamente (Fenner et al., 2014).

O envelope dos alphaherpesvirus é originado de seções de membranas celulares alteradas da célula hospedeira (Paim, 2017), incorporado no retículo endoplasmático, e através da passagem da partícula viral pelo Complexo de Golgi (Favoreel, 2006). Na sua superfície podem ser observadas protruções de glicoproteínas que atuam na ligação a receptores celulares, fusão, penetração e transporte das partículas virais entre células, além de mediar interações do vírus com o sistema imunológico do hospedeiro e se constituírem alvos de anticorpos neutralizantes (Antello, 2014). O genoma do BoHV-1 e BoHV-5 codifica de 10 a 12 glicoproteínas (g) de envelope (Schwyzer & Ackermann, 1996), dentre as quais gB, gC, gD, gE, gF, gG, gH, gI, gK, gL, gM, que são indispensáveis para a replicação do vírus em cultivo celular e, provavelmente, para a sua sobrevivência na natureza (Schröder & Keil, 1999).

A característica mais marcante entre os vírus que constituem a família Herpesviridae é a capacidade de estabelecer infecções latentes em seus hospedeiros (Van Engelenburg et al., 1993). Os nucleocapsídeos dos alphaherpesvirus, após replicação primária nas células epiteliais das mucosas, são transportados através do fluxo axoplasmático retrógrado, onde atingem os corpos neuronais, ocorrendo a supressão precoce dos genes alfa, que são essenciais para as etapas seguintes de expressão gênica e replicação do genoma (Engels & Ackermann, 1996). Isso ocasiona a interrupção do ciclo lítico, resultando na persistência do genoma viral, na forma episomal, no núcleo dos neurônios pelo resto da vida do animal (Vieira et al., 2003). Durante a infecção latente não ocorre expressão gênica significativa, replicação do genoma ou produção da progênie viral infecciosa, e o único transcrito viral encontrado nos neurônios infectados é denominado de transcrito associado à latência (latency associated transcript – LAT/LTR) (Fenner et al., 2014). Em situações de estresse e/ou imunossupressão, ocasionados por transporte, parto, desmame, carências nutricionais graves, manejo de descorne, vacinação ou excesso de trabalho, por exemplo, a infecção em estado latente pode ser reativada (Ackermann et al., 1982; Novaes, 2014; Roizman 2001), acarretando na retomada do ciclo lítico nos neurônios do hospedeiro e produção de progênie viral infecciosa. Os vírions produzidos são transportados pelas mesmas vias nervosas até o sítio de infecção primária, onde o vírus replica produtivamente e é eliminado através das excreções (Masri et al., 1996).

Na reativação de infecções latentes, a excreção viral ocorre por um período de cerca de cinco dias e em títulos



menores em comparação àqueles secretados durante a infecção aguda, representando uma forma de perpetuação do vírus na natureza e tornando o animal infectado um potencial fonte de contaminação para outros animais (Viu et al., 2014). A latência é estabelecida, geralmente, nos gânglios que enervam a região onde ocorreu a infecção primária, sendo descritos gânglios sensoriais e autonômicos, neurônios sensoriais do gânglio trigêmeo em infecções respiratórias ou orais, gânglios sacrais em infecções genitais, e ainda, locais no sistema nervoso central (SNC) e periférico, além de tonsilas e linfócitos circulantes (Mayer-Winkelmann, 2005).

Inicialmente, o BoHV-1 foi subdividido em três subgenótipos (Flores, 2017) devido à diversidade de suas propriedades biológicas, antigênicas e moleculares, e por apresentar homologia entre as sequências de nucleotídeos de cerca de 85 a 90% (Delhon et al., 2003; Henzel et al., 2019). O BoHV-1.1 foi associado às amostras “clássicas” de Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), enquanto o BoHV-1.2 foi associado às amostras que causavam Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IPV) em fêmeas e Balanopostite Pustular Infecciosa (IPB) em machos, enquanto que o BoHV-1.3 foi associado às amostras que causavam Meningoencefalite Herpética Bovina ou Meningoencefalite. O genótipo 1.2 foi ainda dividido em BoHV-1.2a, relacionado às manifestações clínicas como abortos e infecção no trato respiratório, além de IPV e IPB, e BoHV-1.2b, relacionado à doença respiratória leve, IPV e IPB (Batista et al., 2010; Crespo et al., 2016). Há cerca de 22 anos, no entanto, após analisadas as características de casos de Meningoencefalite reportados na Austrália e com o emprego de técnicas de análise genômica e observação de diferenças clínico-epidemiológicas, o então genótipo BoHV-1.3 foi considerado uma espécie viral distinta e passou a ser denominada de BoHV-5, que se diferenciava da espécie BoHV-1 especialmente pela sua neuroinvasividade e capacidade de neurovirulência (Médici et al., 2000). A neuroinvasão provocada pelo BoHV-1, geralmente não vai além do neurônio de primeira ordem em que a infecção latente foi estabelecida, diferentemente do BoHV-5, que é capaz de infectar diferentes regiões do cérebro (Gabev et al., 2010; Zajac et al., 2010).

Os alphaherpesvirus utilizam como porta de entrada no organismo animal, as cavidades mucosas revestidas por células epiteliais (Engels & Ackermann, 1996; Viu et al., 2014), geralmente de bovinos jovens. A principal forma de transmissão ocorre através das secreções respiratória, genital e ocular (Medeiros, 2019), uma vez que, em infecções agudas, o vírus está presente em altos títulos nessas secreções, podendo haver disseminação por cerca de quinze dias. A transmissão é realizada através do contato direto das regiões nasais entre os animais ou através da monta natural, além de aerossóis em curtas distâncias, fômites contaminados, fluidos fetais, fetos abortados, inseminação artificial e transferência de embriões (Costa et al., 2017).

Durante o curso das enfermidades causadas pelo BoHV-1, as manifestações clínicas relatadas incluem, no caso da IBR, febre, depressão, anorexia, mucosa nasal hiperêmica, com presença de lesões vesiculares e erosivas, dispneia, taquipneia, tosse, descargas nasais serosas que podem tornar-se mucopurulentas conforme a progressão da enfermidade, bloqueio das vias respiratórias superiores, salivação excessiva, bronquite, pneumonia, bem como queda na produção de animais lactantes (Arruda et al., 2019; Fino et al., 2012; Medeiros, 2019) e baixa qualidade do sêmen (Crespo et al., 2016). Já os sinais clínicos relatados em casos de Meningoencefalite Herpética incluem secreção nasal e ocular, protrusão da língua, salivação, ranger de dentes, oscilações rítmicas involuntárias e repetidas dos olhos nas posições de mirada, cegueira, incoordenação, flexionamento do pescoço e pressão da cabeça sobre as superfícies, quedas, decúbito dorsal, opistótono e convulsões (Massitel et al., 2016; Roos, 2009).

#### **4. Epidemiologia, Medidas de Controle e Profilaxia**

Após 65 anos da realização do primeiro isolamento de BoHV-1 (Flores, 2017) e 59 anos do BoHV-5, estes vírus continuam se disseminando e perpetuando nos organismos animais, causando prejuízos significativos no que diz respeito à criação comercial de bovinos (Almeida et al., 2016; Dejuçq & Jégou, 2001; Thiry et al., 2006;). O BoHV-1 possui ampla distribuição mundial e, na maioria dos países com criação bovina expressiva, a situação é endêmica, com exceção de países com

condições geográficas e climáticas favoráveis como Áustria, Dinamarca, Finlândia, Noruega e Suécia, que erradicaram a infecção mediante identificação e eliminação dos animais soropositivos (Ackermann & Engels, 2006). O BoHV-5 é mais comumente descrito em países da América do Sul, como Brasil e Argentina, e Austrália (Elias et al., 2004; Ferreira et al., 2018), com baixa ocorrência na América do Norte devido, provavelmente, a programas de vacinação contra o BoHV-1, através dos quais poderia conferir-se uma imunização cruzada para o BoHV-5 (Silva, 2014).

As medidas de controle e profilaxia relacionadas aos Alphaherpesvírus bovinos são voltadas a minimizar as perdas econômicas causadas pela infecção. Estima-se um gasto médio de US\$ 379 com atendimento veterinário, medicamentos e perdas reprodutivas, por animal infectado (Can et al., 2016) e, neste âmbito, aqueles destinados à reprodução são os que requerem maior atenção dentro da propriedade rural. Em um cenário ideal, medidas como o teste de sêmen e reprodutores, uso de sêmen e embriões livres do vírus (Castro, 2016) e o conhecimento do status sanitário do rebanho, assim como seu monitoramento periódico, além do período de quarentena estipulado para animais advindos de outras propriedades, ajudariam a prevenir a entrada do vírus na propriedade (Rissi et al., 2007).

Em rebanhos que apresentam histórico da infecção, em confinamentos que agregam animais de diversas procedências e em estabelecimentos com alta rotatividade de animais, os protocolos vacinais desempenham papel na redução da circulação do vírus e das manifestações da doença, controlando as perdas reprodutivas e, conseqüentemente, diminuindo as perdas econômicas (Merchioratto et al., 2020). A vacinação deve ser realizada em novilhas que entrarão em reprodução pois estas, via de regra, são soronegativas e podem entrar em contato com o vírus no momento da Inseminação Artificial (IA), se o sêmen em questão estiver contaminado, ou no momento do “repassse”, caso o touro estiver contaminado (Alfieri & Alfieri, 2017).

As vacinas previnem os sinais clínicos das doenças e reduzem a excreção viral, mas não são capazes de conter a infecção a campo (Costa et al., 2017). Além disso, as vacinas inativadas, comercialmente disponíveis, embora seguras quando em comparação com as atenuadas, em sua grande maioria não conferem uma resposta imune rápida e duradoura, além de requererem a adição de substâncias adjuvantes em sua formulação (Anziliero et al., 2015). Já as vacinas atenuadas, embora induzam uma eficiente e duradoura resposta imune, não são recomendadas para animais prenhes, uma vez que permitem a replicação viral na célula do hospedeiro, apresentam o risco de reversão da virulência e infecção latente pela cepa vacinal e podem causar abortamentos (Jones et al., 2011; Nandi et al., 2009).

Alguns estudos propõem a utilização do BoHV-1 como vetor vacinal (Chowdhury et al., 2021; Kweon et al., 1999; Wang et al., 2003), e estes podem representar uma alternativa a ser adotada a longo prazo, para a resolução de problemas associados à imunomodulação gerada por vacinas inativadas (Jones & Chowdhury, 2008), mas ainda apresenta um viés no que diz respeito às propriedades biológicas desse agente de estabelecer latência em seu hospedeiro (Canal et al., 2017). Além disso, a dificuldade em diferenciar anticorpos vacinais de anticorpos naturalmente produzidos durante a infecção prejudica o diagnóstico e a exclusão dos animais soropositivos (Fino et al., 2012). Cepas vacinais modificadas pela deleção da glicoproteína E (gE) do BoHV têm sido empregadas para a imunização e testagem de rebanhos na América do Norte, e tem auxiliado no processo de detecção dos animais infectados (Brum, 2009). A vacina com gE deletada, encontra-se comercialmente disponível no mercado veterinário brasileiro.

O título de anticorpos neutralizantes capaz de conferir proteção aos animais são aqueles maiores ou iguais a 8, com 80% dos animais reagentes (USGP, 2014). As vacinas para BoHV-1 deveriam induzir esta resposta, no entanto, não existem referências destas informativas no Brasil (Costa et al., 2017).

## **5. Imunidade de Mucosa Contra Vírus**

As cavidades mucosas são compostas por um estreito tecido de células epiteliais unidas por junções ocludentes, que se caracteriza como a principal barreira física de defesa do animal, juntamente com a pele (Corthesy & Kraehenbuhl, 1999; Lamm,

1997;), não só contra os BoHV-1 e 5, mas contra os mais diversos patógenos. Diferentemente do sistema imunológico sistêmico, que é responsável pela eliminação ativa do microrganismo, as mucosas dos tratos respiratório, gastrointestinal e urogenital são providas de mecanismos de expulsão com caracteres químicos e físicos, cuja função primária é manter o antígeno fora do epitélio, impedindo interações com substâncias que possam causar danos ao hospedeiro (Czerkinsky & Holmgren, 2010). Destacam-se, neste sentido, a descamação, pH diferencial, presença de ácidos graxos, peptídeos antimicrobianos, microbiota endógena, enzimas e proteases, movimento ciliar, que exercem grande parte da imunidade inata (Iwasaki, 2010).

A capacidade esterilizante das cavidades mucosas é, muitas vezes, afetada por outras funções que essas superfícies desempenham (Silva et al., 2007). A interferência hormonal varia durante o ciclo estral das fêmeas, alterando características do muco endocervical (Hladik & McElrath, 2008). Nos bovinos, no período da ovulação em que níveis crescentes de estrógeno são observados, o muco encontra-se menos viscoso e mais alcalino, tornando o trato genital mais vulnerável a infecções virais (De Lima & Alves, 2008).

O tecido linfóide associado às mucosas (mucosal associated lymphoid tissue - MALT) é um ambiente diferenciado (Zarzaur & Kudsk, 2001) quando comparado a outros órgãos (Holmgren & Czerkinsky, 2005), além de possuir os componentes necessários para iniciar uma resposta imune. A mucosa epitelial externa contém os linfócitos T intraepiteliais, e na lâmina própria, que está imediatamente abaixo da camada epitelial, encontram-se os linfócitos B, os plasmócitos, os linfócitos T, os macrófagos, as células dendríticas e as células M, que capturam antígenos da luz do órgão em que estão localizadas e os transportam até o tecido linfóide correspondente (Gonçalves et al., 2016).

O MALT é subdividido em quatro grupos: tecido linfóide associado à conjuntiva ou ao olho (conjunctiva associated lymphoid tissue – CALT ou eye associated lymphoid tissue - EALT), que faz parte da superfície ocular e é constituído por células de Langerhans, neutrófilos, macrófagos e células T (Akpek & Gottsch, 2003; Knop & Knop, 2007); tecido linfóide associado aos brônquios (bronchus associated lymphoid tissue – BALT), que recobre as vias respiratórias e é constituído, especialmente, por linfócitos B e T (Grützenmacher et al., 2011); o tecido linfóide associado aos tecidos nasais e faríngeos (nasopharynx-associated lymphoid tissue - NALT) que inclui as tonsilas (Brandtzaeg et al., 1999; Brandtzaeg, 2003); e o tecido linfóide associado ao intestino (gut-associated lymphoid tissue - GALT) que engloba as placas de Peyer, o apêndice e numerosos folículos linfóides associados entre si. Devido a sua extensão, o GALT é o principal componente dentre todos os tecidos contidos no MALT (Da Fonseca, 2010). O sistema imune do trato urogenital não apresenta estruturas linfóides definidas, sugerindo ser dependente da migração celular e expressão de moléculas de adesão tecido-específicas (De Lima & Alves, 2008).

As células epiteliais contidas nas superfícies mucosas apresentam como um dos seus principais componentes, as células M especializadas (Nochi et al., 2007), localizadas em maior quantidade no BALT, NALT e GALT (Pavot et al., 2012). Essas células transportam antígenos da luz dos órgãos para os folículos linfóides associados, onde são capturados pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), especialmente por DCs, e apresentados aos linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+ que estão localizados nos sítios de indução (local de encontro com o antígeno) (Holmgren & Czerkinsky, 2005), dando início a uma resposta imunológica específica (Takahashi et al., 2009).

A resposta imune nas mucosas é regulada pela natureza química do antígeno (proteína, polissacarídeo, lipídeo, ácido nucleico), pelo tipo de APC envolvida, como as DCs ou os linfócitos B, e pelo microambiente local. A imunidade humoral nas mucosas é mediada por anticorpos específicos secretados pelos plasmócitos. Após a sensibilização de linfócitos B e T nos sítios de indução, como as placas de Peyer, as tonsilas ou o apêndice, estas células respondem ao antígeno através da expansão clonal, diferenciando-se em plasmócitos e linfócitos T efetores, respectivamente, e células de memória (Holmgren & Czerkinsky, 2005). Os linfócitos T helper ativados, ainda, secretam citocinas relacionadas com o estímulo da imunidade humoral, estimulando assim os linfócitos B (Holmgren & Czerkinsky, 2005).

Os linfócitos T e B, assim como as APCs que são ativadas em um determinado sítio indutor, podem migrar através dos vasos linfáticos para outro sítio efetor nas mucosas (Bergquist et al., 1997), com consequente secreção de IgA em um local

diferente daquele onde ocorreu o estímulo antigênico primário (Mestecky, 1987), sendo esta relação observada entre as mucosas nasal e vaginal (Gallichan et al., 2001; Gallichan & Rosenthal, 1995; Parr & Parr, 1999). Este mecanismo está relacionado com a expressão de citocinas e seus receptores, que caracterizam-se como moléculas de adesão tecido-específicas que guiam estas células de volta ao local onde houve o estímulo antigênico e aos sítios efetores relacionados (Lanning et al., 2005; Neutra & Kozlowski, 2006). Por exemplo, linfócitos B ativados e diferenciados em plasmócitos recebendo estímulos para a produção de IgA e ativados no MALT, expressam em sua superfície a molécula CCR10, que é receptora para a molécula quimiocina CLL28, que por sua vez é secretada por células epiteliais presentes no trato intestinal, nas glândulas salivares, tonsilas, trato respiratório e glândulas mamárias em fase de lactação (Kunkel & Butcher, 2003). Desta forma, estes plasmócitos podem ser atraídos para qualquer um destes tecidos (Mestecky, 1987).

Ainda, com a co-estimulação de células B ativadas por linfócitos T helper, ocorre a formação de centros germinativos, havendo a maturação de afinidade e a troca do isotipo de imunoglobulina secretada (Kunkel & Butcher, 2003). O resultado destas modificações evidencia-se na geração de células B de memória e plasmócitos que sintetizam anticorpos de alta afinidade. Estes plasmócitos podem permanecer no tecido linfóide secundário de origem, o que é particularmente comum no caso de plasmócitos que secretam IgM, ou trafegam através da linfa eferente até o sangue a fim de colonizar locais distantes (Brandtzaeg et al., 1999; Calame, 2001).

O isotipo da imunoglobulina secretada pelo plasmócito é determinado pelo local de apresentação do antígeno pelas APCs, assim como a natureza da estimulação antigênica, sendo que, juntos, ambos determinarão o tecido para o qual estes plasmócitos serão destinados (Kunkel & Butcher, 2003). As células B ativas sofrem mudança de classe de imunoglobulinas ao serem estimuladas por determinadas citocinas secretadas pelos linfócitos T helper, como por exemplo IL-4, IL-5, IL-6 e TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , que levam a secreção de IgA (Sonoda et al., 1989), anticorpo predominante nas secreções mucosas (Cerutti, 2008; Woof & Kerr, 2006), ou IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$ , que levam a secreção de imunoglobulina G (IgG) (Calich & Vaz, 1989).

A IgA é secretada por plasmócitos localizados nas superfícies corpóreas (Oliveira, 2017). É sintetizada principalmente nos tratos intestinal e respiratório, mas também no trato urogenital, na glândula mamária e na pele (Mesquita Júnior et al., 2010). Apresenta a terceira maior concentração (mg dL<sup>-1</sup>) sérica em bovinos (10-50 mg dL<sup>-1</sup>), depois da IgG (1.700-2.700 mg dL<sup>-1</sup>) e da IgM (250-400 mg dL<sup>-1</sup>). Nas secreções corporais desses mamíferos, a IgA é principal imunoglobulina encontrada, e possui concentrações maiores do que as séricas, como no colostro (400 mg dL<sup>-1</sup>), no muco nasal (200 mg dL<sup>-1</sup>), na secreção salivar (56 mg dL<sup>-1</sup>) ou nas lágrimas (260 mg dL<sup>-1</sup>) (Tizard, 2009).

Os monômeros de IgA possuem peso molecular de cerca de 150 kilodaltons (kDa), mas são normalmente secretados como dímeros (Woof, 2013; Woof & Kerr, 2006), unidos por um polipeptídeo denominado de cadeia J (Mestecky et al., 1971; Solé et al., 2018) que, além de ligar estes monômeros, interage com o receptor de imunoglobulina polimérica (pIgR). Este receptor é uma glicoproteína transmembrana transportadora de anticorpos expressa na superfície basal das células epiteliais de mucosa, com peso molecular de 71 kDa (Mostov & Deitcher, 1986). O pIgR transporta a IgA através das células epiteliais por um processo de transcitose que finda com a translocação de IgA secretora (SIgA) à superfície mucosa (Macpherson et al., 2008). A SIgA possui ainda uma peça secretora advinda da clivagem endocítica do pIgR, que confere propriedades mucofílicas à imunoglobulina (Brandtzaeg, 1974; Phalipon et al., 2002), como resistência à degradação provocada por proteases (Van Egmond et al., 2001), como é o caso da tripsina no trato gastrointestinal (Mestecky et al., 2005).

A IgA não tem a capacidade de ativação do sistema de complemento e não pode agir como opsonina para a facilitação da fagocitose. No entanto, pode aglutinar um antígeno particulado e neutralizar vírus, assim como algumas enzimas virais. Estudos com o vírus Influenza sugerem que este mecanismo varia de acordo com o número de moléculas IgA por vírion (Gombart et al., 1993). Porém, sua principal atividade é atuar na exclusão imune, que consiste na prevenção à aderência de microrganismos estranhos às superfícies epiteliais, para que esses sejam expelidos sem causar nenhum dano ao organismo animal (Breitfeld et al., 1989). Por ser transportada pelos enterócitos, a IgA também atua dentro das células, podendo ligar-se, por exemplo, a

proteínas virais sintetizadas e interromper a replicação viral, impedindo o crescimento e perpetuação viral antes que a integridade celular seja danificada (Zambrano et al., 1996). Neste caso, formam-se, então, complexos IgA-vírus no interior da célula infectada que, provavelmente, são expelidos para a luz do órgão (Van Egmond et al., 2001).

Outra imunoglobulina importante na defesa das mucosas é a IgG, secretada por plasmócitos e encontrada em maiores concentrações no sangue dos animais, sendo por isso de fundamental importância nos mecanismos de defesa mediados por anticorpos (Burton, 1985). A IgG possui peso molecular de cerca de 180 kDa (Penha, 2007) e caracteriza-se como sendo a menor das moléculas dentre as imunoglobulinas, apresentando facilidade em escapar dos vasos sanguíneos, mecanismo especialmente importante na inflamação, onde a maior permeabilidade vascular permite com que a IgG participe de processos para a proteção dos tecidos e superfícies mucosas (Tizard, 2009). Dentre as funções desse anticorpo, está a eliminação do antígeno, extremamente importante na defesa das superfícies, que pode ser realizada através da ativação do sistema complemento a partir da ligação de duas moléculas de IgG no antígeno seguida da união da proteína C1 do complemento, ativando a sua via clássica, e resultando na produção de substâncias bioativas que podem resultar na eliminação do microrganismo (Campagne et al., 2007). Além disso, a IgG age ainda como opsonina (Oliveira et al., 2002), facilitando a atividade de células fagocíticas (Joshi et al., 2006) e de citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC), realizada especialmente através da degranulação de células natural killer (Salgado, 2013). Nos ruminantes a IgG1 representa um importante papel na defesa das superfícies mucosas, principalmente na glândula mamária, onde é encontrada em quantidades superiores à IgA (Pastoret et al, 1998). Nos bovinos há predominância de IgG no útero, sendo que apenas uma fração de IgG1 provém do endométrio, ademais é derivada, juntamente com IgG2, da circulação periférica (Butt et al., 1993; Curtain et al., 1971).

## **6. A Utilização da Via Mucosa para a Administração de Vacinas**

Os BoHVs continuam sendo uma das principais causas de perdas econômicas na bovinocultura, mesmo com o crescente desenvolvimento em tecnologias vacinais nos últimos anos (Almeida et al., 2016). As imunizações parenterais não resultam em uma resposta imune apropriada de mucosa (Ferreira et al., 2017), a qual poderia prevenir a fixação desses antígenos. A indução de SIgA, efetiva em conferir proteção e realizar a neutralização de antígenos nas superfícies mucosas, e de IgG, exercendo sua função através da neutralização e posterior eliminação imune, é dependente do imunógeno, da rota de imunização e do adjuvante utilizado (Dehghan et al., 2014). O emprego de partículas altamente complexas como imunógenos, a escolha da melhor via de aplicação da vacina e a identificação de substâncias adjuvantes que atuem na potencialização da resposta imune local e sistêmica, podem ser altamente proveitosas para o controle das enfermidades e consequentes prejuízos causados pelos BoHVs.

A inoculação de um antígeno através da via oral, nasal, retal ou vaginal induz uma resposta mais eficiente nas mucosas (Neutra & Kozlowski, 2006; Oliveira, 2017). Em sua pesquisa, Thiry et al. (2007) inocularam em caprinos por via intranasal, uma vacina viva atenuada contra o BoHV-1, modificada através da deleção do gene não essencial da glicoproteína E (gE), seguida pelo desafio destes animais, por via intravaginal, com uma cepa de Alphaherpesvirus caprino 1 (Caprine alphaherpesvirus 1 - CpHV-1). Considerando que esse vírus está associado a doença sistêmica em animais jovens, doença genital que culmina em casos de Balanopostite e Vulvovaginite e abortos em animais adultos, e que as cepas de BoHV-1 e CpHV-1 estão intimamente relacionadas antigenicamente, os autores constataram que a imunização não induziu nenhuma reação indesejada (local ou sistêmica) e que houve redução dos títulos médios de excreção viral de CpHV-1 nos animais imunizados com BoHV-1 gE deletada, em comparação com os animais do grupo controle, não vacinados, além de redução na severidade da doença. No mesmo ano, Tempesta et al. (2007), avaliando a eficácia da imunização na mucosa de cabras inocularam, através da via intravaginal, uma vacina inativada contra o CpHV-1, utilizando como substância adjuvante a enterotoxina termolábil da *Escherichia coli*, LTK63, administrando o fármaco em duas doses com intervalo de 21 dias. Os animais vacinados demonstraram altos títulos de SIgA, apresentando-se, ainda, significativamente protegidos após o desafio intravaginal com uma cepa virulenta

de CpHV-1, demonstrando queda na excreção viral, quando em comparação ao grupo controle composto por animais não vacinados.

Quando em comparação entre as vias nasal e vaginal para avaliação da resposta imune sistêmica e resposta imune na mucosa vaginal contra a LTK63, mensurada em ratas, Di Tommaso et al. (1996) observaram o incremento na imunidade humoral sistêmica e altos níveis de IgA e IgG através de ambas as vias de imunização. Porém, os animais imunizados através da via intranasal apresentaram uma resposta relacionada a IgA vaginal mais tardia e com um título maior de anticorpos, quando comparados aos animais imunizados por via intravaginal. Uma provável explicação para este fato seria a alta vascularização do trato respiratório, que pode facilitar a dispersão das células B e T efectoras, para outros órgãos e tecidos (Iwasaki, 2010).

Parr e Parr (1999), ao confrontarem as vias de imunização mucosas vaginal e nasal, em camundongos fêmeas utilizando uma vacina viva atenuada contra o Alphaherpesvirus humano tipo 2 (HSV-2), observaram que a via de aplicação intranasal não incrementou a resposta imune de IgA e IgG na mucosa vaginal, quando comparada a via de inoculação intravaginal. Em contrapartida, a via intravaginal gerou incremento do número de plasmócitos secretores de IgG na vagina e aumento desse anticorpo tanto na secreção vaginal como no soro, indicando imunidade local e sistêmica, visto que proporcionou maior proteção frente ao desafio dos camundongos com uma cepa virulenta de HSV-2.

Nosso grupo de pesquisa vem avaliando a utilização de vacinas inativadas de aplicação vaginal, associada a adjuvantes, contra as doenças provocadas por BoHV-1 e BoHV-5: Siedler (2012) avaliou a imunogenicidade de uma vacina contra o BoHV-5 associado à subunidade B recombinante da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (rLTB) e à xantana. Analisando soro sanguíneo, muco nasal e muco vaginal, constatou o incremento nos níveis de IgA e IgG no soro, na mucosa nasal e na mucosa vaginal dos animais inoculados com a vacina intravaginal, em comparação ao grupo controle, uma vacina comercial de aplicação intramuscular, além de estímulo na expressão de IL-2 e IL-13. Peter et al. (2019), avaliou a imunogenicidade de uma vacina inativada de aplicação intravaginal contra o BoHV-1 associado ao esporo inativado da bactéria gram-positiva *Bacillus toyonensis*. A presença de anticorpos neutralizantes foi verificada apenas quando os animais foram inoculados via parenteral com uma vacina comercial. No teste de ELISA indireto, para a mensuração de IgA e IgG, o estímulo na produção de ambos os anticorpos no soro sanguíneo, 90 dias após a primeira inoculação, foi verificado nos tratamentos em que o antígeno foi associado ao *Bacillus toyonensis*, em relação ao tratamento controle. O mesmo perfil foi encontrado com relação à produção de IgA e IgG na mucosa vaginal. Em dados ainda não divulgados, pudemos constatar que a utilização de proteínas recombinantes imunogênicas, associadas a polímeros derivados da celulose e estabilizantes, já descritos na literatura como sistemas de entrega de medicamentos nas superfícies mucosas (Webb et al., 2007), produzem anticorpos neutralizantes, aumento de IgA e IgG total no soro, secreção nasal e secreção vaginal, além de proporcionar incremento na produção de interleucinas, contra infecções provocadas por BoHV-1 e BoHV-5.

Algumas variáveis devem ser levadas em consideração durante a escolha da via mucosa de inoculação a ser utilizada, como a espécie a ser inoculada, a porta de entrada natural do antígeno em questão no organismo animal e a natureza da vacina, além dos mecanismos inatos químicos e físicos que merecem atenção especial neste processo (Neutra & Kozlowski, 2006). Para Pavot et al. (2012), uma formulação vacinal completa e ideal para induzir a resposta imune nos sítios locais deve proteger o antígeno da degradação enzimática, limitar sua taxa de dissolução, facilitar a absorção pelas células especializadas nos sítios indutores, facilitar a captura e resposta pelas células efectoras, mimetizar pontos chave da infecção natural, além de utilizar adjuvantes que realizem um eficiente incremento na resposta imune.

## 7. Considerações Finais

As vias mucosas para a aplicação de fármacos apresentam vantagens como o estímulo conjugado das imunidades local e sistêmica, com incremento, na produção, especialmente, de imunoglobulina A secretora e imunoglobulina G, que são

eficientes na proteção de bovinos contra microrganismos que infectam as cavidades mucosas.

O desenvolvimento de vacinas que estimulem a imunidade humoral e que apresentem segurança garantida é de grande importância no mercado veterinário mundial, uma vez que estas podem ser a chave para a erradicação de enfermidades que prejudicam o desenvolvimento de criações há décadas, como é o caso das doenças reprodutivas provocadas pelos BoHV.

Uma vez que o estímulo essencial da imunidade seja dependente do imunógeno, da rota de imunização e do adjuvante utilizado, é necessária uma sinergia entre as partes. A pesquisa por adjuvantes imunostimulantes e imunomoduladores que favoreçam a geração de resposta imune nas vias mucosas é constante, e as proteínas recombinantes apresentam destaque neste âmbito. No entanto, a necessidade de profissionais e equipamentos altamente especializados, bem como o baixo rendimento aliado ao elevado custo para sua produção faz com que compostos alternativos sejam estudados. Além disso, a necessidade de pesquisas que esclareçam o funcionamento dos componentes vacinais nas vias de geração de imunidade nos sítios de indução das mucosas é essencial para o desenvolvimento de produtos funcionais que cumpram com o seu papel na pecuária mundial.

## Referências

- Ackermann, M., & Engels, M. (2006). Pro and contra IBR-eradication. *Veterinary Microbiology*, 113 (3-4), 293-302.
- Ackermann, M., Peterhans, E., & Wyler, R. (1982). DNA of bovine herpesvirus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. *American Journal of Veterinary Research*, 43 (1), 36-40.
- Akpek, E. K e Gottsch, J. D (2003). Immune defense at the ocular surface. *Eye*, 17 (8), 949-956.
- Alfieri, A. A., & Alfieri, A. F (2017). Doenças infecciosas que impactam a reprodução dos bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 41 (1), 133- 139.
- Allim, J. M. (2019). *Definição do Módulo Mínimo da Exploração da Bovinocultura de Corte (Ciclo Completo) na Região Centro-Oeste do Brasil*. Dissertação de Mestrado. Escola de Economia de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.
- Almeida, I. C, Sena, L. M, Sarmento, L. P, Barioni, G., & Oliveira, F. A (2016). Aspectos relacionados à brucelose, diarreia viral bovina e rinotraqueíte infecciosa bovina e sua relação com a qualidade do leite. Em *Tópicos Especiais em Ciência Animal V* (pp. 51-64). Espírito Santo: CAUFES.
- Al-Shammari, Z. S., Ahmed, B. M, Haroun, M., Afify, A. F, Elsanousi, A. A., & Shalaby M. A (2016). A First Molecular Phylogeny of an Egyptian Equine Herpesvirus-4 Strain Derived from a Fetal Arabian horse. *Journal of Veterinary Science & Medical Diagnosis*, 5 (1), 2-4.
- Antello, T. F (2014). *Expressão de fatores ligados à apoptose: herpesvirus bovino tipo 5*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, SP, Brasil.
- Anziliero, A., Martins, M., Weiss, M., Monteiro, F. L, Ataíde, C. F, Weiblen, R., & Flores, E. F (2015). Serological response to bovine herpesvírus 1 and 5 and bovine viral diarrhea virus induced by comercial vaccines. *Ciência Rural*, 45 (1), 58-63.
- Araújo, I. L (2014). *Resposta imune humoral em bovinos induzida pela glicoproteína D recombinante de herpesvírus bovino tipo 5*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.
- Arruda, E. F, Silva, T. I. B, Aragão, B. B, Castro, R. S., & Gomes, Y. A (2019). Seroprevalence of bovine alphaherpesvirus type 1 (BoHV-1) and risk factors associated with dairy properties of the municipality of Senador Guimard, Acre, Brazil. *Arquivos do Instituto Biológico*, 86 (1-6), 1-6. doi: 10.1590/1808-1657001362018
- Batista, H. B D. C. R, Schmidt, E., Spilki, F. R, Franco, A. C., & Roehe, P. M (2010). Herpesvírus bovinos (BoHV-1.1 e BoHV-1.2 b) em forma infecciosa em encéfalos de bovinos submetidos ao diagnóstico de raiva no estado do Rio Grande do Sul. *Arquivos brasileiros de medicina veterinária e zootecnia*, 62 (5), 1023-1028.
- Bergquist, C., Johansson, E. L, Lagergård, T., Holmgren, J., & Rudin, A. (1997). Intranasal vaccination of humans with recombinant cholera toxin B subunit induces systemic and local antibody responses in the upper respiratory tract and the vagina. *Infection and Immunity*, 65 (7), 2676-2684.
- Brandtzaeg, P., Farstad, I. N, & Haraldsen, G. (1999). Regional specialization in the mucosal immune system: primed cells do not always home along the same track. *Immunology Today*, 20 (6), 267-277.
- Brandtzaeg, P. (1974). Mucosal and glandular distribution of immunoglobulin components: differential localization of free and bound SC in secretory epithelial cells. *The Journal of Immunology*, 112 (4), 1553-1559.
- Brandtzaeg, P. (2003). Role of secretory antibodies in the defence against infections. *International Journal of Medical Microbiology*, 293 (1), 3-15.
- Breitfeld, P. P, Harris, J. M., & Mostov, K. E (1989). Postendocytotic sorting of the ligand for the polymeric immunoglobulin receptor in Madin-Darby canine kidney cells. *The Journal of Cell Biology*, 109 (2), 475-486.
- Brum, M. C. S (2009). *Produção e caracterização de cepas recombinantes do Herpesvírus bovino tipo 5 defectivas na enzima Timidina Quinase e Glicoproteína E*. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

- Burton, D. R (1985). Immunoglobulin G: functional sites. *Molecular immunology*, 22 (3), 161-206.
- Butt, B. M, Besser, T. E, Senger, P. L., & Widders, P. R (1993). Specific antibody to *Haemophilus somnus* in the bovine uterus following intramuscular immunization. *Infection and Immunity*, 61 (6), 2558-2562.
- Calame, K. L (2001). Plasma cells: finding new light at the end of B cell development. *Nature Immunology*, 2 (12), 1103.
- Calich, V. L G & Vaz, C. A. C (1989). *Imunologia básica*. Ed. Artes Médicas LTDA.
- Campagne, M., Wiesmann, C., & Brown, E. J (2007). Macrophage complement receptors and pathogen clearance. *Cellular Microbiology*, 9 (9), 2095-2102.
- Campos, M. J. S, Ferreira, A. P, & Vitral, R. W. F (2011). O Papel da Imunoglobulina A Secretora no Mecanismo de Defesa da Mucosa Bucal. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*, 11 (1), 139-143.
- Can, MF, Ataseven VS VYalçın C. (2016). Estimation of production and reproductive performance losses in dairy cattle due to bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) infection. *The Journal Veterinarski Arhiv*, 86 (4), 499-513.
- Canal, CW, Vaz, CSL, & Cibulski, S. Vacinas víricas. In: Flores, EF. *Virologia Veterinária*. 2017. 363–394.
- Castro, VLDQ (2016). *Deteção do bovine herpesvirus 1 em órgãos genitais de vacas naturalmente infectadas e no interior de ovócitos infectados in vitro*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.
- Cerqueira, RB, Carminati, R., Silva, JM, Camos, G., Meyer, R. & Sardi, S. (2000). Serological survey for bovine herpesvirus 1 in cattle from different regions in the state of Bahia, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 37 (6), 0-0.
- Cerutti, A. (2008). The regulation of IgA class switching. *Nature Reviews Immunology*, 8 (6), 421.
- Chowdhury, SI, Pannhorst, K., Sangewar, N., Pavulraj, S., Wen, X., Stout, RW & Paulsen, DB (2021). BoHV-1-Vectored BVDV-2 Subunit Vaccine Induces BVDV Cross-Reactive Cellular Immune Responses and Protects against BVDV-2 Challenge. *Vaccines*, 9 (1), 46.
- Corthesy, B., & Kraehenbuhl, JP (1999). Antibody-mediated protection of mucosal surfaces. Em *Defense of Mucosal Surfaces: Pathogenesis, Immunity and Vaccines* (pp. 93-111). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Costa, EP, Queiroz, VLD, Silva Junior, A., Guimarães, JD, Alves, VP, Santos, MR & Souza, LFL (2017). BoHV-1 (o vírus da IBR) e sua relação com estruturas e órgãos genitais da fêmea bovina. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 41 (1), 254-263.
- Crespo, SEI., Possatti, F., Otonel, RAA., Favero, LM., Balbo, LC, Alfieri, AF, & Alfieri, AA (2016). Caracterização molecular de bohv-1.1 em touros com balanopostite pustular infecciosa. *Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública*, 3, 117-120.
- Cunha Neto, CAV (2016). *Proteinograma e concentração de imunoglobulina G séricos em potros, do nascimento aos 30 dias de vida, tratados com plasma*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP, Brasil.
- Curtain, CC, Clark, BL, & Dufty, JH (1971). The origins of the immunoglobulins in the mucous secretions of cattle. *Clinical and Experimental Immunology*, 8 (2), 335.
- Czerkinsky, C., & Holmgren, J. (2010) Topical immunization strategies. *Mucosal Immunology* 3 (6), 545-55.
- Da Fonseca, FCP (2010). Influência da nutrição sobre o sistema imune intestinal. *CERES: Nutrição & Saúde*. 5 (3), 163-174.
- Dejucq, N., & Jégou, B. (2001). Viruses in the mammalian male genital tract and their effects on the reproductive system. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65 (2), 208-231.
- Dehghan, S., Tafaghodi, M., Bolourieh, T., Mazaheri, V., Torabi, A., Abnous, K., & Kheiri, MT (2014). Rabbit nasal immunization against influenza by dry-powder form of chitosan nanospheres encapsulated with influenza whole virus and adjuvants. *International Journal of Pharmaceutics*, 475 (1-2), 1-8.
- Delhon, G., Moraes, MP, Lu, Z., Afonso, CL, Flores, EF, Weiblen, R., Kutish, GF & Rock, DL (2003) Genome of bovine herpesvirus 5. *Journal of Virology*, 77 (19), 10339-10347.
- De Lima, YAR & Alves, MDFC (2008). O Sistema imune da mucosa do trato genital feminino eo impacto das doenças sexualmente transmissíveis. *Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology*, 37 (4), 295-310.
- Di Tommaso, A., Saletti, G., Pizza, M., Rappuoli, R., Dougan, G., Abrignani, S., Douce, G. & De Magistris, MT (1996). Induction of antigen-specific antibodies in vaginal secretions by using a nontoxic mutant of heat-labile enterotoxin as a mucosal adjuvant. *Infection and immunity*, 64 (3), 974-979.
- Elias, F., Schild, AL & Riet-Correa, F. (2004). Meningoencefalite e encefalomalacia por herpesvírus bovino-5: distribuição das lesões no sistema nervoso central de bovinos naturalmente infectados. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 24 (3), 123-131.
- Embrapa (2021). *Brasil é o quarto maior produtor de grãos e o maior exportador de carne bovina do mundo, diz estudo*. <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/62619259/brasil-e-o-quarto-maior-produtor-de-graos-e-o-maior-exportador-de-carne-bovina-do-mundo-diz-estudo#:~:text=bovino%20do%20mundo%202020%2C%20o%20rebanho%20bovino%20brasileiro%20foi%20o%20maior%20do,com%20190%20milh%C3%B5es%20de%20cabe%C3%A7as>.
- Engels, M. & Ackermann, M. (1996). Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Veterinary Microbiology*, 53 (1-2), 3-15.
- Favoreel, HW (2006). "O porquê dos motivos baseados em Y nas proteínas do envelope do alfa herpesvírus." *Virus research* 117 (2), 202-208.
- Fenner, FJ, Bachmann, PA, & Gibbs, EPJ (2014). *Veterinary Virology*. Academic Press.
- Ferreira, HCC, Campos, MG, Vidigal, PMP, Santos, MR, De Carvalho, OV, Bressan, GC, Fietto, JLR, Costa, EP, Almeida, MR & Silva Júnior, A. (2018). Latent bovine herpesvirus 1 and 5 in milk from naturally infected dairy cattle. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 80 (11), 1787-1790.
- Ferreira, RC, Neves, H., Pinto, JF, & Lopes, CM (2017). Overview on Inhalable Nanocarriers for Respiratory Immunization. *Current pharmaceutical design*, 23 (40), 6160-6181.



- Fino, TCM, Melo, CB, Ramos, AF & Leite, RC (2012). Infecções por herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e suas implicações na reprodução bovina. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 36 (2), 122-127.
- Flores, EF (2017). *Virologia Veterinária: virologia geral e doenças víricas*. Santa Maria, SM: Ed. da UFSM.
- Gabev, E., Tobler, K., Abril, C., Hilbe, M., Senn, C., Franchini, M., & Ackermann, M. (2010). Glycoprotein D of bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) confers an extended host range to BoHV-1 but does not contribute to invasion of the brain. *Journal of Virology*, 84 (11), 5583-5593
- Gallichan, WS, & Rosenthal, KL (1995). Specific secretory immune responses in the female genital tract following intranasal immunization with a recombinant adenovirus expressing glycoprotein B of herpes simplex virus. *Vaccine*, 13 (16), 1589-1595.
- Gallichan, WS, Woolstencroft, RN, Guarasci, T., McCluskie, MJ, Davis, HL, & Rosenthal, KL (2001). Intranasal immunization with CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant dramatically increases IgA and protection against herpes simplex virus-2 in the genital tract. *The Journal of Immunology*, 166 (5), 3451-3457.
- Gombart, AF, Hirano, AKIKO, & Wong, TC (1993). Conformational maturation of measles virus nucleocapsid protein. *Journal of Virology*, 67 (7), 4133- 4141.
- Gonçalves, JL, Yaochite, JNU, Queiroz, CAA, Câmara, CC, & Oriá, RB (2016). Bases do sistema imunológico associado à mucosa intestinal. In: Oriá RB e Brito GAC. *Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica*. Blucher Open Access, 369-388.
- Grützmacher, S., Robinson, DM, Sevecke, J., Mlynski, G., & Beule, AG (2011). Comparative investigations of anatomy and physiology in mammalian noses (Homo sapiens--Artiodactyla). *Rhinology*, 49 (1), 18-23.
- Hannant, D. (2002). Mucosal immunology: overview and potential in the veterinary species. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 87 (3-4), 265- 267.
- Henzel, A., Salla, PF, Mascitti, AK, Demoliner, M., Solyman, MC, Lunge, VR & Spilki, FR (2019). Bovine alphaherpesvirus 1 and 5 in semen from bulls presenting genital lesions under field conditions in Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 71 (1), 197-203.
- Hladik, F., & McElrath, MJ (2008). Setting the stage: host invasion by HIV. *Nature Reviews Immunology*, 8 (6), 447-457. Holmgren, J., & Czerkinsky, C. (2005). Mucosal immunity and vaccines. *Nature medicine*, 11 (4s), S45.
- ICTV (2020). *Relatório ICTV, Vírus dsDNA, Herpesvirales*. [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/dsDNA-viruses-2011/w/dsDNA\\_viruses/89/herpesvirales](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsDNA-viruses-2011/w/dsDNA_viruses/89/herpesvirales)
- Iwasaki, A. (2010). Antiviral immune responses in the genital tract: clues for vaccines. *Nature reviews Immunology*, 10 (10), 699.
- Jones, CJ, & Chowdhury, S. (2008). A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. Papers in *Veterinary and Biomedical Science*, 99.
- Jones C., Da Silva, LF & Sinani, D. (2011). Regulation of the latency-reactivation cycle by products encoded by the bovine herpesvirus 1 (BHV-1) latency-related gene. *Journal of Neurovirology*, 17, 535-45.
- Joshi, T., Butchar, JP, & Tridandapani, S. (2006). Fcγ receptor signaling in phagocytes. *International Journal of Hematology*, 84 (3), 210-216. Knop, E. & Knop, N. (2007). Anatomy and immunology of the ocular surface. *Immune Response and the Eye*, 92, 36-49.
- Kunkel, EJ, e Butcher, EC (2003). Plasma-cell homing. *Nature Reviews Immunology*, 3 (10), 822.
- Kweon, CH, Kang, SW, Choi, EJ, & Kang, YB (1999). Bovine herpes virus expressing envelope protein (E2) of bovine viral diarrhea virus as a vaccine candidate. *Journal of Veterinary Medical Science*, 61(4), 395-401.
- Lamm, ME (1997). Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annual Review of Microbiology*, 51 (1), 311-340.
- Lanning, DK, Rhee, KJ & Knight, KL (2005). Intestinal bacteria and development of the B-lymphocyte repertoire. *Trends in immunology*, 26 (8), 419-425.
- Mariano, AM, & Santos, MR (2017). Revisão da Literatura: Apresentação de uma Abordagem Integradora. Anais do XXVI Congresso Internacional AEDEM. Reggio Calabria, Italia.
- Masri, SA, Olson, W., Nguyen, PT, Prins, S., & Deregt, D. (1996). Rapid detection of bovine herpesvirus 1 in the semen of infected bulls by a nested polymerase chain reaction assay. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 60 (2), 100.
- Massitel, JL, Wesgueber, J., Oliveira, RAM, Queiroz, GR, Fritzen, JTT, Alfieri, AA & Lisbôa, JAN (2016). Presence of BoHV-5 genome in cerebrospinal fluid of cattle with herpetic meningoencephalitis. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 68 (2), 548-552.
- Macpherson, AJ, McCoy, KD, Johansen, FE, & Brandtzaeg, P. (2008). The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal immunology*, 1 (1), 11.
- Medeiros, DM, Campos, FS, Lima, M., Hubner, SO, Vargas, GDA, & Fischer, G. (2019). Infecção latente pelo herpesvírus bovino tipo 1 em búfalos (*Bubalus bubalis*) no Rio Grande do Sul. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 71, 1236-1242.
- Médici, KC, Alfieri, AA, & Alfieri, AF (2000). Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1, decorrente de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. *Ciência Rural*, 30 (2), 347-350.
- Megid, J., Ribeiro, MG & Paes, AC (2016). *Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia*. Rio de Janeiro, RJ: Roca.
- Merchioratto, I., Aurélio, AA, Villela, JM, Stone, NV, Roman, IJ, Traesel, CK, & Brum, MCS (2020). Immunogenicity in sheep of Uruguayan commercial vaccines against bovine alphaherpesvirus 1, 5 and bovine pestiviruses. *Ciência Rural*, 50 (4).
- Mesquita Júnior, D., Araújo, JAP, Catelan, TTT, Souza, AWS, Cruvinel, WDM, Andrade, LEC, & Silva, NPD (2010). Sistema imunitário-parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 50 (5).

- Mestecky, J. (1987). The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *Journal of clinical immunology*, 7 (4), 265-276.
- Mestecky, J., Zikan, J., & Butler, WT (1971). Immunoglobulin M and secretory immunoglobulin A: presence of a common polypeptide chain different from light chains. *Science*, 171 (3976), 1163-1165.
- Mestecky, J., Moro, I., Kerr, MA, & Woof, JM (2005). Mucosal immunoglobulins. Em *Mucosal immunology* (pp. 153-181). Academic Press.
- Mayer-Winkelmann, SV (2005). Distribuição do dna dos herpesvírus bovino tipos 1 (bhv-1) e 5 (bhv-5) no encéfalo de coelhos durante a infecção latente. Dissertação de Mertrado. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.
- Mostov, KE, & Deitcher, DL (1986). Polymeric immunoglobulin receptor expressed in MDCK cells transcytoses IgA. *Cell*, 46 (4), 613-621.
- Nandi S., Kumar M., Manohar M., & Chauhan RS (2009). Bovine herpes virus infections in cattle. *Animal Health Research Reviews*, 10 (1), 85-98.
- Neutra, MR, & Kozlowski, PA (2006). Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nature Reviews Immunology*, 6 (2), 148.
- Nochi, T., Yuki, Y., Matsumura, A., Mejima, M., Terahara, K., Kim, D., Fukuyama, S., Iwatsuki-Horimoto, K., Kawaoka, Y., Kohda, T., Kozaki, S., Igarashi, O. & Kiyono H. (2007). A novel M cell-specific carbohydrate-targeted mucosal vaccine effectively induces antigen-specific immune responses. *Journal of Experimental Medicine*, 204 (12), 2789-2796.
- Novaes, JB (2014). *Apoptose relacionada à infecção in vitro por herpesvírus bovino tipo 1 e 5*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araçatuba, SP, Brasil.
- Oliveira, LM (2017). *O papel da SIgA na resposta imune de mucosa contra a Ascariidose Larval*. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.
- Oliveira, CA, Seixas, AEAC, Chedraoui, SS, Kanashiro, A., Mariko, LK, Braga, APDAG, Gonçalves, CFF, Coredirol, DS, Leitão, DPS, Gaspar, LR, Souza, PLV, Valim, YML & Mantovani, B. (2002). Avaliação bioquímica e ultraestrutural da interação de imunocomplexos de IgG com leucócitos polimorfonucleares: efeito de antioxidantes naturais. *Eclética Química*, 27 (1es), 0.
- Oliveira, RAM, Lorenzetti, E., Alfieri, AA, & Lisbôa, JAN (2015). Prevalência das infecções latentes por BoHV-1 e BoHV-5 em bovinos de corte no Estado do Paraná. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 67, 1217-1225.
- Paim, WP (2017). *Sequência completa do genoma de Herpesvírus bovino tipo 5 subtipo c*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.
- Parr, EL, & Parr, MB (1999). Immune responses and protection against vaginal infection after nasal or vaginal immunization with attenuated herpes simplex virus type-2. *Immunology*, 98 (4), 639-645.
- Pastoret, PP, Griebel, P., Bazin, H. & Govaerts, A. (1998). Immunology of Cattle. Em *Handbook of Vertebrate Immunology*, San Diego, CA: Academic Press.
- Pavot, V., Rochereau, N., Genin, C., Verrier, B., & Paul, S. (2012). New insights in mucosal vaccine development. *Vaccine*, 30 (2), 142-154.
- Pejakovic, S., Mfossa, ACM, Wiggers, L., Kheimar, A., Coupeau, D., Kaufner, BB & Muylkens, B. (2020). Role of DNA Methylation and CpG Sites in the Viral Telomerase RNA Promoter during Gallid Herpesvirus 2 Pathogenesis. *Journal of Virology*, 94 (23), 1-21.
- Penha, TR (2007). *Produção e caracterização de anticorpos monoclonais anti fragmento Fc de IgG de bovino*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.
- Peter, CM, Fruhauf, MI, Botton, NY, Barcelos, LS, Bozembecker, R. & Fischer, G. (2019). Desenvolvimento e imunogenicidade de uma vacina inativada de aplicação intravaginal contra o *Alphaherpesvirus bovino* tipo 1 em associação com o esporo inativado do *Bacillus toyonensis*. Anais do XXI Encontro de Pós-Graduação. Pelotas, RS: UFPel.
- Petrini, S., Iscaro, C. & Rigui, C (2019). Antibody Responses to Bovine Alphaherpesvirus 1 (BoHV-1) in Passively Immunized Calves. *Viruses*, 11 (1), 23.
- Phalipon, A., Cardona, A., Kraehenbuhl, JP, Edelman, L., Sansonetti, PJ & Corthésy, B. (2002). Secretory component: a new role in secretory IgA-mediated immune exclusion in vivo. *Immunity*, 17 (1), 107-115
- Rissi, DR, Rech, RR, Flores, EF, Kommers, GD & Barros, CS (2007). Meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 27(7), 251-260.
- Rodriguez, JMM, Leeming, G., Kohler, K. & Kipar A. (2017). Feline Herpesvirus Pneumonia: Investigations Into the Pathogenesis. *Veterinary Pathology*, 54 (6), 922-932.
- Roizman, B. (2001). The family Herpesviridae: A brief introduction. Em: *Fields Virology* (pp. 2381-2398) Philadelphia, PA: Williams and Wilkins publishers.
- Roos, TB (2009). *Efeito imunomodulador de Bacillus cereus var. Toyoi e Saccharomyces boulardii em animais vacinados contra Herpesvírus Bovino tipo 5*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.
- Salgado, RM (2013). Avaliação do papel do soro imune de camundongos CD28KO (deficiente em IgG específica) na interação in vivo e in vitro do T. cruzi Sylvio X10/4 com células da linhagem macrófaga. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Schröder, C. & Keil, GM (1999). Bovine herpesvirus 1 requires glycoprotein H for infectivity and direct spreading and glycoproteins gH (W450) and gB for glycoprotein D-independent cell-to-cell spread. *Journal of General Virology*, 80 (1), 57-61.
- Schwyzler, M. & Ackermann, M. (1996). Virologia molecular de herpesvírus de ruminantes. *Microbiologia veterinária*, 53 (1-2), 17-29.
- Silva, DR (2014). *Deteção molecular de herpesvírus bovino tipo-1 e herpesvírus bovino tipo-5 em amostras de encéfalos bovinos incluídos em parafina*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil.
- Silva, MS, Brum, MCS, Weiblen, R. & Flores, EF (2007). Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987-2006). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 27 (10), 403-408.

- Siedler, BS (2012). *Avaliação de uma vacina de aplicação intravaginal contra o Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) associada a subunidade B recombinante da enterotoxina termolábil de Escherichia coli (rLTB)*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.
- Solé, D. et al (2018). Consenso Brasileiro sobre Alergia Alimentar: 2018-Parte 1-Etiopatogenia, clínica e diagnóstico. Documento conjunto elaborado pela Sociedade Brasileira de Pediatria e Associação Brasileira de Alergia e Imunologia. *Arquivos de Alergia e Imunologia*, 2 (1), 7-38.
- Sonoda, Eiichiro et al (1989). Transforming growth factor beta induces IgA production and acts additively with interleukin 5 for IgA production. *The Journal of experimental medicine*, 170 (4), 1415-1420.
- Takahashi, I., Nochi, T., Yuki, Y., & Kiyono, H. (2009). New horizon of mucosal immunity and vaccines. *Current opinion in immunology*, 21 (3), 352-358.
- Tempesta, M., Camero, M., Bellacicco, AL, Tarsitano, E., Lorusso, A., Martella, V., Decaro, N., Del, Giudice, G., Cassone, A., Quaranta, A. & Buonavoglia, C. (2007). Caprine herpesvirus 1 vaccine with the LTK63 mutant as a mucosal adjuvant induces strong protection against genital infection in goats. *Vaccine*, 25 (46), 7927-7930.
- Thiry, J., Keuser, V., Muylkens, B., Meurens, F., Gogev, S., Vanderplasschen, A. & Thiry, E. (2006). Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. *Veterinary Research*, 37 (2), 169-190.
- Thiry, J., Tempesta, M., Camero, M., Tarsitano, E., Muylkens, B., Meurens, F., Thiry, J. & Buonavoglia, C. (2007). Clinical protection against caprine herpesvirus 1 genital infection by intranasal administration of a live attenuated glycoprotein E negative bovine herpesvirus 1 vaccine. *BioMed Central Veterinary Research*, 3 (1), 33.
- Thiry, J., Windén, F., Grégoire, F., Linden, A., Belák, S. & Thiry, E. (2007). Isolation and characterization of a ruminant Alphaherpesvirus closely related to Bovine Herpesvirus 1 in a free-ranging red deer. *BioMed Central Veterinary Research*, 3 (26).
- Tizard, IR (2009). *Veterinary Immunology: An Introduction*. Elsevier.
- USGP (2014). Code of Federal Regulations, *Animal and animal products*. 9 CFR 113.215 - Bovine virus diarrhoea vaccine, killed virus. v.1, chapter I, subchapter E, part 113, section 113.215/216. <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/CFR-2012-title9-vol1/xml/CFR2012-title9-vol1sec113-215.xml>.
- Van Engelenburg, FA, Maes, RK, Van Oirschot, JT, & Rijsewijk, FA (1993). Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. *Journal of Clinical Microbiology*, 31 (12), 3129-3135.
- Van Egmond, M., Damen, CA, Van Spriël, AB, Vidarsson, G., Van Garderen, E., & Van de Winkel, JG (2001). IgA and the IgA Fc receptor. *Trends in Immunology*, 22 (4), 205-211.
- Vieira, S., Brito, WMEDD, Souza, WJ, Alfaia, BT, & Linhares, DCL (2003). Anticorpos para o herpesvírus bovino 1 (BHV-1) em bovinos do Estado de Goiás. *Ciência Animal Brasileira*, 4 (2), 131-137
- Wang, L., Whitbeck, JC, Lawrence, WC, Volgin, DV, & Bello, LJ (2003). Expression of the genomic form of the bovine viral diarrhoea virus E2 ORF in a bovine herpesvirus-1 vector. *Virus genes*, 27(1), 83-91.
- Webb, MS et al. (2007). Distribuição de drogas lipossomais: patentes recentes e oportunidades emergentes. Patentes recentes sobre entrega e formulação de medicamentos, 1 (3), 185-194.
- Woof, JM, & Kerr, MA (2006). The function of immunoglobulin A in immunity. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 208 (2), 270-282.
- Woof, JM (2013). Immunoglobulin A: molecular mechanisms of function and role in immune defence. Em *Molecular and Cellular Mechanisms of Antibody Activity* (pp. 31-60). Springer, New York, NY.
- Zajac, MPDM, Ladelfa, MF, Kotsias, F., Muylkens, B., Thiry, J., Thiry, E., & Romera, SA (2010). Biologia do herpesvírus bovino 5. *The Veterinary Journal*, 184 (2), 138-145.
- Zambrano-Villa, S., Salazar-Villa, RM, & Ortiz-Ortiz, L. (1996). Inmunología de la IgA y las mucosas. *Cirugía y Cirujanos*, 64 (5), 147-151. Zarzaur, BL, & Kudsk, KA (2001). The mucosa-associated lymphoid tissue structure, function, and derangements. *Shock*, 15 (6), 411-42.

### **3 Considerações Finais**

Demonstramos que a vacina inativada de aplicação intravaginal, utilizando como adjuvante o hidróxido de alumínio ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ), como antígeno o BoHV-5, e ainda os polímeros 2-Hidroxietilcelulose e Polaxamer 407, foi segura e bem tolerada pelos animais. No entanto, não foram detectados títulos de anticorpos neutralizantes nos animais do grupo 3 (vacina experimental) pela técnica de soroneutralização.

Observamos aumento de anticorpos IgG e IgA nas secreções nasal e vaginal, através do teste de ELISA, corroborando com a hipótese de que as cavidades mucosas constituem-se em um sistema integrado, com secreção de imunoglobulinas em um local diferente daquele onde ocorreu o estímulo primário. O incremento de IgG e IgA a nível sistêmico não foi observado.

Nosso estudo confirma a necessidade de pesquisas adicionais que avaliem a capacidade imunomoduladora e imunogênica de outras formulações que possam ser utilizadas na elaboração de um produto comercial seguro e eficaz.

## Referências

ACKERMANN, M. e ENGELSI, M. Pro and contra IBR-eradication. **Veterinary Microbiology**, v.113, n. 3-4, p. 293-302, 2006.

ACKERMANN, M.; PETERHANS, E.; WYLER, R. DNA of bovine herpesvirus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. **American journal of veterinary research**, v. 43, n. 1, p. 36-40, 1982.

ALFIERI, A. A. et al. Doenças infecciosas que impactam a reprodução de bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 133-139, 2017.

ALMEIDA, Í. C. et al. Aspectos relacionados à brucelose, diarreia viral bovina e rinotraqueíte infecciosa bovina e sua relação com a qualidade do leite. **Tópicos Especiais em Ciência Animal**, p. 51, 2016.

AL-SHAMMARI, Z. et al. A first molecular phylogeny of an egyptian equine herpesvirus-4 strain derived from a fetal Arabian horse. **Journal of Veterinary Science & Medical Diagnosis**, v. 5, 2016.

ANZILIERO, D. et al. Serological response to bovine herpesvírus 1 and 5 and bovine viral diarrhea virus induced by comercial vaccines, **Ciência Rural**, v. 45, n. 1, p. 58-63, 2015.

ARRUDA, E. F. et al. Soroprevalence of bovine alphaherpesvirus type 1 (BoHV-1) and risk factors associated with dairy properties of the municipality of Senador Guimard, Acre, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 86, 2019.

AZEGAMI, T. et al. Challenges in mucosal vaccines for the control of infectious diseases. **International immunology**, v. 26, n. 9, p. 517-528, 2014.

AZIZ, M. A. et al. Oral vaccines: new needs, new possibilities. **Bioessays**, v. 29, n. 6, p. 591-604, 2007.

AZIZI, A. et al. Mucosal HIV vaccines: a holy grail or a dud?. **Vaccine**, v. 28, n. 24, p. 4015-4026, 2010.

BATISTA, H. B. de C. R. et al. Herpesvírus bovinos (BoHV-1.1 e BoHV-1.2 b) em forma infecciosa em encéfalos de bovinos submetidos ao diagnóstico de raiva no estado do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 5, p. 1023-1028, 2010.

BERGQUIST, C. et al. Intranasal vaccination of humans with recombinant cholera toxin B subunit induces systemic and local antibody responses in the upper respiratory tract and the vagina. **Infection and immunity**, v. 65, n. 7, p. 2676-2684, 1997.

BRANCAGLION, G. A. **Avaliação da resposta imune inata após infecção pelo zika virus em macrófagos previamente infectados com dengue virus**. 2019. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Alfenas.

BRANDTZAEG, P.; FARSTAD, I. N. e HARALDSEN, G. Regional specialization in the mucosal immune system: primed cells do not always home along the same track. **Immunology today**, v. 20, n. 6, p. 267-277, 1999.

BRANDTZAEG, P. Mucosal and glandular distribution of immunoglobulin components: differential localization of free and bound SC in secretory epithelial cells. **The Journal of Immunology**, v. 112, n. 4, p. 1553-1559, 1974.

BRANDTZAEG, P. Role of secretory antibodies in the defence against infections. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 293, n. 1, p. 3-15, 2003.

BRANDTZAEG, P. Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. **Vaccine**, v. 25, n. 30, p. 5467-5484, 2007.

BREITFELD, P. P.; HARRIS, J. M. e MOSTOV, K. E. Postendocytotic sorting of the ligand for the polymeric immunoglobulin receptor in Madin-Darby canine kidney cells. **The Journal of cell biology**, v. 109, n. 2, p. 475-486, 1989.

BURTON, D. R. Immunoglobulin G: functional sites. **Molecular immunology**, v. 22, n. 3, p. 161-206, 1985.

BUTT, B. M. et al. Specific antibody to Haemophilus somnus in the bovine uterus following intramuscular immunization. **Infection and immunity**, v. 61, n. 6, p. 2558-2562, 1993.

CALAME, K. L. Plasma cells: finding new light at the end of B cell development. **Nature immunology**, v. 2, n. 12, p. 1103-1108, 2001.

CAN, M. F. et al. Estimation of production and reproductive performance losses in dairy cattle due to bovine herpesvirus 1 (BoHV1) infection. **Veterinarski Arhiv**, v. 86, p. 499-513, 2016.

CASCIO, K. E. et al. Encephalitis induced by bovine herpesvirus 5 and protection by prior vaccination or infection with bovine herpesvirus 1. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, n. 2, p. 134-139, 1999.

CERQUEIRA, R. B. et al. Serological survey for bovine herpesvirus 1 in cattle from different regions in the state of Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 6, p. 0-0, 2000.

CERUTTI, A. The regulation of IgA class switching. **Nature reviews immunology**, v. 8, n. 6, p. 421-434, 2008.

CHAGAS, S. R. et al. Vacinas e suas reações adversas: revisão. **Pubvet**, v. 13, p. 153, 2019.

CHOWDHURY, S. I. et al. BoHV-1-Vectored BVDV-2 Subunit Vaccine Induces BVDV Cross-Reactive Cellular Immune Responses and Protects against BVDV-2 Challenge. **Vaccines**, v. 9, n. 1, p. 46, 2021.

COSTA, E. P. et al. BoHV-1 (o vírus da IBR) e sua relação com estruturas e órgãos genitais da fêmea bovina. 2017.

COX, J. C. e COULTER, A. R. Adjuvants- a classification and review of their modes of action. **Vaccine**, v. 15, p. 248-256, 1997.

CRESPO, S. E. I. et al. Caracterização molecular de bohv-1.1 em touros com balanopostite pustular infecciosa. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 3, p. 117-120, 2016.

CRUVINEL, W. de M. et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010.

CURTAIN, C. C.; CLARK, B. L. e DUFTY, J. H. The origins of the immunoglobulins in the mucous secretions of cattle. **Clinical and experimental immunology**, v. 8, n. 2, p. 335, 1971.

CZERKINSKY, C. e HOLMGREN, J. Topical immunization strategies. **Mucosal immunology**, v. 3, n. 6, p. 545-555, 2010.

ÇUBURU, N. et al. Sublingual immunization induces broad-based systemic and mucosal immune responses in mice. **Vaccine**, v. 25, n. 51, p. 8598-8610, 2007.

DA SILVA CAMPOS, M. J. et al. O papel da imunoglobulina A secretora no mecanismo de defesa da mucosa bucal. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 11, n. 1, p. 139-143, 2011.

DEGHAN, S. et al. Rabbit nasal immunization against influenza by dry-powder form of chitosan nanospheres encapsulated with influenza whole virus and adjuvants. **International journal of pharmaceutics**, v. 475, n. 1-2, p. 1-8, 2014.

DEJUCQ, N. e JÉGOU, B. Viruses in the mammalian male genital tract and their effects on the reproductive system. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 65, n. 2, p. 208-231, 2001.

DELHON, G. et al. Genome of bovine herpesvirus 5. **Journal of virology**, v. 77, n. 19, p. 10339-10347, 2003.

DENNEHY, P. H. Rotavirus infection: an update on management and prevention. **Advances in pediatrics**, v. 59, n. 1, p. 47-74, 2012.

DI TOMMASO, A. et al. Induction of antigen-specific antibodies in vaginal secretions by using a nontoxic mutant of heat-labile enterotoxin as a mucosal adjuvant. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 3, p. 974-979, 1996.

DUDZIAK, D. et al. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. **Science**, v. 315, n. 5808, p. 107-111, 2007.

EDELMAN, R. e TACKET, C. O. Adjuvants. **International reviews of immunology**, v. 7, n. 1, p. 51-66, 1990.

EHRENSTEIN, M. R. e NOTLEY, C. A. The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 11, p. 778-786, 2010.

ELIAS, F.; SCHILD, A. L. e RIET-CORREA, F. Meningoencefalite e encefalomalacia por Herpesvírus bovino-5: distribuição das lesões no sistema nervoso central de bovinos naturalmente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 3, p. 123-131, 2004.

ENGELS, M.; ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Veterinary microbiology**, v. 53, n. 1-2, p. 3-15, 1996.

FERREIRA, R. C. et al. Overview on Inhalable Nanocarriers for Respiratory Immunization. **Current pharmaceutical design**, v. 23, n. 40, p. 6160-6181, 2017.

FERREIRA, H. C. C. et al. Latent bovine herpesvirus 1 and 5 in milk from naturally infected dairy cattle. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 80, n. 11, p. 1787-1790, 2018.

FINO, T. C. M. et al. Infecções por herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e suas implicações na reprodução bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 2, p. 122-127, 2012.

FISCHER, G. et al. Imunomodulação produzida por extrato de própolis verde nas respostas humoral e celular de camundongos imunizados com SuHV-1. **Vaccine**, v. 25, n. 7, p. 1250-1256, 2007.

FLORES, E. F. et al. **Virologia Veterinária**, 2 ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 2017, 1133f.

GALLICHAN, W. S. et al. Intranasal immunization with CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant dramatically increases IgA and protection against herpes simplex virus-2 in the genital tract. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 5, p. 3451-3457, 2001.

GALLICHAN, W. S. e ROSENTHAL, K. L. Specific secretory immune responses in the female genital tract following intranasal immunization with a recombinant adenovirus expressing glycoprotein B of herpes simplex virus. **Vaccine**, v. 13, n. 16, p. 1589-1595, 1995.

GEBRIL, A. et al. Optimizing efficacy of mucosal vaccines. **Expert review of vaccines**, v. 11, n. 9, p. 1139-1155, 2012.

GOMBART, A. F.; HIRANO, A. e WONG, T. C. Conformational maturation of measles virus nucleocapsid protein. **Journal of virology**, v. 67, n. 7, p. 4133-4141, 1993.



GRÜTZENMACHER, S. et al. Comparative investigations of anatomy and physiology in mammalian noses (Homo sapiens--Artiodactyla). **Rhinology**, v. 49, n. 1, p. 18-23, 2011.

GUPTA, R. K. e SIBER, G. R. Adjuvant for human vaccines- current status, problems and future prospects. **Vaccine**, v. 13, p. 1263-1276, 1995.

HAN, I. et al. Thermosensitive and mucoadhesive delivery systems of mucosal vaccines. **Methods**, v. 38, n. 2, p. 106-111, 2006.

HANNANT, D. Mucosal immunology: overview and potential in the veterinary species. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 87, n. 3-4, p. 265-267, 2002.

HANEBERG, B. et al. Induction of specific immunoglobulin A in the small intestine, colon-rectum, and vagina measured by a new method for collection of secretions from local mucosal surfaces. **Infection and immunity**, v. 62, n. 1, p. 15-23, 1994.

HENZEL, A. et al. Bovine alphaherpesvirus 1 and 5 in semen from bulls presenting genital lesions under field conditions in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 1, p. 197-203, 2019.

**HIPRA**. HIPRABOVIS® IBR MARKER LIVE. Disponível em: <[https://www.hipra.com/wcm/connect/hipra/078a8059-344c-4598-97f1-de946c261067/HIPRABOVIS-IBR-ML-AM-BR-IL726443-00.1%282%29.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=ROOTWORKSPACE.Z18\\_GG50HI40O8ABD0Q8OC940F2000-078a8059-344c-4598-97f1-de946c261067-n3FgSNf](https://www.hipra.com/wcm/connect/hipra/078a8059-344c-4598-97f1-de946c261067/HIPRABOVIS-IBR-ML-AM-BR-IL726443-00.1%282%29.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=ROOTWORKSPACE.Z18_GG50HI40O8ABD0Q8OC940F2000-078a8059-344c-4598-97f1-de946c261067-n3FgSNf)>. Acesso em Dez. 20, 2020.

HOGENESCH, H. et al. Optimizing the utilization of aluminum adjuvants in vaccines: you might just get what you want. npj **Vaccines**, v. 3, n. 1, p. 1-11, 2018.

HOLMGREN, J. e CZERKINSKY, C. Mucosal immunity and vaccines. **Nature medicine**, v. 11, n. 4, p. S45-S53, 2005.

HUSBAND, A. J. Mucosal memory—maintenance and recruitment. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 87, n. 3-4, p. 131-136, 2002.

**International Committee on Taxonomy of Viruses**. (2020). Relatório ICTV, Vírus dsDNA, Herpesvirales. Autores: Pellett, PE, Davison, AJ, Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, GS, Lacoste, V., Minson, AC, Nicholas, J., Roizman, B., Studdert, MJ e Wang, F. Disponível em: <[https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna\\_viruses/89/herpesvirales](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/89/herpesvirales) > Acesso em: Set. 20, 2020.

IWASAKI, A. Mucosal dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, v. 25, p. 381-418, 2007.

IWASAKI, A. Antiviral immune responses in the genital tract: clues for vaccines. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 10, p. 699-711, 2010.

JONES, C. e CHOWDHURY, S. A. review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. **Papers in Veterinary and Biomedical Science**, p. 99, 2008.

JONES, C. et al. Regulation of the latency–reactivation cycle by products encoded by the bovine herpesvirus 1 (BHV-1) latency-related gene. **Journal of neurovirology**, v. 17, n. 6, p. 535-545, 2011.

JOSHI, T.; BUTCHAR, J. P. e TRIDANDAPANI, S. Fcγ receptor signaling in phagocytes. **International journal of hematology**, v. 84, n. 3, p. 210-216, 2006.

KOZLOWSKI, P. A. et al. Comparison of the oral, rectal, and vaginal immunization routes for induction of antibodies in rectal and genital tract secretions of women. **Infection and immunity**, v. 65, n. 4, p. 1387-1394, 1997.

KUNKEL, E. J. e BUTCHER, E. C. Plasma-cell homing. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 10, p. 822-829, 2003.

KUPFERSCHMIED, H. U. et al. Transmission of IBR/IPV virus in bovine semen: a case report. **Theriogenology**, v. 25, n. 3, p. 439-443, 1986.

KWEON, C. et al. Bovine herpes virus expressing envelope protein (E2) of bovine viral diarrhea virus as a vaccine candidate. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 61, n. 4, p. 395-401, 1999.

LAMBRECHT, B. N. e HAMMAD, H. Lung dendritic cells in respiratory viral infection and asthma: from protection to immunopathology. **Annual review of immunology**, v. 30, p. 243-270, 2012.

LAMM, M. E. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. **Annual review of microbiology**, v. 51, n. 1, p. 311-340, 1997.

LANNING, D. K. et al. Intestinal bacteria and development of the B-lymphocyte repertoire. **Trends in immunology**, v. 26, n. 8, p. 419-425, 2005.

LIMA, R. **Desenvolvimento de revestimentos de nanopartículas para administração oral**. 119f. Dissertação (Mestrado em Biofísica e Bionanosistemas) – Programa de Pós-Graduação em Biofísica, Universidade do Minho, Escola de Ciências, 2015.

LUNARDI, M. et al. Neurological and epidemiological aspects of a BoHV-5 meningoencephalitis outbreak. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. SPE, p. 77-85, 2009.

MACHADO, P. R. L. et al. Immune response mechanisms to infections. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 6, p. 647-662, 2004.

MACPHERSON, A. J. et al. The immune geography of IgA induction and function. **Mucosal immunology**, v. 1, n. 1, p. 11-22, 2008.

MAIDANA, S. S. et al. Characterization of BoHV-5 field strains circulation and report of transient specific subtype of bovine herpesvirus 5 in Argentina. **BMC veterinary research**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2011.

MASRI, S. A. et al. Rapid detection of bovine herpesvirus 1 in the semen of infected bulls by a nested polymerase chain reaction assay. **Canadian journal of veterinary research**, v. 60, n. 2, p. 100, 1996.

MASSITEL, J. L. et al. Presence of BoHV-5 genome in cerebrospinal fluid of cattle with herpetic meningoencephalitis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 2, p. 548-552, 2016.

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

MAYR, A. et al. Virologische Arbeitsmethoden-Band IV-Sicherheit bei virologischen arbeiten-Biometrische Methoden. 1982. **Stuttgart: Gustav Fischer Verlag**.

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

MERCHIORATTO, I. et al. Immunogenicity in sheep of Uruguayan commercial vaccines against bovine alphaherpesvirus 1, 5 and bovine pestiviruses. **Ciência Rural**, v. 50, n. 4, 2020.

MESQUITA JÚNIOR, D. et al. Sistema imunitário-parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 5, p. 552-580, 2010.

MESTECKY, J. The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. **Journal of clinical immunology**, v. 7, n. 4, p. 265-276, 1987.

MITRAGOTRI, S. Immunization without needles. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 12, p. 905-916, 2005.

MOSTOV, K. E. e DEITCHER, D. L. Polymeric immunoglobulin receptor expressed in MDCK cells transcytoses IgA. **Cell**, v. 46, n. 4, p. 613-621, 1986.

MULIRA, G. L. e SAUNDERS, J. R. Humoral and secretory antibodies to *Ureaplasma diversum* in heifers following subcutaneous vaccination and vaginal infection. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 58, n. 2, p. 104, 1994.

MUYLKENS, B. et al. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary research**, v. 38, n. 2, p. 181-209, 2007.

NANDI, S. et al. Bovine herpes virus infections in cattle. **Animal Health Research Reviews**, v. 10, n. 1, p. 85, 2009.

NEUTRA, M. R. e KOZLOWSKI, P. A. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. **Nature reviews immunology**, v. 6, n. 2, p. 148-158, 2006.

NOCHI, T. et al. A novel M cell-specific carbohydrate-targeted mucosal vaccine effectively induces antigen-specific immune responses. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 12, p. 2789-2796, 2007.

OCHOA, M. El sistema inmunológico de las mucosas. **Revista Cubana de Medicina General Integral**, v. 18, n. 5, p. 352-354, 2002.

OLIVEIRA, C. A. de et al. Avaliação bioquímica e ultraestrutural da interação de imunocomplexos de IgG com leucócitos polimorfonucleares: efeito de antioxidantes naturais. **Eclética Química**, v. 27, n. SPE, p. 273-284, 2002.

OLIVEIRA, M. T. et al. Detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in semen from Brazilian bulls. **Theriogenology**, v. 75, n. 6, p. 1139-1145, 2011.

PARR, E. L. e PARR, M. B. A comparison of antibody titres in mouse uterine fluid after immunization by several routes, and the effect of the uterus on antibody titres in vaginal fluid. **Reproduction**, v. 89, n. 2, p. 619-625, 1990.

PARR, E. L. e PARR, M. B. Immune responses and protection against vaginal infection after nasal or vaginal immunization with attenuated herpes simplex virus type-2. **Immunology**, v. 98, n. 4, p. 639-645, 1999.

PASTORET, P. et al. Bovid herpesvirus 1 infection of cattle: pathogenesis, latency, consequences of latency. **Annales de Recherches Vétérinaires**. 1982. p. 221-235.

PAVOT, V. et al. New insights in mucosal vaccine development. **Vaccine**, v. 30, n. 2, p. 142-154, 2012.

PEJAKOVIĆ, S. et al. Role of DNA methylation and CpG sites in the viral telomerase RNA promoter during Gallid herpesvirus 2 pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 94, n. 23, 2020.

PEREIRA, R. R. A. **Desenvolvimento e caracterização de sistema mucoadesivo termossensível contendo micropartículas de própolis para potencial tratamento de candidíase vulvovaginal**. 172f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil, 2011.

PETER C. M. et al. Desenvolvimento e imunogenicidade de uma vacina inativada de aplicação intravaginal contra o Alpha herpesvirus bovino tipo 1 em associação ao espermatozoide inativado do *Bacillus toyonensis*. In: 5ª Semana Integrada da UFPel, 1. 2019, Pelotas, RS. **Anais do XXI Encontro de Pós Graduação – ENPÓS**, Pelotas: Pro-reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2019, v.1. 4p.

PETRINI, S.; ISCARO, C. e RIGHI, C. Antibody responses to bovine alphaherpesvirus 1 (BoHV-1) in passively immunized calves. **Viruses**, v. 11, n. 1, p. 23, 2019.

PHALIPON, A. et al. Secretory component: a new role in secretory IgA-mediated immune exclusion in vivo. **Immunity**, v. 17, n. 1, p. 107-115, 2002.

RESENDE, F. C. B. et al. Adjuvantes de vacinas: possibilidades de uso em seres humanos ou animais. **Revista brasileira de alergia e imunopatologia**, p. 116, 2003.  
RIMANIOL, A. et al. In vitro interactions between macrophages and aluminum-containing adjuvants. **Vaccine**, v. 25, n. 37-38, p. 6784-6792, 2007.

RISSE, D. R. et al. Meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 7, p. 251-260, 2007.

RODRIGUEZ, J. M. et al. Feline herpesvirus pneumonia: investigations into the pathogenesis. **Veterinary pathology**, v. 54, n. 6, p. 922-932, 2017.

ROUSE, B. T. e BABIUK, L. A. Mechanisms of recovery from Herpesvirus infections-a review. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 42, n. 4, p. 414, 1978.

RUPPRECHT, C. E. et al. Oral vaccination of dogs with recombinant rabies virus vaccines. **Virus research**, v. 111, n. 1, p. 101-105, 2005.

SAHDEV, P. et al. Biomaterials for nanoparticle vaccine delivery systems. **Pharmaceutical research**, v. 31, n. 10, p. 2563-2582,

SILVA, L. C. da et al. Avaliação da capacidade adjuvante do cloreto de dimetildioctadecilamônio associado ao hidróxido de alumínio na indução da resposta imune humoral de bovinos vacinados com o vírus da diarreia viral bovina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 3, p. 201-206, 2004.

SILVA, M. S. et al. Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987-2006). **Pesqui. vet. bras**, p. 403-408, 2007.

SOLÉ, E. et al. Transforming growth factor beta induces IgA production and acts additively with interleukin 5 for IgA production. **The Journal of experimental medicine**, v. 170, n. 4, p. 1415-1420, 1989.

SONG, J. et al. Sublingual vaccination with influenza virus protects mice against lethal viral infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 5, p. 1644-1649, 2008.

TAKAHASHI, I. et al. New horizon of mucosal immunity and vaccines. **Current opinion in immunology**, v. 21, n. 3, p. 352-358, 2009.

TEMPESTA, M. et al. Caprine herpesvirus 1 vaccine with the LTK63 mutant as a mucosal adjuvant induces strong protection against genital infection in goats. **Vaccine**, v. 25, n. 46, p. 7927-7930, 2007.

TEZUKA, H. et al. Prominent role for plasmacytoid dendritic cells in mucosal T cell-independent IgA induction. **Immunity**, v. 34, n. 2, p. 247-257, 2011.

THIRY, J. et al. Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. **Veterinary research**, v. 37, n. 2, p. 169-190, 2006.

TIZARD, I. **Vaccines for Veterinarians**. St Louis: Missouri, 2019. 1v.

TOCHIKUBO, K. et al. A subunidade B da toxina da cólera recombinante atua como um adjuvante para as respostas da mucosa e sistêmica de camundongos à albumina de soro bovino co-administrada por via mucosa. **Vaccine**, v. 16, n. 2-3, p. 150-155, 1998.

**United States Government Publishing Office** (2014). Code of Federal Regulations, Animal and animal products. 9 CFR 113.215 - Bovine virus diarrhea vaccine, killed virus. v.1, chapter I, subchapter E, part 113, section 113.215/216. Disponível em: <[http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/CFR-2012-title9\\_vol1/xml/CFR2012-title9-vol1sec113-215.xml](http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/CFR-2012-title9_vol1/xml/CFR2012-title9-vol1sec113-215.xml)>. Acesso em: Set. 06, 2020.

VAN ENGELENBURG, F. A. et al. Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 12, p. 3129-3135, 1993.

VAN EGMOND, M. et al. IgA and the IgA Fc receptor. **Trends in immunology**, v. 22, n. 4, p. 205-211, 2001.

VAN LOOKEREN CAMPAGNE, M.; WIESMANN, C. e BROWN, E. J. Macrophage complement receptors and pathogen clearance. **Cellular microbiology**, v. 9, n. 9, p. 2095-2102, 2007.

VIEIRA, S. et al. Anticorpos para o herpesvírus bovino 1 (BHV-1) em bovinos do Estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 4, n. 2, p. 131-137 2003.

WANG, L. et al. Expression of the genomic form of the bovine viral diarrhea virus E2 ORF in a bovine herpesvirus-1 vector. **Virus genes**, v. 27, n. 1, p. 83-91, 2003.

WINKELMANN, E. R. et al. Production and characterization of monoclonal antibodies to a bovine herpesvirus type 1 strain defective on the glycoprotein c. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1066-1072, 2007.

WOOF, J. M. e KERR, M. A. The function of immunoglobulin A in immunity. **The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland**, v. 208, n. 2, p. 270-282, 2006.

ZAJAC, M. P. D. M. et al. Biologia do herpesvírus bovino 5. **The Veterinary Journal**. V. 184, n. 2, p. 138-145, 2010.

ZAROS, L. G. et al. Quantification of bovine cytokine gene expression using real-time RT-PCR methodology. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 575-579, 2007.

ZARZAUR, B. L. e KUDSK, K. A. The mucosa-associated lymphoid tissue structure, function, and derangements. *Shock* (Augusta, Ga.), v. 15, n. 6, p. 411-420, 2001.

ZIDUO, L. et al. CD83: Activation marker for antigen presenting cells and its therapeutic potential. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 1312, 2019.

**ZOETIS.** CATTLEMASTER®4. Disponível em:<  
<https://www.zoetis.com.br/especies/bovinos/cattlemaster-4.aspx>> . Acesso em: Dez.  
20, 2020.

## **Anexos**



## Anexo I - Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal



Pelotas, 08 de agosto de 2017

### Certificado

Certificamos que a proposta intitulada "Vacinas de mucosa contra o Herpesvirus bovino: desenvolvimento e avaliação de diferentes formulações", registrada com o nº 23110.004918/2017-32, sob a responsabilidade de Geferson Fischer - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 10/07/2017.

Finalidade	( X ) Pesquisa	( ) Ensino
Vigência da autorização	Início: 11/2017	Término: 10/2020
Espécie/linhagem/raça	Bovina / Braford	
Nº de animais	140	
Idade	3-24 meses	
Sexo	Feminino	
Origem	Fazenda – Agropecuária Yvyoporã em Pedro Osório/RS	

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao COBALTO para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 4918-2017).

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix  
Presidente da CEEA

Ciente em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ /2017

Assinatura do Professor Responsável: \_\_\_\_\_