

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de veterinária
Colegiado de pós-graduação em Ciência Animal

**Herpesvírus Bovino em complexos *cumulus*-oócitos
e fluido folicular em vacas
sorologicamente positivas**

André Penido Oliveira

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2014

André Penido Oliveira

Herpesvírus Bovino em complexos *cumulus*-oócitos e fluido folicular em vacas sorologicamente positivas

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Rômulo Cerqueira Leite
Coorientação: Edel Figueiredo Stancioli Barbosa
Marc Roger Jean Marie Henry

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2014

O48h Oliveira, André Penido, 1980-
Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) em complexos *cumulus*-oócitos e fluido folicular em vacas sorologicamente positivas / André Penido Oliveira. – 2016. 47p. : il.

Orientador: Rômulo Cerqueira Leite

Co-orientadores: Edel Figueiredo Stancioli Barbosa; Marc Roger Jean Marie Henry

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Bovino – Reprodução – Teses. 2. Herpesvirus 1 bovino – Teses. 3. Oócitos – Teses. 4. Biotecnologia animal – Teses. I. Leite, Rômulo Cerqueira. II. Barbosa, Edel Figueiredo Stancioli. III. Henry, Marc Roger Jean Marie. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

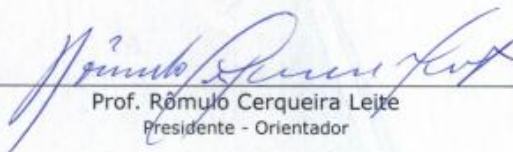
CDD – 636.208 969 2

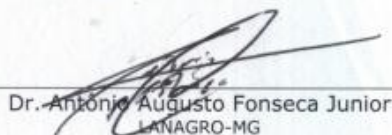
FOLHA DE APROVAÇÃO

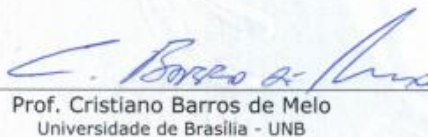
ANDRÉ PENIDO OLIVEIRA

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau e Doutor em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Medicina Veterinária Preventiva.

Aprovada em 25 de setembro de 2014, pela banca constituída pelos membros:

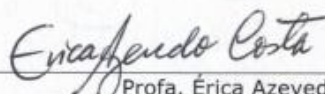

Prof. Rômulo Cerqueira Leite
Presidente - Orientador


Dr. Antônio Augusto Fonseca Junior
LANAGRO-MG


Prof. Cristiano Barros de Melo
Universidade de Brasília - UNB



Profª. Camila da Silva Frade
Unisaesiano - Lins/São Paulo



Profa. Érica Azevedo Costa
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

AGRADECIMENTOS

Muito se passou até esse momento, a escolha de uma profissão e a intenção de ser cada vez mais qualificado buscando sempre exercer de forma mais eficiente a academia e a sociedade só é possível junto à família, amigos, mestres e colegas de profissão.

Portanto, agradeço inicialmente minha família e especialmente minha esposa Paula que sempre esteve do meu lado nos momentos de alegria e dificuldades. Linda muito dessa tese é sua!!!!

Ao professor Rômulo Cerqueira Leite, minha maior inspiração e meu guia científico.

Aos colegas do retrolab e todos que fizeram parte dessa jornada e aos professores Marc, Edel, Luís Lago e tantos outros que sempre me auxiliaram e tanto me ensinaram!

Agradeço também à EPAMIG, empresa que sempre me apoiou e acreditou na minha capacidade e vontade.

Por último nessa reta final, agradeço imensamente aos doutores Daniel e Renata Veronese pelo apoio e dedicação que desprenderam nessa reta final.

Dedico essa tese a doutora Magali D'Angelo, pioneira no Brasil nessa linha de pesquisa e com certeza uma das pessoas mais lindas que já conheci e que infelizmente nos deixou precocemente... mas nos conformamos sabendo que o céu ganhou mais uma estrela.

**“Um passo a frente e você já não está mais no mesmo lugar”
Chico Science (1996)**

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Biotecnologias da reprodução no Brasil.....	12
2.2 Potencial de transmissão viral por gametas, embriões, sêmen e meios de cultura de origem animal.....	13
2.3 Irrigação, inervação e foliculogenese.....	13
2.4 Efeitos da dexametasona na reprodução animal e sistema imune.....	15
2.5 Herpesvírus Bovino.....	15
2.5.1 Latência viral.....	16
2.5.5 Diagnóstico viral e sorológico.....	16
2.5.6 Interação e interferência dos BoHVs, nos tecidos e processos reprodutivos.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Local e população experimental.....	18
3.2 Protocolo de indução de estresse.....	19
3.3 Coleta de amostras e avaliações.....	19
3.3.1 Avaliação clínica.....	19
3.3.2 Coletas de sangue.....	19
3.3.3 Coletas de complexos cumulus-oócito (CCOs) e fluido folicular (FF).....	19
3.3.4 Coleta de raspados nasais e vaginais.....	20
3.3.5 Isolamento viral.....	20
3.3.6 Extração de DNA viral de amostras.....	21
3.3.7 PCR em tempo real.....	21
3.3.8. Soroneutralização.....	21
3.4 Análise estatística.....	21
4 RESULTADOS	22
4.1 Avaliações clínicas e comportamentais.....	22
4.2 Alterações das mucosas.....	22
4.3 Avaliações hematológicas.....	25
4.4 Avaliações sorológicas.....	26
4.5 Resultados de isolamento viral.....	27
4.6 Resultados de raspado nasal e vaginal.....	27
4.7 Resultados da PCR tempo real em CCOs e FF.....	29
5 DISCUSSÃO	30
6 CONCLUSÃO	35
7 APOIO	36
8 REFERÊNCIAS	36
9 ANEXO 1- Análises estatísticas	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Isolamento viral em células CRIB	27
----------	----------------------------------------	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Cronograma de coletas e a aplicações de dexametasona	19
Figura 2	Frequência das lesões nasal para os grupos tratados e não tratados durante o período experimental	23
Figura 3	Frequência da lesão vaginal para os grupos tratados durante o período experimental.	23
Figura 4	Progressão e caracterização de lesão nasal de um animal pertencente ao grupo tratado.	24
Figura 5	Progressão e caracterização de lesão vaginal de dois animais pertencentes ao grupo tratado.....	25
Figura 6	Leucograma dos animais dos grupos tratado e não tratados.....	26
Figura 7	Soroneutralização entre os grupos para BoHV-1	26
Figura 8	Efeito citopático em células CRIB infectadas com BoHV	27
Figura 9	Resultados da PCR Tempo Real para raspado nasal	28
Figura 10	PCR Tempo Real em log10 do n° de cópias por µL no raspado vaginal dos grupos tratado e não tratados	28
Figura 11	Resultado para PCR Tempo Real em amostras de CCOs	29
Figura 12	Resultado PCR tempo real para as amostras de fluido folicular	29

RESUMO

O Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) é um vírus de grande ocorrência nos rebanhos bovinos, levando a perdas produtivas e econômicas. O aumento da utilização das tecnologias de reprodução assistida em fêmeas é uma realidade no agronegócio mundial, sendo o Brasil o maior produtor de embriões produzidos *in vitro* (PIVE) do mundo. Contudo, existe grande preocupação da transmissão de doenças por gametas e embriões, logo torna-se necessário melhor conhecimento sobre a presença do BoHV-1 em complexos *cumulus*-oócito (CCO) e fluido folicular (FF). O presente trabalho objetivou estudar o comportamento do vírus em doadoras de CCOs, sorologicamente positivas perante a presença do DNA viral nas mucosas nasal e vaginal, CCOs e FF em condições de manejo fidedignas à realidade nacional da produção de bovinos leiteiros. Utilizou-se de um protocolo de imunossupressão com dexametasona para induzir a recrudescência viral e a forma aguda da doença em animais naturalmente infectados pelo BoHV-1. Para tal, foram utilizadas 18 (n=18) fêmeas bovinas sorologicamente positivas e não vacinadas para serem doadoras de CCOs. Em 12 animais foi administrado dexametasona (0,1 mg/Kg/pv) durante cinco dias consecutivos, grupo tratado (GT). O restante dos animais recebeu solução salina nos mesmos momentos, compondo o grupo não tratado (GNT). Os grupos foram divididos em dois subgrupos (GT1, n=6; GT2, n=6; GNT1, n=3; GNT2, n=3) para a realização da aspiração folicular em intervalos de quatro dias para cada subgrupo, durante 20 dias. Os grupos GT1 e GNT1 foram avaliados nos dias 0, 4, 8, 12, 16, 20 e os grupos GT2 e GNT2 foram avaliados nos dias 2, 6, 10, 14, 18. Paralelamente as aspirações foliculares, exames clínicos foram realizados, assim como amostras de sangue para a soroneutralização e leucograma, raspados nasal e vaginal para a PCR tempo real e isolamento viral. Amostras de COCs e FF foram enviadas para PCR tempo real. Os resultados obtidos comprovam que houve recrudescência viral nos dois grupos experimentais. No GT o título de anticorpos neutralizantes aumentou em mais de quatro vezes, entretanto o GNT não apresentou alteração. Também foram observadas lesões características de herpes nas mucosas nasal e vaginal com uma maior frequência no GT do que no GNT. Os resultados da PCR tempo real dos raspados nasal e vaginal do GT demonstraram menor presença de DNA viral que o GNT. Porém nos CCOs e FF o GT apresentou maior quantidade de DNA viral que o GNT, entretanto com picos de detecção viral em momentos semelhantes. Foi observada uma alta correlação entre o raspado nasal e o FF, indicando uma possível viremia, portanto a pesquisa do BoHV-1 no raspado nasal de doadoras de CCOs pode ser uma possível estratégia para a seleção sanitária de doadoras. O trabalho demonstrou que independente da manifestação de sinais clínicos ou do aumento do título de anticorpos, animais sorologicamente positivos para BoHV-1 são fontes de contaminação de rebanhos e podem disseminar o vírus através de CCOs e FF.

ABSTRACT

The bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) is a highly prevalent virus in cattle herds, promoting productive and economic losses. The increase demand of the use to assisted reproductive technologies in bovine females is a reality in the global agribusiness. Brazil is the most important *in vitro* (IVP) embryos producer in the world. However, there is a concern of disease transmission from gametes and embryos, thus this subject becomes very important for research so it is very important to have a better knowledge about the presence of BoHV-1 in oocyte cumulus-complexes (COC) and follicular fluid (FF). The aim of this study was to investigate the presence of the BoHV-1 in serologically positive COCs donors, and the presence of viral DNA in nasal and vaginal mucosal, COCs and FF on the reliable conditions of Brazilian dairy cattle producing management. A protocol of immunosuppression with dexamethasone was used to inducing viral recrudescence and the acute phase of the disease in naturally BoHV-1 infected animals. Therefore, 18 serologically positive and not to be vaccinated COCs donors (n = 18) were used. A dexamethasone protocol (0.1 mg / kg / bw) was administered in 12 animals for five consecutive days, the treated group (GT). The remaining animals received saline solution at the same moment of GT, composing the untreated group (GNT). The groups were divided in two subgroups (GT1, n = 6; GT2, n = 6; GNT1, n = 3; GNT2, n = 3) to permit the OPU in four-days intervals for each subgroup during 20 days . The GT1 and GNT1 groups were evaluated on days 0, 4, 8, 12, 16, 20 and GT2 and GNT2 groups were evaluated on days 2, 6, 10, 14, 18 . Parallel to the OPU, clinical exams were performed, as well as collection of blood samples for serum neutralization and leukocyte evaluation, nasal and vaginal swabs for real time PCR and virus isolation. COCs and FF samples were send to real-time PCR. The results show that there was a viral recrudescence in both experimental groups. In GT the neutralizing antibody titres increased more four folds. Herpes characteristic lesions of were also observed in nasal and vaginal mucosa and it was more frequent in GT than in GNT. The results of real-time PCR of nasal and vaginal swabs demonstrated more presence of viral DNA that the GT. But the CCOs and the FF of GT showed higher amount of viral DNA that the GNT, however with peak viral detection on similar moments. A high correlation between the nasal swab and the FF was observed, indicating a possible viremia. The research of BoHV-1 in nasal swabs of COCs donors may be a possible strategy for a sanitary donor selection. The study also showed that despite of the manifestation of clinical signs or increased antibody titre from positive animals for BoHV-1 are sources of contamination for herds livestock and the virus can be spread through CCOs and FF.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país continental e possui o maior rebanho comercial do mundo. Produtos oriundos da exploração pecuária bovina brasileira, como leite e carne, são exportados para diversos países. Um produto adicional na realidade do agronegócio nacional é a exportação e importação de material genético superior para a produção de leite e carne, em forma de sêmen e embriões.

Grande parte do rebanho bovino brasileiro é de origem zebuína e seus cruzamentos, estudos de desempenho produtivo, seleção racial de características desejáveis como menor susceptibilidade a endo e ectoparasitas, adaptação ao clima tropical, precocidade sexual e fertilidade são preocupações e despertam o interesse dos setores comercial e científico brasileiros, visto o aumento internacional da demanda de material genético bovino brasileiro.

Aliadas para a difusão desse material genético são as biotecnologias da reprodução, uma vez que a produção *in vitro* de embriões e congelamento desse material para exportação é uma realidade.

Devido à grande extensão territorial e particularidades regionais, tais como temperatura, relevo, tamanho médio de propriedades e rebanhos e intensificação da produção, a implementação de programas de controle e erradicação de enfermidades prevalentes nas regiões tropicais é um grande desafio. Esse cenário dificulta a comercialização do material genético nacional devido às legislações impostas pelos países que os importa. Podemos destacar o desafio no controle de doenças bacterianas e virais para bovinos, tais como leptospirose, brucelose, tuberculose, raiva, neosporose, diarreia bovina a vírus, leucose enzoótica dos bovinos, rinotraqueíte infecciosa bovina, vulvovaginite e balanopostite infecciosa bovina e encefalite

herpética bovina, sendo as últimas três doenças citadas causadas pelos herpesvírus bovino (*Bovine herpesvirus 1* - BoHV-1, *Bovine herpesvirus 1.2* - BoHV-1.2 e *Bovine herpesvirus 5* - BoHV-5, respectivamente).

Essas enfermidades têm como característica a transmissão entre animais e rebanhos por contato direto e indireto por aerossóis e sêmen, possuindo grande ocorrência no rebanho nacional, causando prejuízos na produção e reprodução animal independente da aptidão.

O herpesvírus bovino hoje é foco de muitos estudos, uma vez que ainda não está completamente elucidado se o vírus pode ser transmitido por embriões produzidos *in vitro*. Caso seja transmitido, as vias mais prováveis seriam a associação ao complexo *cumulus*-oócito (CCO), sêmen e/ou meios para a produção *in vitro* de embriões bovinos.

O Brasil é o maior produtor mundial de embriões produzidos *in vitro*, portanto são de grande interesse estudos que avaliem o risco de transmissão de patógenos por embriões produzidos *in vitro*.

Logo, muitas questões precisam ser esclarecidas, já é provado que o BoHV-1 é capaz de infectar CCOs e FF, porém é fundamental saber a concentração de DNA viral presente na estrutura e fluido, em qual momento ocorrem os picos de concentração viral, a relação entre sinais clínicos e excreção viral pelas mucosas com a presença do vírus em CCOs e FF. Desta forma, será possível a criação de medidas preventivas minimizando o risco da transmissão de doenças por embriões.

O presente trabalho objetivou estudar o comportamento do vírus em doadoras de complexos *cumulus*-oócito, a presença do DNA viral nas mucosas nasal e vaginal, CCOs e fluido folicular (FF) em condições de manejo fidedignas à realidade nacional na

produção de bovinos leiteiros, utilizando um protocolo de imunossupressão com dexametasona para induzir a recrudescência viral e a forma aguda da doença em animais naturalmente infectados por BoHV-1.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Biotecnologias da reprodução no Brasil

A transferência de embriões bovinos (TE) no Brasil foi iniciada na década de 1970, primeiramente utilizando-se embriões importados e, posteriormente, coletados no país (RUBIN, 2005). A atividade desenvolveu-se gradualmente, assumindo grande importância econômica. Nos últimos 11 anos, a incorporação da tecnologia de produção *in vitro* de embriões (PIVE), a disponibilidade de terras e receptoras e programas já consagrados de melhoramento genético em touros zebuínos, o mercado da TE cresceu significativamente no Brasil.

Devida a essas características o país tornou-se o maior produtor mundial de embriões bovinos produzidos *in vitro*, respondendo por aproximadamente $\frac{1}{4}$ do total da produção de embriões e transferências realizadas no mundo (Viana e Camargo, 2007). Após um período de crescimento, a PIVE passou a ocupar o espaço anteriormente dominado pela TE convencional, atualmente o cenário possui uma produção mais estabilizada e controlada por grandes empresas, porém ainda em crescimento.

No Brasil a quase totalidade dos embriões produzidos *in vitro* comercialmente são gerados a partir de complexos *cumulus*-oócito (CCOs) recuperados pela técnica de aspiração folicular transvaginal guiada por ultra-sonografia, também chamada de aspiração folicular, em inglês “ovum pick-

up, OPU”. Esta técnica foi desenvolvida inicialmente para uso humano e adaptada na década de 80 para a obtenção de CCOs *in vivo* em bovinos, proporcionando menor trauma para a doadora (Pieterse *et al.*, 1991a e b), substituindo abordagens mais invasivas até então utilizadas, como a cirúrgica e a laparoscopia, sendo considerada hoje o procedimento de eleição para recuperação de oócitos para a PIVE de embriões bovinos (Galli *et al.*, 2001).

A atividade concentrou-se em raças zebuínas, com as transferências realizadas preferencialmente por embriões não congelados. A tendência do crescimento da PIVE no país ocorreu em função das características dos sistemas de produção nacional, para produção de carne e para produção de leite, semintensiva. Com a disponibilidade de receptoras, o valor de mercado dos produtos gerados pela PIVE e a necessidade de reprodutores de genética comprovada para a cobertura de vacas principalmente nos estados do Brasil central e norte, a produção de embriões *in vitro* se consolidou e atualmente domina o mercado de embriões no país. Na América do Norte, Europa e países asiáticos a produção de embriões ocorre principalmente em raças taurinas, com maior participação de raças leiteiras e as transferências são realizadas utilizando-se preferencialmente embriões produzidos *in vivo* e criopreservados (Thibier, 2006).

O uso de biotecnologias reprodutivas está consolidado no Brasil, e apresenta grande número de profissionais qualificados e capacidade instalada de laboratórios. Este cenário tem uma perspectiva positiva para a expansão da participação do país no mercado mundial de germoplasma bovino. Portanto, o risco de disseminação de doenças impacta o controle sanitário das doadoras de gametas e embriões.

2.2. Potencial de transmissão viral por gametas, embriões, sêmen e meios de cultura de origem animal

O surgimento e a recente expansão da produção de embriões bovinos *in vitro*, gerou uma fonte alternativa de contaminação (Lage, 1999) e criou uma nova demanda por critérios sanitários específicos para o uso desta técnica no deslocamento de material genético entre regiões (Oliveira, 2007). Além da transmissão do vírus poder ocorrer pelo sêmen e CCO, a PIVE apresenta outras fontes potenciais de transmissão viral, como as células do *cumulus* presentes no CCO assim como, os meios de cultivo embrionário e as células somáticas utilizadas no co-cultivo.

O risco associado ao co-cultivo pode ser minimizado com a utilização de linhagens de células estabilizadas ou meios quimicamente definidos (Vanroose *et al.*, 1999) que possam ser testados para a presença de patógenos antes de sua utilização (Gerin *et al.*, 1997). Contudo, este procedimento não elimina a necessidade da presença das células do *cumulus* nos CCOs, necessários para a maturação oocitária, onde segundo Tsuboi *et al.*, 1992, comprovadamente o vírus é capaz de replicar, por sua vez inviabilizando a realização dos procedimentos de lavagem em tripsina (Bielanski e Jordan, 1996), preconizados para a eliminação de agentes contaminantes em embriões obtidos pela produção *in vivo* de embriões (Stringfellow *et al.*, 1990).

Os meios utilizados na PIVE também podem ser fontes de contaminação viral, em função do contato direto com o embrião até o momento da transferência (Stringfellow e Givens, 2000). Produtos de origem biológica utilizados na PIVE, como soro fetal bovino (SFB) (Le Tallec, *et al.*, 2001), soro-albumina, hormônios e enzimas, representam uma fonte potencial de microrganismos patogênicos e não-

patogênicos. A troca do soro por BSA ou por meios pré-definidos diminui o risco sanitário para a presença do BHV-1 e BVDv, sendo ainda mais segura a substituição do soro por álcool polivinílico, hialuronato de sódio ou VF-5 surfactante (Gerin *et al.*, 1997). No entanto, o uso destas alternativas nos meios de cultivo, ainda apresentam resultados inferiores de produção e viabilidade embrionária na produção *in vitro* de embriões bovinos.

2.3. Irrigação, inervação e foliculogênese

O ovário mamífero é um órgão endócrino complexo, que possui duas funções principais, a produção de esteroides sexuais responsáveis por preparar a fêmea púber para a reprodução, ou seja, permitir o desenvolvimento das características sexuais secundárias e fornecer suporte para a gestação e a diferenciação e liberação de oócitos maduros em intervalos apropriados durante o período fértil para a propagação das espécies (Mcgee e Hsueh, 2000).

Estruturalmente, o ovário é composto por uma região medular e uma cortical. Na medula encontram-se principalmente tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos e nervos. Já o córtex ovariano é composto por folículos em diferentes fases, podendo ser, desde folículos primordiais em repouso até grandes folículos pré-ovulatórios. Além dos folículos, também estão presentes corpos lúteos e corpos albicans, distribuídos no estroma ovariano (Magoffin *et al.*, 2005).

A principal irrigação arterial do ovário é feita pela artéria ovárica, ramo direto da artéria aorta abdominal, surgindo do contorno ântero-lateral da aorta e logo abaixo das artérias renais, à altura do disco intervertebral L2/L3. A artéria ovárica percorre com obliquidade no sentido ífero-lateral sob o peritônio parietal posterior até atingir o ligamento suspensor do ovário no interior de seu tecido conjuntivo. A partir desse ponto, percorre até o final do

ligamento para bifurcar em artérias ovárica lateral e tubária lateral (Philocreon, 1999). Essa artéria recebe um ramo acessório ascendente das artérias uterinas, a artéria ovárica medial que se origina da artéria do fundo do útero onde se anastomosam criando um arco arterioso útero-ovárico ao longo do hilo do ovário (Zilligitt, 2009).

A drenagem ovariana, em sua origem, se constitui de uma rede complexa formada por vênulas. Como as artérias, essa rede advém de dois coletores, um coletor útero-ovárico, medial, drenado pelas veias uterinas e posteriormente pela veia íliaca interna e um coletor gonadal formado por numerosas veias ováricas anastomosadas, o plexo pampiniforme. Essas veias ocupam o ligamento suspensor do ovário, ascendem até a região lombo-aórtica, onde termina na veia cava inferior à direita e na veia renal à esquerda (Philocreon, 1999).

A inervação autônoma dos ovários é originada do 10^o e 11^o nervos torácicos. Esses nervos alcançam o plexo pré-aórtico com trajeto que acompanham a artéria ovárica, formando um plexo peri-arterial denso, cuja origem se confunde com a dos nervos dos rins (Rouvière, 1961). Contudo, a inervação dos ovários é apenas para as redes vasculares e não para a substância folicular (Van de Graaff, 2003).

A inervação somática, motora e sensitiva tem a mesma origem das outras vísceras abdominais, no plexo celíaco. As raízes nervosas destinadas aos ovários são provenientes de T10-T12 e L1. Enroladas em espiral e compõem pseudoplexo (Zilligitt, 2009).

Os diferentes tipos de folículos presentes no ovário são divididos em duas grandes classes; os folículos pré-antrais e os folículos antrais. Os folículos pré-antrais representam a fase inicial do desenvolvimento folicular e compreendem os folículos primordiais que são formados

no período fetal durante o segundo trimestre da gestação e são envolvidos por uma fina camada de células epiteliais granulosas em formato achatado, os folículos primários, envolvidos por células da granulosa em formato cuboidal e secundários, onde há a proliferação das mesmas (Britt, 2008). A partir de então, os folículos desenvolvem-se para o estágio terciário e passam a conter um antro repleto de fluido, o fluido folicular (Varguese *et al.*, 2008).

Sabe-se que um folículo dominante possui maior vascularização tecal e suprimento sanguíneo do que os folículos subordinados (Redmer e Reynolds, 1996), porém tanto os folículos primordiais como os primários recebem nutrientes e oxigênio por difusão passiva dos vasos sanguíneos do estroma ovariano e a formação de uma rede individual capilar em torno de cada folículo é necessária para que estes folículos possam crescer para além destas fases (Robinson *et al.*, 2009).

A neovascularização é crucial para crescimento de folículos antrais, dominância e desenvolvimento até atingir o estágio pré-ovulatório, uma vez que compostos antiangiogênicos reduzem a vascularização tecal e, conseqüentemente, comprometem severamente o desenvolvimento folicular (Robinson *et al.*, 2009). Assim, para que o crescimento folicular seja adequado, são necessários eficientes mecanismos compensatórios crescentes às necessidades dos folículos recrutados. Na fase secundária ou mais tarde, as células estromais que rodeiam os folículos se organizam em camadas da teca, em que a parte mais interna (teca interna) contém muitos vasos sanguíneos, enquanto a camada exterior (teca externa) é composta principalmente de tecido conjuntivo fibroso (Araújo *et al.*, 2011). Posteriormente, durante o aparecimento da cavidade antral, os folículos tornam-se rodeados por uma rede capilar, que promove a sua nutrição, inclusive das células da granulosa.

2.4. Efeitos da dexametasona na reprodução animal e sistema imune

Os corticosteroides ou corticoides são hormônios esteroides sintetizados a partir do colesterol na porção cortical das glândulas adrenais. Estes hormônios podem ser classificados como mineralocorticoides, glicocorticoides e esteroides sexuais (Spinosa *et al.*, 1999).

Os glicocorticoides possuem atividade antiinflamatória e imunossupressora, porém não é possível a dissociação destas duas características dos efeitos metabólicos gerais, como a ação sobre o metabolismo de carboidratos e de proteínas, mesmo em preparações sintéticas, muito embora a atividade antiinflamatória e imunossupressora tenha sido ampliada (Spinosa *et al.*, 1999).

A dexametasona, glicocorticoide sintético, é o fármaco de primeira escolha para a indução de uma terapia com corticoides, porém é o fármaco com maior potencial de causar efeitos colaterais durante uma terapia prolongada em cães e gatos (Muller, 1989), mostrou-se eficaz na redução dos efeitos provocados por endotoxemia experimental em equinos com lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*. Dentre os efeitos encontrados estão a temperatura retal diminuída, neutropenia, linfopenia e leucopenia, interferindo nos mediadores quimiotáticos e retendo os neutrófilos entre o endotélio e a membrana basal (Rosa *et al.*, 2003).

Na aplicação de altas doses um glicocorticoide pode ter feito imunossupressor sobre diferentes componentes da resposta imune em bovinos, incluindo neutrofilia, linfopenia, eosinopenia, redução da atividade mitogênica e ação citotóxica (Doherty *et al.*, 1995), assim como a redução na secreção de interferon- γ pelas células mononucleares e a

secreção de IgM pelas células B (Mallard *et al.*, 2009).

De acordo com Feldman e Nelson (1991), a aplicação de altas doses de um glicocorticoide de ação prolongada reduz a produção de anticorpos e Fekety (1992), demonstra os efeitos dos glicocorticoides em vários aspectos do sistema imune, como redução da ação dos macrófagos, monócitos e neutrófilos, deprimindo a fagocitose, respostas quimiotáticas e o ingresso dessas células até os sítios de inflamação.

Mallard *et al.* (2009) demonstraram a aplicação de dexametasona levou ao aparecimento de sinais clínicos em vacas que apresentavam mastite subclínica, possivelmente devido à imunossupressão.

Viguio e Liptrap (1990) demonstraram que altas doses de glicocorticoides administradas na metade do ciclo estral de vacas podem adiar o início do próximo estro. Este atraso pode ser atribuído a uma atividade luteal prolongada, contudo Broussard *et al.* (1997) demonstram que administração parenteral de dexametasona em vacas no período de diestro pode atrasar a transição para o estro, devido a inibição do crescimento folicular devido à interferência sobre a capacidade esteroidogênica do folículo em crescimento.

A frequência e amplitude dos pulsos de LH são diminuídas inibindo o desenvolvimento dos folículos e a produção de estradiol, embora a produção basal de LH não seja afetada (Broussard *et al.*, 1997) a dexametasona mimetiza os efeitos do cortisol na supressão da responsividade da pituitária ao GnRH (Breen e Karsch, 2006).

2.5. Herpesvírus Bovino:

A família *Herpesviridae* agrega uma gama de vírus que infectam diversas espécies animais. Estes vírus e sua interação com seus hospedeiros têm sido extensivamente estudados em espécies animais de relevância

econômica como ruminantes e em animais de companhia.

Pertencente à ordem Herpesvirales, esta família é dividida em três subfamílias: Herpesvirinae, Betaherpesvirinae, Gammaherpesvirinae, além de uma quarta subfamília ainda não completamente anotada.

Estes vírus possuem como propriedade biológica a indução de infecções latentes.

Na espécie bovina já foram descritos cinco herpesvírus, na subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Simplexvirus* está alocado o Herpesvírus bovino 2 (*Bovine herpesvirus 2* - BoHV-2), relacionado a quadros de mamelite herpética, causando lesão no teto e úbere; no gênero *Varicellovirus* estão alocados o Herpesvírus bovino 1 e Herpesvírus bovino 5 (Donofrio *et al.*, 2007).

Os herpesvírus bovinos estão presentes em rebanhos bovinos de forma ampla, com ocorrência descrita em gado leiteiro e de corte, criados de forma intensiva ou extensiva. Como importantes agentes na bovinocultura, destacam-se o BoHV-1 e BoHV-5 (Davinson *et al.*, 2009).

O BoHV-1 infecta bovinos domésticos e selvagens, sendo dividido em subtipos: BoHV-1.1, BoHV-1.2a e BoHV-1.2b (Muylkens *et al.*, 2007) os quais estão associados principalmente com três síndromes clássicas, a rinotraqueite infecciosa bovina (IBR), vulvovaginite pustular infecciosa (IPV) e balanopostite pustular infecciosa (IPB), respectivamente (Meyer *et al.*, 2001), além de outras desordens reprodutivas caracterizadas por morte embrionária e fetal, aborto e mortalidade neonatal (Takiuchi *et al.*, 2005).

2.5.1. Latência viral:

Após a infecção primária com BoHV-1 os animais tornam-se portadores latentes, e o vírus estabelece a latência em neurônios sensoriais do sistema nervoso periférico (Muylkens *et al.*, 2007), porém, o local da latência depende do sítio primário de infecção. Infecções respiratórias ou orais resultam em latência nos neurônios sensoriais do gânglio trigêmeo e infecções genitais em gânglios sacrais (Pastoret *et al.*, 1982). Embora o principal sítio de latência seja os neurônios ganglionares, há evidências de que a latência e reativação virais podem ocorrer dentro de centros germinativos e tonsilas palatinas (Winkler *et al.*, 2002).

A latência é caracterizada pela ausência da replicação viral e sinais clínicos, dependendo da supressão da expressão dos genes alfa (Winkler *et al.*, 2002). Animais examinados durante a infecção latente não apresentam indícios de infecção, com exceção da presença de anticorpos produzidos em resposta à infecção aguda (Muylkens *et al.*, 2007).

Após a ocorrência de um estímulo natural ou tratamento com corticosteroides a reativação viral ocorre em animais infectados (Vogel *et al.*, 2003) e os vírions produzidos são transportados pelas mesmas vias nervosas de volta aos sítios de infecção primária, onde os vírus se replicam intensamente e voltam a ser excretados, podendo infectar animais susceptíveis.

2.5.2. Diagnóstico viral e sorológico

O diagnóstico dos herpesvírus bovinos deve ser primeiramente realizado baseando-se no histórico do rebanho, avaliação de sinais clínicos e observação das lesões encontradas. No entanto, a suspeita clínica tem que ser validada pelo diagnóstico

laboratorial. Durante a infecção o diagnóstico pode ser realizado através de coleta de materiais como raspado nasal e vaginal, ocular, prepúcial e feto abortado (Claus *et al.*, 2005). O isolamento viral, embora seja uma técnica considerada padrão-ouro, é bastante trabalhosa, consumindo tempo e requer pessoal especializado.

No diagnóstico indireto a PCR é considerada uma técnica rápida, específica e sensível para o diagnóstico dos herpesvírus bovino, e menos trabalhosa comparada ao isolamento viral, não sendo ainda necessário que a partícula viral infectante (Wang *et al.*, 2007). É importante destacar que a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) já preconiza o teste do BoHV-1 por PCR no sêmen, sendo a última revisão do Código Sanitário para os Animais Terrestres editada em 2014.

2.5.3. Interação e interferência dos BoHVs, nos tecidos e processos reprodutivos

Os herpesvírus são frequentemente associados aos tecidos, fluidos e células reprodutivas, podendo ser encontrados nos oócitos (Bielanski *et al.*, 1993), fluido folicular (Givens e Marley, 2008), células da granulosa (Tanghe *et al.*, 2005), oviduto e também associados ao plasma seminal ou aderidos às células espermáticas (Tanghe *et al.*, 2005).

Nos embriões, o vírus pode estar aderido à zona pelúcida ou mesmo no seu interior, neste caso podendo levar a degeneração do mesmo (Makarevich *et al.*, 2007). Apesar de um embrião degenerado não ser capaz de gerar uma gestação, o processo de transferência de embriões, representa um fator de risco.

O processo de fertilização pode ser afetado pela degeneração do oócito, ou pela interferência na fusão espermatozoide-oócito

devido à interação com os complexos de carboidratos como, em bovinos, a p-aminofenil derivada da d-manose, sulfato de dextran, fibronectina e vitronectina (Tanghe *et al.*, 2004), bloqueando a fusão espermatozoide – oócito. Desta forma, o BoHV-1 estaria envolvido nas falhas reprodutivas não apenas causando abortos, redução da produção de progesterona, oóforites e infertilidade transitória (Engels e Ackermann, 1996) como também no processo de fertilização, pois as glicoproteínas são necessárias não apenas ao processo de fusão dos gametas como também à penetração viral nos mesmos (Yoshitake *et al.*, 2007).

Vanroose *et al.* (2000) demonstraram que a utilização de espermatozoides previamente incubados com BoHV-1, na FIV, promoveu uma redução de até 60% no número de espermatozoides aderidos na ZP, quando comparado ao grupo controle (sem exposição ao vírus). Guérin *et al.* (1996) estudaram o efeito do BoHV-1 em grupos de oócitos que foram expostos ao vírus durante a maturação e fertilização. O vírus pareceu não afetar a maturação dos oócitos, porém, reduziu significativamente a taxa de fertilização de 85% (controle) para 65%, concluindo que o BoHV-1 não somente foi adsorvido pelo gameta como também prejudicou sua habilidade de fertilizar o oócito, possivelmente devido ao fato de alterar a penetração ou afetar o mecanismo de interação intracelular de fusão, no entanto, tem sido demonstrado que a infecção experimental de gametas bovinos *in vitro*, com BoHV-5, produziu embriões infectados, sem que houvesse prejuízo no desenvolvimento embrionário (Silva-Frade *et al.*, 2010). Segundo Vanroose *et al.* (1997), os blastocistos expandidos, expostos ao BoHV-1, expressaram antígenos virais em aproximadamente 13% de suas células e tornaram-se degenerados. Makarevich *et al.* (2007), concluíram que os embriões com ZP intactas foram protegidos contra a infecção, contudo, embriões eclodidos, após a

exposição ao vírus, apresentaram degeneração celular.

Bielanski e Dubuc (1994), observaram que a infecção de embriões produzidos *in vitro* com BoHV-1 não diminuiu significativamente as taxas de desenvolvimento embrionário de oócitos para o estágio de blastocisto. Em contrapartida, Vanroose *et al.* (1999) encontraram taxas de clivagem e de formação de blastocistos significativamente reduzidas, após a exposição ao vírus durante a etapa de FIV.

Ainda não existem evidências de que o vírus apenas se fixe na ZP ou penetre infectando as células embrionárias (Bielanski e Dubuc, 1994). Para Vanroose *et al.* (1999), a replicação do BoHV-1 ocorreu somente em blastômeros de embriões produzidos *in vitro* na ausência de ZP.

3. MATERIAL E MÉTODOS:

3.1. Local e população experimental:

O experimento foi realizado no verão, na Fazenda Modelo da Escola de Veterinária da UFMG, localizada no município de Pedro Leopoldo, Minas Gerais, com altitude de 710 metros, temperatura média de 20,9°C e média pluvial anual de 1328,7mm³.

Foram selecionadas 18 fêmeas bovinas mestiças (Zebú/Holandes), vazias, não lactantes e não vacinadas, dentre vacas, com o peso vivo médio de 454 ± 55,7 kg e escore da condição corporal 3,5±0,5. As fêmeas eram sorologicamente positivas para o BoHV-1 pelo teste de soroneutralização em microplacas, teste realizado 60 dias antes do início do experimento, seguindo a metodologia proposta pelo *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines* (OIE.,1992), sendo o mesmo protocolo seguido pelo Ministério da Agricultura,

Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Governo Brasileiro.

Antes do início do experimento foi realizado o diagnóstico de gestação por ultrassonografia trans-retal (D600Vet, Chison, China), utilizando um transdutor linear de 5 MHz e avaliadas a condição uterina, presença de corpo lúteo (CL) e número de folículos visualizados por ovário.

Após a identificação dos animais considerando os parâmetros mencionados acima, os animais tiveram o estro sincronizado com a utilização de progestágenos e prostaglandinas. Os animais foram observados duas vezes ao dia (início da manhã e final da tarde) para a identificação da manifestação do cio, sendo a primeira coleta de material realizada quatro dias após a média das observações.

Os animais foram separados em dois grupos experimentais: grupo tratado (GT, n=12) e grupo não tratado (GNT, n=6).

Os animais dos dois grupos experimentais foram mantidos juntos porém isolados dos outros animais do rebanho, em sistema de pastejo semintensivo com piquetes sombreados, suplementação mineral e fornecimento de capim elefante picado duas vezes ao dia.

Considerando que as aspirações foliculares podem ser realizados com um intervalo mínimo de quatro dias (Viana *et al.*, 2002), os grupos tratado e não tratado foram subdivididos em dois grupos contendo seis animais do grupo tratado e três animais do grupo não tratado (GT1, n= 6, GNT1, n=3 e GT2, n=6, GNT2, n=3). Essa subdivisão permite um maior número de coletas de material respeitando o intervalo de aspirações e, portanto foram avaliados nove animais a cada dois dias conforme a figura 4.

3.2. Protocolo de indução de estresse:

Para a indução de estresse foram realizadas cinco aplicações consecutivas de dexametasona (uma por dia, D0 – D4) na

dose de 0,1 mg/kg de peso vivo por via intravenosa conforme Pastoret *et al* (1980) (figura 1). No grupo não tratado foi administrada solução salina seguindo o mesmo protocolo do grupo tratado.

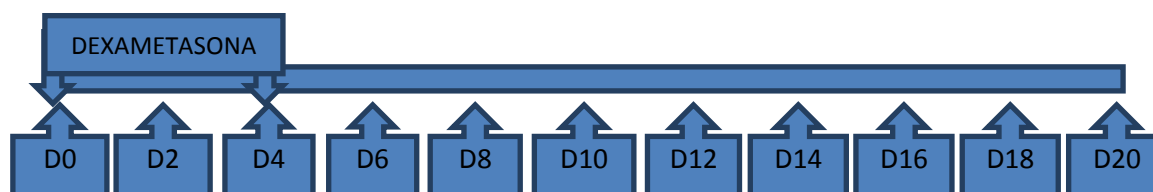


Figura 1: Cronograma de coletas e a aplicações de dexametasona.

O cronograma representa o período de aplicação da dexametasona, os dias de coleta do material biológico e dados de avaliações clínicas, sendo que nos dias 0, 4, 8, 12, 16, 20 foram avaliados os animais dos grupos GT1 e GNT1 e nos dias 2, 6, 10, 14, 18 os animais dos grupos GT2 e GNT2.

3.3. Coleta de amostras e avaliações

3.3.1. Avaliação clínica

O estado de saúde dos animais foi analisado baseando-se nas seguintes avaliações: avaliação do comportamento (atividade, apetite, mudança na locomoção e propriocepção), frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura retal. Foram admitidos como parâmetros normais frequência cardíaca 60 a 80 batimentos por minuto, frequência respiratória entre 10 e 30 movimentos por minuto e temperatura entre 38°C e 39°C.

As mucosas nasal, vaginal e ocular foram inspecionadas em todos os dias de coleta. Foram consideradas alteradas as mucosas que apresentavam vesículas e/ou pústulas e presença de exudato.

Pela dificuldade em estabelecer um escore de gravidade para as alterações os resultados foram considerados como positivo ou negativo (presença ou ausência de alterações).

3.3.2. Coletas de sangue

Quatro tubos de sangue da veia jugular (dois com e dois sem EDTA) foram coletados utilizando sistema de Vacutainer®, após a prévia assepsia da região com álcool 70%. As amostras obtidas foram centrifugadas a 600G e separou-se o soro ou o plasma e a papa de leucócitos. Os mesmos foram acondicionados em Eppendorf® devidamente identificados e conservados a – 20° C até a realização dos testes laboratoriais.

Amostras de soro sanguíneo de todos os animais foram enviadas para realização de soroneutralização em microplacas (D0 - D20). Realizou-se ainda, hemograma e leucograma completos, fibrinogênio e proteína plasmática conforme as técnicas descritas por Schalm *et al.* (1975).

3.3.4. Coletas de complexos cumulus-ócito (CCOs) e fluido folicular (FF)

As amostras de CCOs e FF foram obtidas via aspiração folicular guiada por ultrassonografia transvaginal (OPU), segundo Bols *et al.* (2005). Foi utilizado um aparelho portátil de ultrassonografia (D600VET, Chison, China) equipado com

um transdutor vaginal de 7,5 MHz acoplado a um dispositivo-guia para biópsia, circuitos de teflon, agulhas 20G (WTA, São Paulo, Brasil) e bomba de vácuo digital (WTA, São Paulo, Brasil), regulada com pressão de aspiração de 80 mmHg. As agulhas, circuitos, placas e filtros eram estéreis e individuais para cada animal, assim como o revestimento plástico utilizado para proteção da guia de aspiração, evitando dessa forma a contaminação cruzada do material recuperado de cada animal.

Para a obtenção de amostras de líquido folicular foi realizada a aspiração individual do maior folículo visualizado de cada animal utilizando-se circuitos de silicone, tubos cônicos de coleta de 50mL, e em seu interior contendo um eppendorf novo e esterilizado e conectado à saída do material aspirado um tubo de silicone que conduzia o fluido diretamente ao mesmo. O líquido extraído foi centrifugado a 600G por 20 minutos para a separação de células em suspensão e o sobrenadante pipetado e armazenado em palhetas de 0,5 mL. O material foi congelado em nitrogênio líquido (-196°C) até o momento da pesquisa do vírus.

Após a coleta da amostra de líquido folicular, os demais folículos visíveis na imagem ultrassonográfica foram aspirados para obtenção de complexos cumulus-oócito (CCOs). O aspirado folicular foi passado em filtro usado para coleta de embriões (WTA, São Paulo, Brasil - com malha de 60µm), para a retenção dos CCOs. A pequena quantidade de FF retida com os CCOs foram transferidos para placas de petri estéreis, nas quais os CCOs foram identificados com auxílio de estereomicroscópio (40x), lavados em PBS para a remoção do FF. Os CCOs obtidos foram armazenados em nitrogênio líquido (-196°C) até o momento da pesquisa dos vírus.

3.3.4. Coleta de raspados nasais e vaginais:

Para a obtenção das amostras de raspados nasal e vaginal foram utilizados zaragatoas estéreis aplicadas diretamente sobre a mucosa nasal, na concha nasal ventral e na mucosa vaginal, no vestíbulo vaginal.

A extremidade das zaragatoas após serem aplicadas foram armazenadas em microtubos de 2 mL estéreis específicos para PCR (livres de DNA e RNA) em meio contendo 100mL de PBS 1X, 1mL Penicilina + Streptomicina e 0,5mL Fugizon até o momento da chegada no laboratório, onde foram agitados e após a retirada da extremidade foram armazenados na temperatura de -80°C.

As amostras provenientes de fluido folicular, CCOs, raspados vaginal e nasal foram utilizadas para análise em PCR Tempo Real.

3.3.5. Isolamento viral

Para a confirmação da presença viral nos raspados vaginal e nasal, as amostras provenientes dos dias 10 e 12, dos animais dos grupos tratado e não tratado também foram submetidas ao isolamento viral, que foi realizado em placas de 24 poços com a linhagem celular CRIB na concentração de 50.0000 células por cm². Foi utilizado meio essencial mínimo (MEM) suplementado com 5 % de soro fetal bovino, 1% de penicilina e estreptomicina e 0,5% de fungisona. As placas foram armazenadas à 37°C sobre atmosfera de 5% de CO₂.

Para a realização do inóculo, a confluência celular foi de 60- 70%. O meio foi retirado da placa com auxílio de pipetas de vidro com volume de 10 mL. Cada poço recebeu 1mL de PBS 1X para realizar a retirada o soro fetal bovino, sendo inoculado (1:10) em triplicata recebendo 300µl do inóculo.

As placas foram novamente levadas para estufa, sendo que a cada 15 minutos foi realizada a homogeneização pelo período de uma hora de adsorção. Após este procedimento, cada poço recebeu 1,7 ml de meio MEM com 10% de soro fetal bovino e 0,5% de fungisona. As placas foram incubadas na estufa de CO₂ pelo período de 48 horas sendo observadas a cada 24 horas em microscópio óptico para a visualização de alteração na morfologia celular. Após as 48 horas as placas foram congeladas e descongeladas três vezes para o rompimento das células e liberação do vírus. Este procedimento foi repetido por três vezes (48 horas/ passagem).

3.3.6. Extração de DNA viral de amostras

Para a extração do DNA foi utilizado o Kit de Extração de DNA (KIT BIOLOGICAL INDUSTRIES) da Biosystems®, utilizando-se indicações do fabricante. Após a extração, o material foi identificado e armazenado a -20°C.

3.3.7. PCR em tempo real

As reações em cadeia de polimerase (PCR) tempo real foram desenvolvidas de acordo com (Gasparini, 2014).

A PCR em tempo real foi realizada utilizando o Power SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems®), com um volume total de 25µL e os iniciadores escolhidos foram os que ancoram a região codificadora da gB (amplicon 96pb). Brevemente, para cada reação foi utilizado 12,5µL do tampão Power SYBR® Green Master Mix 2X, 0,5µL de cada iniciador gB (10pMol), 5,5µL de água e finalmente, 5µL do DNA molde. A PCR em tempo real foi realizada no equipamento Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System™. Em cada amplificação foi avaliado o threshold cycle (Ct.) que é o número de ciclos da PCR em que foi detectado por

fluorescência. As amostras foram consideradas positivas quando o valor de Ct foi inferior ou igual a 35. Acima deste corte considerou-se as amostras como negativas (Wang *et al.*, 2007).

3.3.8. Soroneutralização

A avaliação do status sorológico dos animais para a infecção pelo BoHV-1 foi realizada pela prova de soroneutralização em microplacas de 96 poços, segundo metodologia proposta pelo "*Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*" (Suplemento, 1992) e o protocolo seguido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Governo Brasileiro.

3.4. Diagnóstico de gestação:

Após o término do período experimental, os animais foram soltos a campo com um reprodutor para a monta natural. Vinte oito dias após o término do período experimental, os animais passaram por diagnóstico de gestação por ultrassonografia transretal.

3.5. Análises estatísticas:

As análises foram conduzidas utilizando o procedimento PROC GLM do software SAS 9.0 (Statistical Analysis System Institute, Inc., Cary, NC, USA) de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \delta_{j(i)} + \gamma_k + (\tau\gamma)_{ik} + e_{ijk},$$

em que

Y_{ijk} é o valor observado para a variável resposta na j-ésima unidade experimental submetida ao i-ésimo tratamento no k-ésimo tempo;

μ é uma constante comum a todas as observações;

τ_i é o efeito do i-ésimo tratamento;

$\delta_{j(i)}$ representa o efeito aleatório da j-ésima unidade experimental dentro do i-ésimo tratamento;

γ_k é o efeito do k-ésimo tempo observado;

$(\tau\gamma)_{ik}$ é o efeito da interação entre o i-ésimo tratamento com o k-ésimo tempo;

e_{ijk} é o erro aleatório associado as observações do k-ésimo tempo para o i-ésimo tratamento e j-ésima parcela experimental.

Os dados provenientes das análises de PCR em tempo real foram transformados utilizando $\ln(x+1)$ como proposto por Vogel *et al.* (2004). E os gráficos construídos utilizando o pacote ggplot2 do software R (<https://cran.r-project.org/>).

Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética da Embrapa Gado de Leite protocolo n° 01/2010.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliações clínicas e comportamentais

Foram observadas alterações clínicas e de comportamento tanto no grupo não tratado (pouco frequente) como no grupo tratado (maior frequência). Não foram observadas alterações de propriocepção ou locomoção. Nos animais que apresentaram lesões

vaginais foi observado o levantamento de cauda.

O aumento de temperatura caracterizando estado febril ocorreu apenas no D6 no grupo tratado, acometendo metade dos animais desse grupo. A diarreia também foi observada somente no GT do D2 ao D12, ocorrendo com maior frequência (50% dos animais) no D8.

4.2. Alterações das mucosas

As lesões encontradas nas mucosas nasais se caracterizaram pelo aparecimento de vesículas e pústulas brancacentas de aproximadamente 0,3 cm de diâmetro sendo que em alguns animais do GT, ficaram recobertas por um exsudato mucopurulento, sendo observada uma secreção nasal e vaginal permanentes.

No grupo tratado (GT) as lesões começaram a ser observadas no D4 nas mucosas nasal e vaginal, sendo que na mucosa nasal a maior frequência ocorreu entre D6 e D10 83,3% (5/6) decrescendo até o dia 14 e a partir do D16 nenhum animal apresentou lesões. Na mucosa vaginal, o grupoGT ocorreu lesão em 100% (6/6) dos animais entre os dias 8 e 12, conforme demonstrado na figura 2 e caracterizado nas figuras 4 e 5.

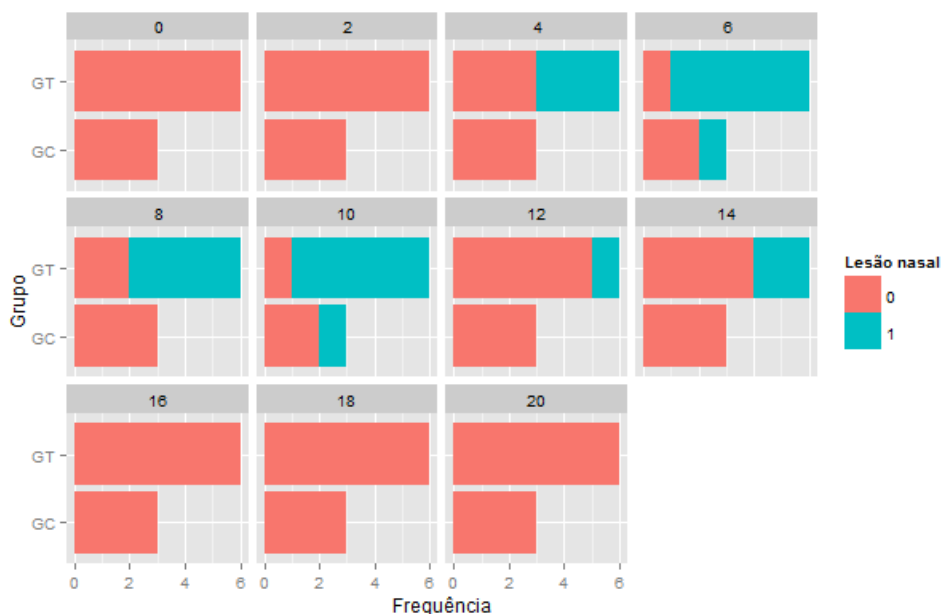


Figura 2. Frequência das lesões nasal para os grupos tratados e não tratados durante o período experimental.

Dois animais do GC somente 1 animal apresentou lesões nasais entre os dias 6 e 10. As alterações observadas foram vesículas, não evoluindo para pústula, da mesma forma que as alterações vaginais, as quais apareceram no GC entre os dias 4 e 18, acometendo entre 1/3 e 2/3 dos animais (figura 3).

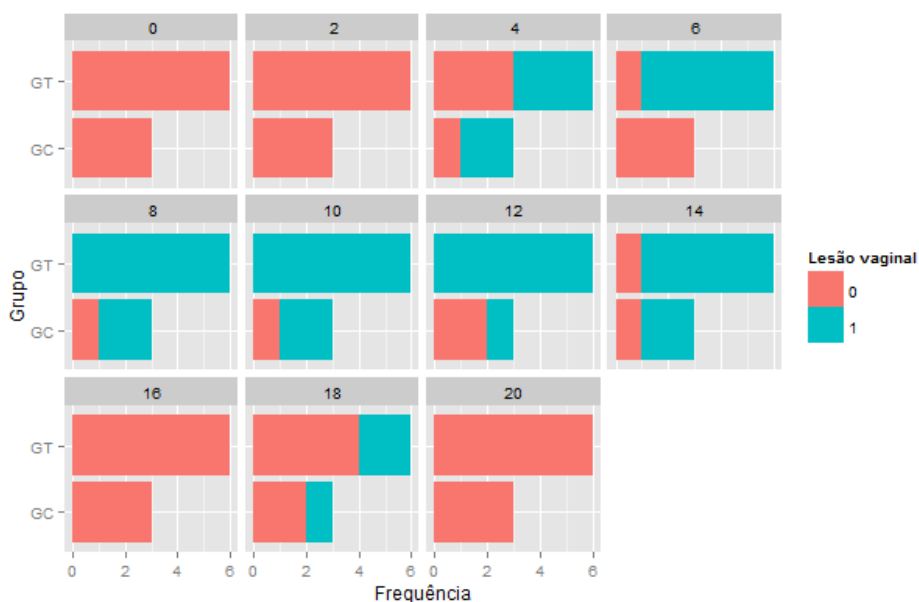


Figura 3. Frequência da lesão vaginal para os grupos tratados durante o período experimental. A: LN GT – Lesão nasal do grupo tratado, LN GC – Lesão nasal do grupo não tratado. B: LV GT - Lesão vaginal do grupo tratado, LV GNT- Lesão vaginal do grupo não tratado. Não foi observada diferença ($p \leq 0,05$) entre as lesões nasais e vaginais a partir do D4, assim como em relação aos grupos tratados e não tratados.

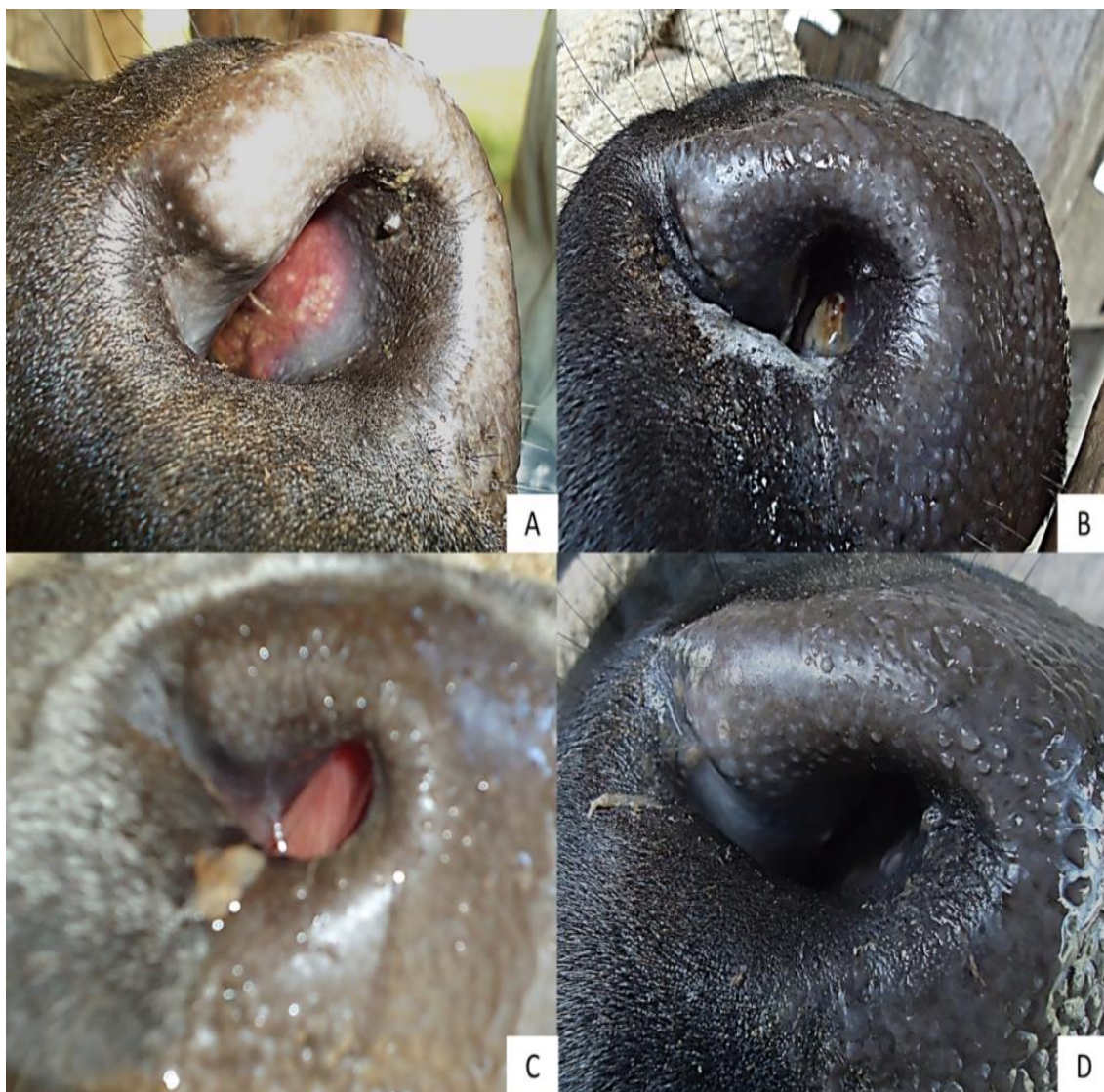


Figura 4. Progressão e caracterização de lesão nasal de um animal pertencente ao grupo tratado. Evolução da lesão nasal no animal n°119 (GT). A: presença de vesículas (D4), B e C: presença de pústulas recobertas com exudato mucopurulento (D8), C: Regressão da lesão (D12).



Figura 5. Progressão e caracterização de lesão vaginal de dois animais pertencentes ao grupo tratado.

Evolução da lesão vaginal em animais do GT. A: presença de vesículas animal n° 79 (D4), B: presença de pústulas recobertas com exudato mucopurulento e ulcerações na mucosa animal n°79 (D8), C: regressão da lesão animal n° 79 (D16), D: presença de pústulas recobertas com exudato mucopurulento animal n° 153 (D12).

4.3. Avaliações hematológicas

No grupo tratado, o leucograma apresentou alterações responsivas ao tratamento com corticoides, sendo observadas neutrofilia seguida de linfopenia entre D2 e D8,

voltando a apresentar comportamento normal após D10, em que o número de linfócitos passa a ser superior ao de neutrófilos. O leucograma dos animais está representado na figura 6.

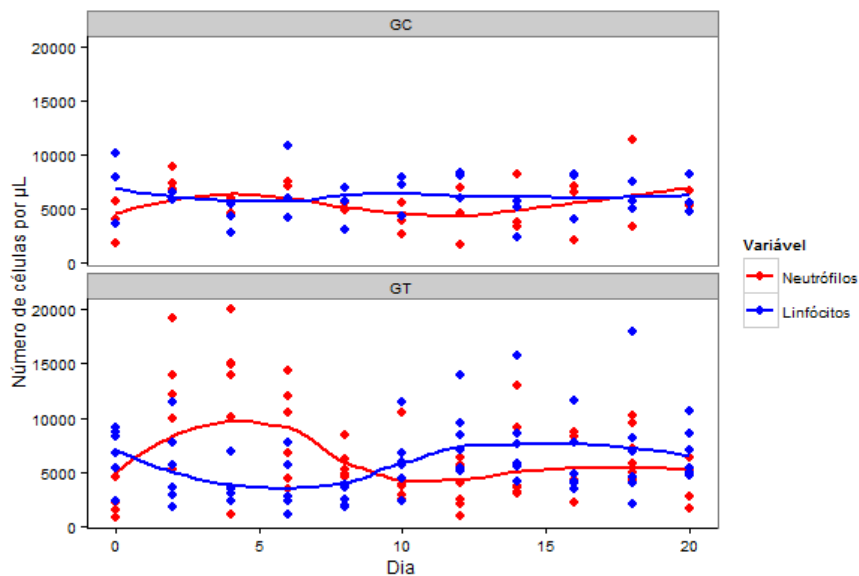


Figura 6. Leucograma dos animais dos grupos tratado e não tratados. Alteração da curva de neutrófilos e linfócitos durante o período experimental nos animais do grupo tratado.

4.4. Avaliações sorológicas

Os resultados do teste de diagnóstico e titulação de anticorpos realizado pela técnica de soroneutralização em microplacas para BoHV-1 comparando o D0 ao D20 demonstra

um aumento expressivo no título de anticorpos para os animais do GT a partir de D10, com uma variação ≥ 4 vezes o título inicial. No GC não ocorreram variações ao longo dos dias. Os resultados podem ser visualizados na figura 7.

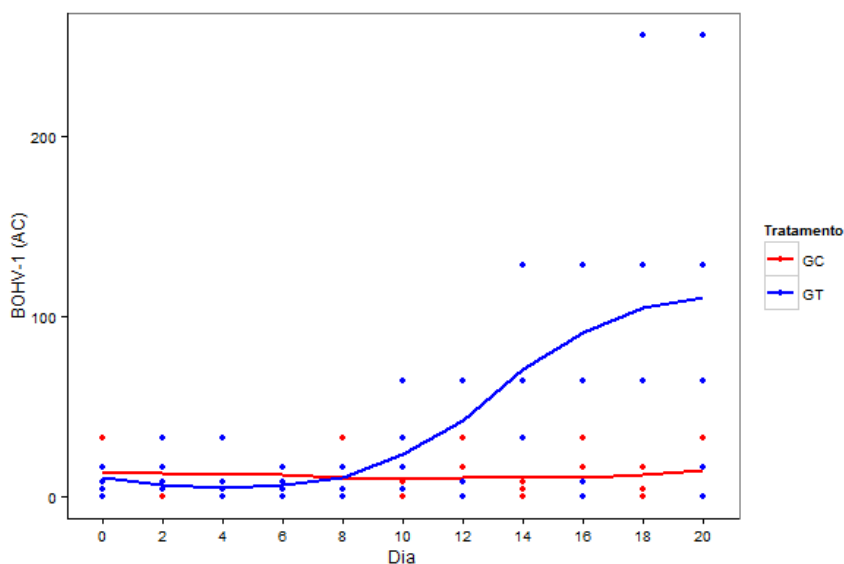


Figura 7. Soroneutralização entre os grupos para BoHV-1. Houve diferença ($p \leq 0,05$) realizada que teste t entre os grupos para os títulos de anticorpos para BoHV-1 entre os dias 12 e 20.

4.5. Resultados de isolamento viral:

O isolamento viral foi realizado em células CRIB a partir dos raspados nasal e vaginal coletados nos dias 10 e 12 em três passagens (tabela 1).

Na primeira passagem é possível observar no raspado nasal a frequência de 66,6% (8/12) de animais positivos no GT, enquanto

no GNT é de 33,3% (2/6) e na última passagem a frequência é de 75% (9/12) e 66,6% (4/6) para os grupos GT e GNT respectivamente. No raspado vaginal são observadas frequências de 91,6% (11/12) e 83,3% (5/6) na primeira passagem e 83,3% (10/12) e 50% (3/6) na terceira e última passagem para os grupos GT e GNT, respectivamente.

Tabela 1. Isolamento viral em células CRIB:

	1 passagem		2 passagem		3 passagem	
	GT	GNT	GT	GNT	GT	GNT
Raspado nasal	66,6% (8/12)	33,3% (2/6)	58,3% (7/12)	33,33% (2/6)	75% (9/12)	66,66% (4/6)
Raspado vaginal	91,6% (11/12)	83,33% (5/6)	66,66% (8/12)	100% (6/6)	83,33% (10/12)	50% (3/6)

Frequência e número de animais com efeito citopático positivo (Figura 8) para BoHV-1, dos grupos GT e GNT nos raspados nasal e vaginal.

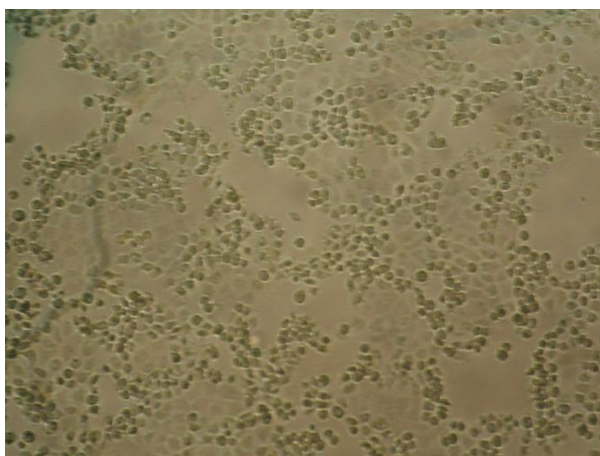


Figura 8: Efeito citopático em células CRIB infectadas com BoHV.

Foto tirada na terceira passagem de animal pertencente ao grupo tratado.

4.6. Resultados de raspado nasal e vaginal

Para a avaliação da presença de DNA viral nos raspados nasal e vaginal foi utilizada a PCR Tempo Real. Os resultados demonstram que houve presença de DNA viral nas mucosas nasal e vaginal.

Na figura 9 estão representados os valores da PCR Tempo Real em do número de cópias por μL no raspado nasal dos grupos tratado e não tratado.

Na figura 10 estão demonstradas o número de cópias de DNA viral nos raspados nasal e vaginal por grupo experimental.

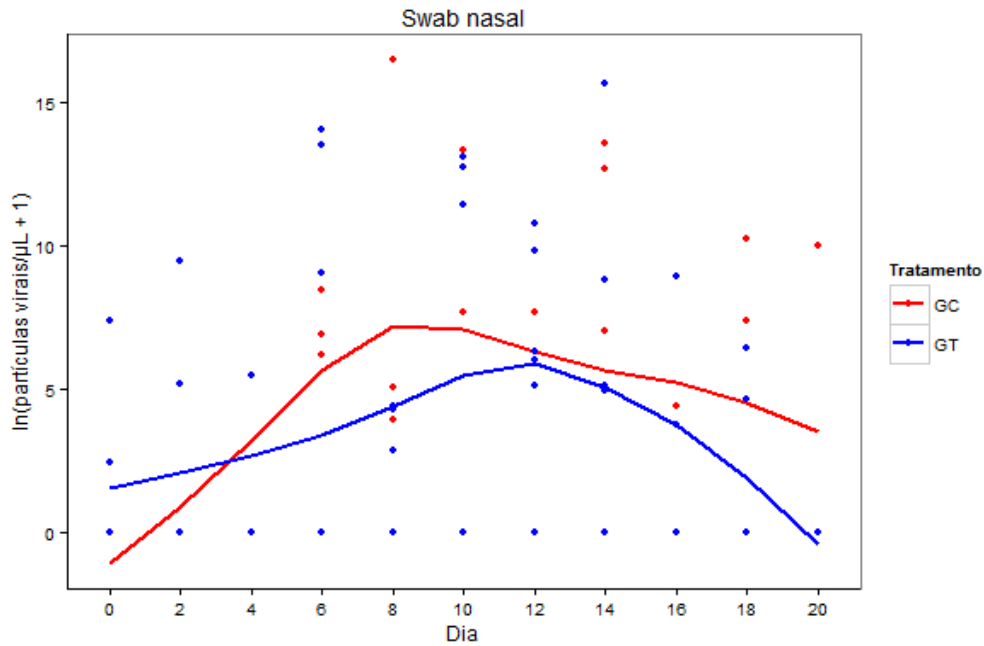


Figura 9. Resultados da PCR Tempo Real para raspado nasal e vaginal. A figura representa os raspados nasal dos grupos tratado e GNT. Não foi observada diferença entre os grupos. Tratamentos GC: Grupo não tratado, CT: Grupo tratado.

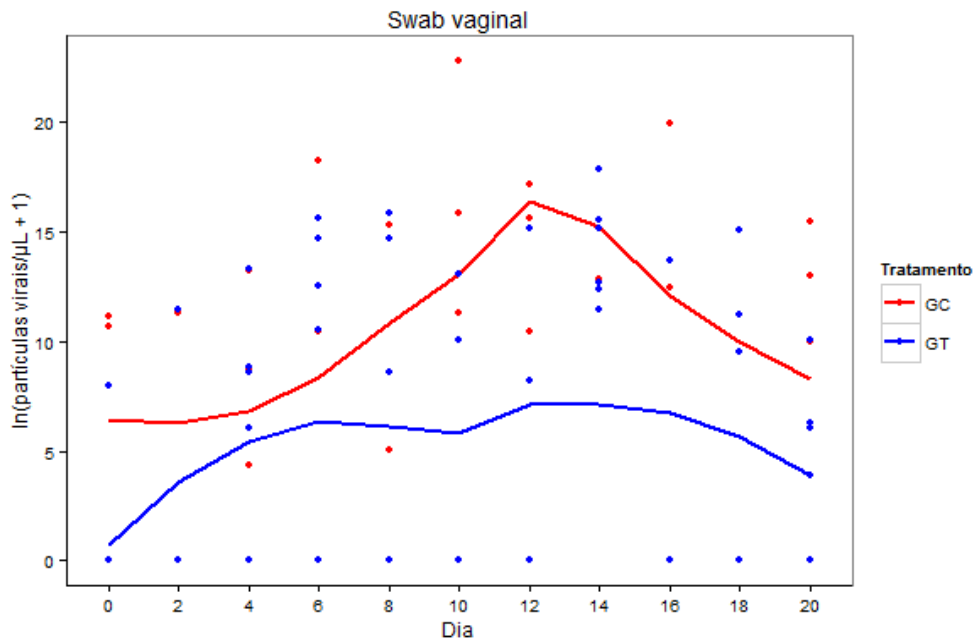


Figura 10. PCR Tempo Real em \log_{10} do n° de cópias por μL no raspado vaginal dos grupos tratado e não tratados. A figura representa os raspados vaginal dos grupos tratado e GNT. Não foi observada diferença entre os grupos. Tratamentos GC: Grupo não tratado, CT: Grupo tratado.

4.7. Resultados da PCR tempo real em CCOs e FF

Foram enviados para PCR tempo real, os CCOs de animais que tiveram cinco ou mais estruturas por sessão de aspiração, porém foi

possível recuperar o FF de todos os animais e em todas as coletas.

O número de cópias de DNA viral em log10 nos CCOs está representado na figura 11.

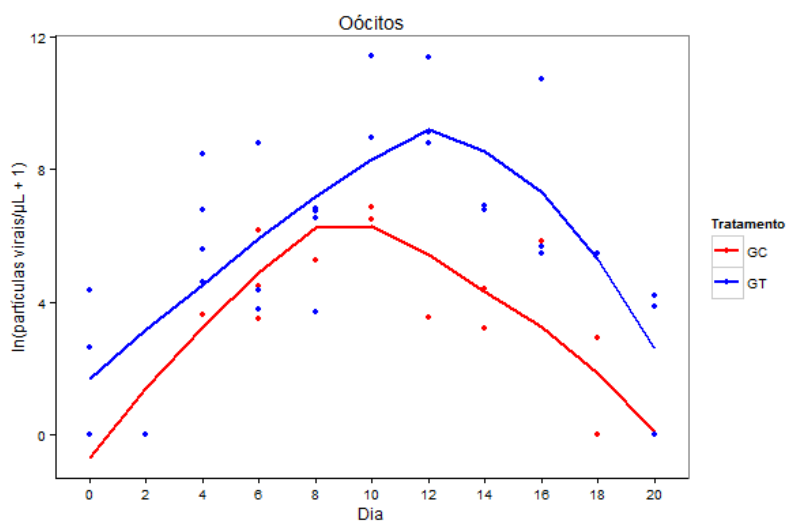


Figura 11. Resultado para PCR Tempo Real em amostras de CCOs: Na figura 11 demonstra o resultado da PCR em CCOs dos animais pertencentes aos grupos experimentais. Tratamentos GC: Grupo não tratado, CT: Grupo tratado.

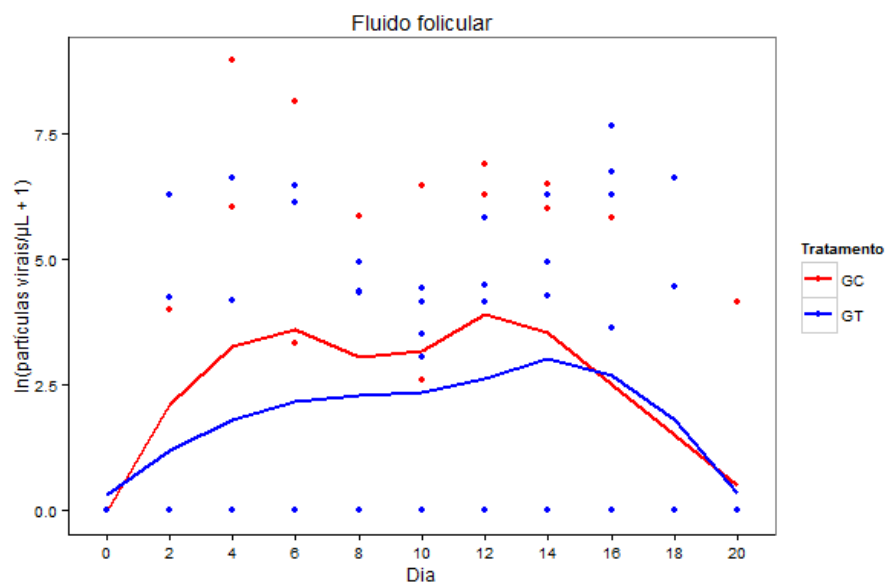


Figura 12: Resultado PCR tempo real para as amostras de fluido folicular Na figura 12 está demonstrado o resultado da PCR em FF dos animais pertencentes aos grupos experimentais. Tratamentos GC: Grupo não tratado, CT: Grupo tratado.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra de forma inédita a quantificação de cópias do DNA viral do BoHV-1 em CCOs e FF de vacas naturalmente infectadas pelo vírus. Para obter essa resposta a abordagem metodológica também previu a avaliação da reposta clínica, sorológica, a presença de partículas virais infectantes nos raspados nasal e vaginal, e a quantificação do DNA viral em raspados nasais e vaginais, de vacas sorologicamente positivas para BoHV-1 por um período de 20 dias, utilizado aplicações de dexametasona (0,1 mg/Kg/pv) por via intravenosa por um período de cinco dias consecutivos para induzir a recrudescência viral e a forma aguda da doença em animais naturalmente infectados por BoHV-1.

As lesões encontradas nas mucosas nasais se caracterizaram pelo aparecimento de vesículas podendo coalescer e progredir para pústulas brancacentas de aproximadamente 0,3 cm de diâmetro e nos casos de maior gravidade, recobertas por um exsudato mucopurulento e fibrinoso. Essa progressão das lesões foi observada em 50% e 66,6% animais do GT para as mucosas nasal e vaginal respectivamente. Wyler *et al.* (1989) descreveram as lesões de animais infectados como sendo 2 mm de diâmetro, podendo ser coalescentes e com distribuição difusa, como observado nos animais do grupo tratado.

Os sinais clínicos observados corroboram com os descritos por Henzel (2008) que, ao utilizarem dexametasona 55 dias após a infecção experimental em bezerros, encontraram sinais clínicos semelhantes na mucosa nasal.

O aparecimento das lesões causadas pela recrudescência viral e/ou alta circulação do vírus na população experimental resultou em lesões nasais que duraram 12 e 4 dias GT e GNT respectivamente e lesões vaginais que duraram 12 dias GT e GNT. Fenner *et al.*

(1993) e Riet-Correa *et al.* (1996) demonstraram após a infecção experimental em bezerros que as lesões têm duração média de 5 a 10 dias, já Wyler *et al.* (1989) observaram a duração entre 10 e 14 dias, independente da mucosa, contudo a grande manipulação do aparelho reprodutivo e a fricção da guia de aspiração folicular intravaginal, podem ter causado trauma na mucosa vaginal dos animais, resultando no prolongamento da duração das lesões vaginais (figura 3), principalmente no grupo não tratado, que apesar de apresentaram alterações nas mucosas nasal e vaginal, estas ocorreram em menor frequência e gravidade.

Os resultados do grupo não tratado são semelhantes aos encontrados por Dennet *et al.* (1976), Snowdon (1965) e Pastoret *et al.* (1979) demonstrando que a reativação de BoHV-1 induzida por corticosteroides, em vacas com infecção latente pode ser acompanhada por sinais clínicos leves, no entanto, os resultados obtidos no grupo tratado, são semelhantes à Henzel (2008) e Pastoret *et al.* (1980), em primo-infecções experimentais.

São considerados os principais parâmetros para avaliação do leucograma de bovinos após o período de estresse agudo e/ou administração de corticoides a relação entre os neutrófilos e linfócitos (Paes *et al.*, 2009). No grupo tratado, o leucograma apresentou alterações responsivas ao tratamento com corticoides entre os dias 1 e 9, sendo observadas neutrofilia seguida de linfopenia, confirmando o quadro de imunossupressão causado pelo corticosteroide (figura 6).

Após a administração de corticosteroides e em fases agudas de inflamação ocorre um aumento da concentração circulante de neutrófilos, observa-se também redução da concentração plasmática de linfócitos, eosinófilos e monócitos (Stockham e Scott, 2002), assim como a migração do compartimento marginal para o circulante devido ao comprometimento das moléculas

de adesão dos neutrófilos, adicionalmente ocorre liberação dos neutrófilos presentes na medula óssea para a corrente sanguínea e a inibição da diapedese pelos tecidos levando à neutrofilia, podendo ser esse um fator para um prolongamento das lesões nasais no grupo tratado. Nos linfócitos observa-se linfopenia com a migração do compartimento circulante para medula óssea e/ou linfonodos (Paes *et al.*, 2009).

A dexametasona tem ação residual de até três dias na corrente sanguínea (Doherty *et al.*, 1995). Os animais do grupo tratado receberam dexametasona entre os dias 0 e 4 do experimento (D0- D4), portanto a partir do sétimo dia do experimento os animais já não sofriam a ação do corticosteroide, apesar da relação entre neutrófilos e linfócitos ter normalizado apenas entre o oitavo e décimo dias do experimento. Após o oitavo dia já é possível notar o aumento dos títulos de anticorpos no grupo tratado, comprovando que houve um estímulo viral para a produção de células imunes e consequentemente para a produção de anticorpos.

Houve diferença ($p \leq 0,05$) entre os grupos para os títulos de anticorpos dos grupos, GT e GNT para BoHV-1 entre os dias 12 e 20, sendo possível observar a interferência da dexametasona no títulos de anticorpos para BoHV-1, assim como na frequência de observações das alterações clínicas.

Contudo, o resultado dos animais no isolamento viral demonstra um maior número de animais com efeito positivo no raspado nasal pertencente ao grupo tratado principalmente na primeira passagem e nesse momento o grupo tratado continha maior frequência de lesões na mucosa nasal e com maior gravidade, contudo no raspado vaginal, apesar de também haver uma maior frequência e gravidade das lesões na mucosa vaginal, não houve diferença entre os grupos.

Pospisil *et al.* (1996) demonstraram que os títulos de anticorpos abaixo de 16, induzidos por vacina inativada, não induzem resposta imunológica celular por linfócitos T CD8+, sendo assim, títulos maiores ou iguais a 16 ou 32 têm sido apontados como os mínimos necessários para proteger os animais frente a uma exposição ao agente. Além disso, títulos entre 32 e 128 conferem proteção contra a infecção respiratória e intrauterina causada pelo BoHV-1 e segundo Pastoret e Thiry (1985) a elevação dos títulos de anticorpos específicos, em animais que se encontram latentemente infectados ou previamente vacinados, pode prevenir a ativação da infecção e excreção viral, contrariando os resultados dos títulos de anticorpos para BoHV-1 obtidos no teste de soroneutralização neste experimento. Por outro lado, Patel (2005) demonstrou que títulos semelhantes ou superiores aos encontrados por Pospisil *et al.* (1996), podem variar na capacidade de proteção, sendo possível inferir que a soroneutralização não é um teste eficiente para a caracterização da recrudescência viral e não deve ser utilizada como teste de diagnóstico no caso trânsito, compra e descarte de animais.

Contudo, fica demonstrado que o estresse causado pela dexametasona não influenciou a excreção viral pelas mucosas nasal e vaginal, porém influenciou na frequência, severidade e duração das lesões.

Os resultados de PCR em tempo real dos raspados nasal dos grupos tratado e não tratado (figura 9), não apresentaram diferença ($P < 0,05$). Contudo, o dia de avaliação teve efeito significativo ($P < 0,05$), sendo observado diferença significativa entre os dias 4 e 14 ($P < 0,05$).

No raspado nasal (Figura 9), é possível observar que os picos de detecção de DNA viral nos grupos tratado e não tratado não ocorrem simultaneamente. No grupo não tratado, o D8 apresentou maior detecção de

DNA viral, já para o grupo tratado o mesmo ocorreu no D12 sendo observada então, uma queda brusca na detecção de DNA viral. Pode-se sugerir, considerando o maior número de animais com lesões na mucosa nasal, que a integridade da mucosa pode interferir no número de cópias de DNA viral presentes.

No raspado vaginal no entanto, o pico de detecção de DNA viral ocorre no D12 no grupo não tratado, sendo observado também um pequeno aumento no grupo tratado. A excessiva manipulação do sistema reprodutivo dos animais, a resposta inflamatória e o fato do vírus presente na mucosa vaginal estar sendo distribuído por toda a mucosa devido à fricção da guia de aspiração folicular pode ter influenciado a ocorrência dos picos de detecção de DNA viral. Henzel (2008), observou que a aplicação de dexametasona após a infecção artificial pelo BoHV-1.2 em animais promove um aumento da recrudescência viral, aumento do título de anticorpos e leva ao aparecimento de sinais clínicos semelhantes aos observado na infecção aguda, porém os autores avaliaram apenas a presença de partículas virais infectante até 10 dias pós-infecção, e os raspados não foram acompanhados por técnicas moleculares de detecção de DNA viral.

No presente estudo, é possível provar devido ao efeito citopático positivo que ocorreu a recrudescência viral nos animais tratados e não tratados pela dexametasona assim como o aparecimento de sinais clínicos característicos da doença nas mucosas nasal e vaginal. No entanto os animais dos grupos tratado e não tratado permaneceram juntos durante todo o período experimental, sendo assim o vírus poderia estar circulando entre os grupos experimentais.

Fekety (1992) demonstra a redução da ação dos macrófagos, monócitos e neutrófilos, deprimindo a fagocitose, respostas quimiotáticas e o ingresso dessas células até

os sítios de inflamação pela administração de dexametasona, sendo esperado um aumento do número de partículas virais nos animais do grupo tratado. Contudo, os resultados desse trabalho não demonstrou diferença estatística nos grupos experimentais.

Os resultados obtidos na PCR tempo real nos CCOs demonstram que não houve diferença entre os grupos, contudo é possível observar que no grupo tratado a maior concentração de DNA viral é encontrada no dia 14 e no grupo não tratado o mesmo ocorre no dia 12.

Foram enviadas para a PCR tempo real as amostras dos animais que tiveram ao menos 5 CCOs coletados considerando que os mamíferos apresentam grandes variações individuais no número de folículos nos ovários, como bovinos (Viana *et al.*, 2010), bubalinos (Barusseli *et al.*, 1997), caprinos (Ginther e Kot, 1994). Para um menor trauma nos ovários, neste experimento os folículos aspirados tinham um diâmetro ≥ 4 mm, o que pode ter influenciado negativamente a taxa de recuperação dos CCOs no experimento, impossibilitando a recuperação de no mínimo cinco CCOs por animal experimental, portanto foram perdidas diversas repetições durante o período experimental, certamente influenciando o resultado.

Devido a perda de diversas repetições para CCOS não foi possível realizar análises estatísticas para a comparação dos tratamentos. Uma análise descritiva dos resultados obtidos na PCR tempo real nos CCOs permite observar que no grupo tratado a maior concentração de DNA viral é encontrada no dia 12 e no grupo não tratado o mesmo ocorre nos dias 8 e 12.

O comportamento da resposta da PCR tempo real no fluido folicular, no entanto foi diferente do encontrado nos CCOs, sendo possível observar dois picos de concentração

viral nos dias 6 e 12 no grupo não tratado e um pico no dia 14 para o grupo tratado, observando-se queda abrupta após o dia 16.

Não houve diferença significativa entre grupo tratado e não tratado ($P < 0.05$) para número de partículas virais detectadas por PCR em tempo real, demonstrando que apesar da dexametasona ter influenciado no número de anticorpos circulantes ela não interfere na presença e concentração de partículas virais no fluido folicular. Foi detectado pelo teste F um efeito significativo do dia de avaliação, contudo o teste de Tukey não foi capaz de detectar a diferença entre as médias dos dias.

O desenho experimental não permitiu verificar a existência da viremia, porém a recrudescência viral foi comprovada. Henzel (2008) demonstra a latência do BoHV-1.2 em gânglios lombo-sacrais e linfonodos regionais coletados de bezerras 91 dias após a infecção experimental corroborando com Vogel *et al.* 2004, após infecção experimental em machos. Lovato *et al.* (2000) afirmam que o DNA latente do BoHV-1 pode ser encontrado em outros sítios, além dos gânglios nervosos, tanto após a infecção respiratória, quanto genital e Pasquini e Spurgeon (1989) comprovam que estes gânglios contêm os corpos celulares de neurônios sensoriais que inervam a genitália externa e interna.

Al Hamad *et al.* (2005) identificou que em CCOs caprinos o vírus da artrite e encefalite viral caprina (CAEV) foi identificada nas células do *cumulus* mas não nos oócitos de animais sorologicamente positivos, Tsuboi *et al.* (1992) afirmam que o vírus replica em oócitos foliculares com células do *cumulus*, mas não em oócitos desnudos e realiza a detecção de anticorpos por imunofluorescência indireta nas células do *cumulus*. Em oócitos maturados em meio de cultura artificialmente infectado com BoHV foram encontrados efeitos citopáticos nas células do *cumulus* entre 1 e 3 dias após a

maturação (Vanroose *et al.*, 1999), é possível que uma vez que essas células estejam infectadas o CCO permanecerá infectado até o momento da ovulação ou atresia.

A contaminação do FF pode ter acontecido pelos vasos sanguíneos, possivelmente pelo o mecanismo contracorrente existente entre as mucosas vaginal e vulvar (Gioso, 2005) ou pelo reflexo da aspiração folicular considerando que após a remoção dos CCOs e FF, uma nova onda de crescimento folicular se inicia (Viana, *et al.*, 2002) ocorrendo uma maior vascularização dos folículos como demonstrado Viana *et al.*, (2012) através de ultrassonografia com doppler, como também pelo processo inflamatório causado pelas perfurações durante o procedimento (Viana, *et al.*, 2002), concomitante à suposta ocorrência de uma fase viremica, portanto o BoHV-1 existente naquele ambiente poderia entrar em contato mais rapidamente com os tecidos reprodutivos. No entanto, não é possível descartar a possibilidade de o FF ser contaminado pelos CCOs, pois durante o processo da oogênese, o oócito até o momento de folículo secundário, possui contato direto com a corrente sanguínea e a partir folículo terciário o contato é interrompido devido à da formação do antro onde é produzido o FF banhando agora CCO (Varguese *et al.*, 2008).

Desta forma, para compreender a dinâmica do BoHV torna-se importante a relação entre a presença do DNA viral nos raspados, CCOs e FF, dos grupos experimentais.

Muylkens *et al.* (2007) e Takiuchi *et al.* (2005), demonstram que o BoHV-1 infecta primariamente o trato respiratório superior e na primo-infecção ou após a reativação viral na fase virêmica o vírus pode atingir o trato reprodutivo causando abortamentos e/ou absorção embrionária, causando também ooforites e lise do corpo lúteo.

Os resultados encontrados nesse estudo sugerem que existe relação entre os momentos de maior detecção de cópias do DNA viral no raspado nasal e nos CCOs (figuras 9 e 11), ocorrendo no dia 8 (D8) para os animais do grupo não tratado e no dia 12 (D12) para os animais do grupo tratado.

A relação pode-se dar devido a possível viremia e/ou recrudescência dos gânglios lombo-sacrais e trigêmeo concomitantemente que apesar de não ser possível afirmar nesse experimento, Engels e Ackermann (1996), demonstram que o BoHV-1 pode ser carregado por macrófagos através da corrente sanguínea atingindo os tecidos reprodutivos de machos e fêmeas e Lovato *et al.* (2000), confirmam a presença do vírus latente nos gânglios trigêmeo e lombo-sacral simultaneamente em animais artificialmente infectados por via nasal.

Na comparação entre o nos picos de detecção do DNA viral no FF e raspado vaginal (figuras 12 e 10) é possível notar uma grande semelhança, ambas ocorrem nos dias 14 e 16 (D14 e D16) do período experimental para os grupos tratados e não tratados, reforçando a hipótese da possível contaminação do FF pelo mecanismo contra corrente da mucosa vaginal ao parênquima ovariano conforme demonstrado por Gioso (2005).

A frequência das lesões demonstra que animais assintomáticos e/ou animais que apresentavam lesões com menor gravidade (GNT) continham uma maior quantidade de DNA viral nas mucosas nasal e vaginal (figuras 9 e 10), já nos animais do GT que possuíam maior frequência e gravidade de lesões, o resultado foi inferior na detecção de DNA viral, talvez a realização dos raspados sem a preocupação de evitar o contato com as feridas, pode ter influenciado o resultado tanto pela grande quantidade de células mortas, como pela presença de infiltrados inflamatórios, infecção bacteriana

secundária, e uma possível dispersão das partículas virais pela liberação de secreções, como pode ser observados nas figuras 4 e 5, todavia o isolamento viral apresentou efeitos citopáticos nas amostras provando a presença de partículas viras ativas.

Outro estudo de grande importância seria a pesquisa do vírus avaliando os gametas recuperados até a fase final da produção embrionária *in vitro*, assim como a transferência desse material genético para receptoras controladas e a pesquisa do vírus em ovários para verificar se existe a presença do BoHV-1 em diferentes fases da foliculogênese. Desta forma poderíamos compreender o mecanismo de chegada do vírus nos gametas e fluido folicular.

Atualmente a utilização de doadoras de embriões e principalmente CCOS para a disseminação do material genético e a melhoria dos processos de criopreservação de gametas e embriões, em especial, os produzidos *in vitro*, conforme demonstrado por Viana *et al.* (2002), reforçam a atenção em relação aos cuidados preventivos com o rebanho e procedimentos que evitem a contaminação cruzada entre animais do próprio rebanho, como compartilhar filtros, circuitos e agulhas durante os procedimentos de reprodução animal assistida.

O vírus, devido ao seu ciclo lítico causa efeito citopático nas células contaminadas e no momento da seleção dos CCOs aspirados que segundo Bols *et al.* (2005) são considerados os mais viáveis CCOs que possuem mais de três camadas de células do *cumulus*, em segundo grau de qualidade os CCOs que possuem células recoberto todo o oócito e em terceiro grau de qualidade aqueles parcialmente desnudos. Essa classificação e de certa forma essa rotina de avaliação pode indiretamente auxiliar na seleção de CCOs livres de vírus que, como o BoHV-1 se multiplicam nas células do *cumulus*, conforme demonstrado por Vanroose *et al.* (2007).

Caso o vírus tenha contaminado os CCOs em fases anteriores ao folículo terciário, a chance da degeneração folicular (Makarevich *et al.*, 2007) ou atresia nos estados iniciais da foliculogênese é grande, pois a infecção viral causaria a lise das células de origem epitelial que recobrem os folículos nesses estágios Tsuboi *et al.*, (1992).

Porém, mesmo após a maturação oócitaria e a remoção mecânica das células do *cumulus* para fertilização *in vitro* o BoVH-1 pode estar associado à zona pelúcida (D'Angelo, 1998). Edens *et al.* (2003) comprovam que as lavagens com tripsina recomendadas pela IETS, são ineficientes para remoção do vírus.

Penido *et al.* (2014), demonstra que mesmo utilizando diferentes tempos de exposição à tripsina (45, 60 e 90 segundos) as lavagens foram ineficientes para a remoção do vírus da língua azul sorotipo 8 (BTV-8) da zona pelúcida de embriões produzidos *in vitro*.

Os resultados obtidos demonstram risco epidemiológico para rebanhos bovinos, pois, quando o tratador visualiza algum animal com sinais clínicos ele provavelmente irá isolá-lo do rebanho, porém mesmo na ausência da manifestação clínica ocorre a liberação de partículas virais pelas mucosas, perpetuando a doença no rebanho e dificultando o controle.

No caso de touros, esse fato é ainda mais preocupante, pois é o animal que percorre vários lotes de fêmeas dentro de uma propriedade de exploração pecuária.

A grande disponibilidade de material genético, agora disponível pela tecnologia de PIVE e melhorias na congelabilidade de embriões, tem reduzido o custo sendo da transferência do material genético tornando-se cada vez mais acessível para pequenos e médios produtores rurais. Considerando esse novo panorama, torna-se importante a

realização de estudos que possam avaliar os riscos sanitários de gametas e embriões, para que aumento da produtividade dos rebanhos nacional e internacional não sejam apenas pelo mérito genético, mas também sanitário.

Ao fim do experimento, três animais foram enviados para o abatedouro, dois pelo baixo histórico de produção leiteira e um animal devido à aderência nos ovários, possivelmente pelas sucessivas aspirações foliculares, o restante dos animais (n=15), foram soltos com touro para monta natural.

No diagnóstico de gestação, realizado em 15 animais 28 dias após o término do experimento apresentou 14/15 animais prenhes. Portanto, mesmo após a recrudescência viral, os animais possuíam COCs férteis. O risco sanitário para a transferência de material genético deve ser mais estudado, como foi relatado no presente trabalho, ainda existem muitas questões que precisam ser abordadas, tornando esse um importante campo para a pesquisa, desenvolvimento e transferência de tecnologia, pois trata-se de um tema de grande impacto econômico e sanitário para a pecuária mundial.

6. CONCLUSÃO

Vacas sorologicamente positivas e não vacinadas para BoHV-1, podem ser fontes contaminantes de rebanhos e disseminadores do vírus quando utilizadas como doadoras de CCOs e mesmo sem a manifestação clínica da doença o vírus pode recrudescer e ser excretado sem alterar o título de anticorpos para o BoHV-1.

A seleção de doadoras de CCOs deve passar pela avaliação sanitária, sendo possível utilizar o diagnóstico molecular em raspados nasais como indicadores do BoHV-1 nos CCOs e de forma segura, prática e com baixa perda econômica para programas de reprodução assistida em fêmeas bovinas.

7. APOIO:

Agradecemos o apoio da FAPEMIG pelo financiamento do projeto: FAPEMIG – AQP – 016882-09.

Agradecemos o apoio da CAPES.

8. REFERÊNCIAS

ARAÚJO V.R., DUARTE A.B., BRUNO J.B. *et al.* Importance of vascular endothelial growth factor (VEGF) in ovarian physiology of mammals. *Zygote*, v.13, p.1-10, 2011.

BAID, S.; NIEMAN, L.K. Glucocorticoid excess and hypertension. *Current hypertension*, v.6, p.493-199, 2004.

BIELANSKI, A.; LOEWEN, K.S.; DEL CAMPO, M.R. *et al.* Isolation of bovine herpesvírus 1 (BHV-1) and bovine diarrhea virus (DVDV) in association with the *in vitro* production os bovine embryos. *Theriogenology*, v.40, p.531-538, 1993.

BIELANSKI, A.; DUBUC, C. *In vitro* fertilization of bovine oocytes exposed to bovine herpesvírus 1 (BHV-1). *Reprod. Dom. Anim.*, v.28, p.285-288, 199.

BIELANSKI, A.; JORDAN, L. Washing or washing and trypsin treatment is ineffective for removal of noncytopathic bovine viral diarrhea virus from bovine oocytes or embryos after experimental viral contamination of an *in vitro* fertilization system. *Theriogenology*, v.46, p.1467-1476, 1996.

BOLS, P.E.J.; LEROY J.L.M.R.; VIANA, J.H.M. Aspectos técnicos e biológicos na recuperação de oócitos via trans-vaginal guiada por ultra-som em vacas. *Actae Scientiae Veterinariae*. v.33, suppl.1, p.103, 2005.

BREEN, K.; KARSCH, F.J. New insights regarding glucocorticoids, stress and gonadotropin suppression. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v.27, p.233-245, 2006.

BRITT JH. Oocyte development in cattle: physiological and genetic aspects. *Rev. Bras. Zootec.*, v.37, suplemento especial, p.110-115, 2008.

BROUSSARD, J.R.; ROCHA, A.; SIROIS, J. *et al.* Effects of dexamethasone administration to diestrus cows on systemic progesterone, estrogen and uterine cyclooxygenase production. *Anim. Reprod. Sci.*, v.47, p.263-271, 1997.

CLAUS M.P.; ALFIERI A.F.; FLATSCHART A.V.F. *et al.* Rapid detection and differentiation of bovine herpesvírus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR. *J. Virol. Methods*, v.128, p.183-188, 2005.

D'ANGELO, M. *Interação do herpesvírus bovino tipo 1(BHV-1) com oócitos bovinos maturados in vitro*. PhDThesis, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, 1998.

DENNET, D.P.; BARASA, J.O.; JOHNSON, R.H. Infectious bovine rhinotracheitis virus:studies on the venereal carrier status in range cattle. *Res. Vet. Sci.*, v.20, p.77-83, 1976.

DOHERTY, M.L.; BASSETT, H.F.; QUINN, P.J.; DAVIS, W.C. Effects of dexamethasone on cell-mediated immune responses in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, v.56, p.1300-1306, 1995.

DONOFRIO G, HERATH S, SARTORI C. Bovine herpesvírus 4 is tropic for bovine endometrial cells and modulates endocrine function. *Reproduction*, v.134, p.183-197, 2007.

EDENS, M.S.; GALIK, P.K.; RIDDELL, K.P. *et al.* Bovine herpesvírus-1 associated with single, trypsin-treated embryos was not indective for uterine tubal cells. *Theriogenology*, v.60, p.1495-504, 2003.

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

- ENGELS, M.; ACKERMAN, M. Pathogenesis of ruminants pestivirus infections. *Vet. Microbiol*, v.53, p.3-15, 1996.
- FEKETY, R. Infections associated with corticosteroids and immunosuppressive therapy. Infectious Diseases. Philadelphia, W. B. Saunders, 1992.
- FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. Endocrinologia y Reproducción canina y felina, p. 245-256. Philadelphia, W. B. Saunders, 1991.
- FENNER, F.J.; GIBBS, E.P.L.; MURPHY, F.A. *et al.* Diseases caused by alphaherpesviruses. In: *Veterinary Virology*, Edition 2. Academic Press, San Diego. 1993, 345-348.
- GALLI, C.; CROTTI, G.; NOTARI, C. *et al.* Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*, v.55, p.1341-1357, 2001.
- GASPARINI, M.R. Desenvolvimento e padronização de um procedimento operacional padrão para avaliação do sêmen bovino para os seguintes vírus: BVDV, BTV, FMDV e Herpesvirus bovinos (BoHV-1.1, BoHV-1.2 E BoHV-5) utilizando PCR convencional e PCR cinética. 2014. 96p. Tese Doutorado. Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.
- GERIN, B.; NIBART, M.; MARQUANT, LE-GUIENNE. *et al.* Sanitary risks related to embryo transfer in domestic species. *Theriogenology*, v.47, p.33-42, 1997.
- GINTHER, O.J.; KOT, K. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. *Theriogenology*, v.42, p.987-1001, 1994.
- GIOSO M. Angioarquitetura venosa do órgão genital da fêmea bovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, n.6, p.715-719, 2005.
- GIVENS, M. D., AND MARLEY, M. S. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. *Theriogenology*, v.70, p.270-285, 2008.
- HENZEL A. *Patogenia experimental da infecção aguda e latente pelo Herpesvírus Bovino tipo 1.2 em bezerras*. 2008. 43p. (Dissertação de mestrado) Escola de Veterinária – Universidade Federal de Santa Maria.
- LAGE, A.P. Aspectos sanitários em doadoras e receptoras de embriões bovinos. *Rev. Bras. Reprod Anim*, v. 23, p. 539-549, 1999.
- Le TALLEC, B.; PONSART, C.; MARQUANT-Le GUIENNE, B.; GUÉRIN, B. Risks of transmissible diseases in relation to embryo transfer. *Reproduction Nutrition Development*, v.41, p.439-450, 2001.
- LOVATO L.T., WINKLER M.T., STONE-INMAN M., DOSTER A., JONES C.. Detection of bovine herpesvirus Type 1 (BHV-1) viral DNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). CRWAD, Proc. 81st Annu. Meet, 2000.
- MAGOFFIN, D.; KUMAR, A.; YILDIZ, B.; AZZIZ R. Endocrinology of the Ovary. In: MELMED S, CONN PM. *Endocrinology: Basic and Clinical Principle*, 2.ed. Totowa: Humana Press, p.391-403, 2005.
- MAKAREVICH, A.V.; PIVKO, J.; KUBOVICOVA, E. *et al.* Development and viability of bovine preimplantation embryos after the *in vitro* infection with bovine herpesvirus-1 (BHV-1): immunocytochemical and ultrastructural studies. *Zygote* (Cambridge, England), v.15, p.307-15, 2007

- MALLARD, B.A.; McBRIDE, B.W.; KEHRLI, M.E.; COUSSENS, P.M. Bovine immunophysiology and genetics: A review of the research and career of Jeanne L. Burton. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.128, p.96-103, 2009.
- MCGEE, E.A.; HSUEH, A.J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr. Rev.*, v.21, p.200-214, 2000.
- MEYER, G.; LEMAIRE, M.; ROS, C. *et al.* Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. *Arch. Virol.*, v.146, p.633-652, 2001.
- MULLER, G.H. Immunologic disease. Small Animal Dermatology. Philadelphia, W.B. Saunders, 1989.
- MUYLKENS, B.; THIRY, J., KIRTEN, P. *et al.* Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet Res.*, v.38, p.181-209, 2007.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). International Animal Health Code. 23rd Edition, 2014
- OLIVEIRA, A.P. *Pesquisa do vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos em Complexos cumulus-oócito e líquido folicular.* 2007. 26p. Dissertação de mestrado - escola de veterinária - Universidade Federal de Minas Gerais.
- PAES, P.R.O.; LEME, F.O.P.; CARNEIRO, R.A. Hematologia dos animais domésticos. Belo Horizonte, 119p., 2009.
- PASQUINI C. & SPURGEON T. Anatomy of Domestic Animals. 6th edition. SUDZ Publishing, Pilot Point, USA. 1989, 651p.
- PASTORET P., THIRY E., BROCHIER B. & DERBOVER B.. Bovid Herpesvirus 1 infection of cattle pathogenesis, latency, consequences of latency. *Annu. Vet. Rec.*, v.13, p.221-235, 1982.
- PASTORET PP, THIRY E. Diagnosis and prophylaxis of infectious bovine rhinotracheitis: the role of virus latency. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*, v.8, p.35-42, 1985.
- PASTORET, P.-P.; AGUEJAR-SETIÉN, A.; BURTONBOY, G. *et al.* Effect of repeated treatment with dexamethasone on the re-excretion pattern of infectious bovine rhinotracheitis virus and humoral immune response. *Veterinary Microbiology*, v.4, p.149-155, 1979.
- PASTORET, P.P.; BABIUK, L.A.; MISRA, V.; GRIEBEL, P. Reactivation of Temperature-Sensitive and Non-Temperature-Sensitive Infectious Bovine Rhinotracheitis Vaccine Virus with Dexamethasone. *Infection and Immunity*, v.29, p.483-488, 1980.
- PATEL, J.R. Characteristics of live bovine herpesvirus-1 vaccines. *Vet. J.*, v.169, p.404-416, 2005.
- PENIDO, A.O.; De CLEARK, K.; HAEGEMAN, A. *et al.* Failure to remove Bluetongue Serotype 8 (BTV-8) from *in vitro* proced bovine embryos. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.26, p.66, 2014.
- PHILOCREON, G.R. Ovários e tubas uterinas: In: *Petroianu A. Anatomia cirúrgica*, Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, p.581-590, 1999.
- PIETERSE, M. C.; VOS, P.L.A.M.; KRUIP, T.A.M. *et al.* Characteristics of bovine estrous cycles during repeat transvaginal ultrasound guided puncturing of follicles for ovum pick-up. *Theriogenology*, v.35, p.401-413, 1991.
- PIETERSE, M.C.; VOS, P.L.A.M.; KRUIP, T.A.M. *et al.* Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology*, v.35, p.19-24, 1991.

- POSPISIL, Z. *et al.* Development of a disease control program based on the use of an inactivated vaccine against infectious bovine rhinotracheitis. *Veterinary Microbiology*, v.53, n.1-2, p.199-206, 1996.
- REDMER, D.A.; REYNOLDS, L.P. Angiogenesis in the ovary. *Rev. Reprod.*, v.3, p.182-92, 1996.
- RIET-CORREA, F., MOOJEN V., ROEHE P.M. & WEIBLEN R.. Viroses confundíveis com febre aftosa: revisão bibliográfica. *Ciência Rural*. 1996. Vol 26:323-332.
- ROBINSON, R.S.; WOAD, K.J.; HAMMOND, A.J. *et al.* Angiogenesis and vascular function in the ovary. *Reproduction*, v.138, p.869-881, 2009.
- ROSA, P.C.S.; PEIRÓ, J.R.; CAMPEBELL, R.S. *et al.* Efeitos do diclofenaco e da dexametasona na endotoxemia experimental em equinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.55, n. 3, 2003.
- RUBIN, K.C.P.; MAX, M.C.; PONTES, J.H.F. *et al.* M. Influência da estação do ano na produção de oócitos em vacas da raça nelore. *Acta Sci. Vet.*, v.33, p.372, 2005 (resumo).
- SCHALM, O.W.; JAIN, N.C.; CARROL, E.S. *Veterinary Hematology*. 3rd ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1975. 807 p.
- SNOWDON, W.A. The IBR-IPV virus: reaction to infection and intermittent recovery of virus from experimentally infected cattle. *Aust. Vet. J.*, v.41, p.135-142, 1965.
- SPINOSA, H.S.; GORNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. *Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária*, 2ª ed., p.227-237, 1999.
- STRINGFELLOW, D.A.; GIVENS, M.D. Infectious agents in bovine embryo production: Hazards and Solutions. *Theriogenology*, v. 53, p. 85-94, 2000.
- STRINGFELLOW, D.A.; LAUWERMAN, L.H.; NASTI, K.B. *et al* Trypsin treatment of bovine embryos after *in vitro* exposure to infectious bovine rhinotracheitis virus or bovine herpesvirus-4. *Theriogenology*, v.34, p. 427-433, 1990.
- SUPLEMENTO al “*Manual of standards for diagnostic tests and vaccines for list A and B diseases of mammals, birds and bees*”. 2. ed. Paris: OIE, 1992. p. 85
- TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Bovine herpesvirus type 1 abortions detected by a semi nested-PCR in Brazilian cattle herds. *Research in Veterinary Science*, London, v.78, n.4, 2005.
- TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; DUCHATEAU, L.; DE KRUIF, A. Inhibition of bovine sperm-oocyte fusion by the *p*-aminophenyl derivative of D-mannose. *Molecular Reproduction and Development*, v.67, p.224-232, 2004.
- TANGHE, S.; VANROOSE, G.; VAN SOOM, A. *et al.* Inhibition of bovine sperm-zona binding by bovine herpesvirus-1. *Rep. Res.*, v.130, p.251-259, 2005.
- THIBIER, M. Biosecurity and the Various Types of Embryos Transferred. *Reproduction in Domestic Animals*, v.41, p.260-267, 2006.
- TSUBOI, T.; KANAZAWA, Y.; SYOJI, T.; TOKUHISA S. Growth activity of bovid herpesvirus 1 in bovine follicular oocytes with *cumulus* cells. *J. Vet. Med. Sci.*, v.54 n.6, p.1179-81,1992.
- VAN DE GRAAFF, K.M. *Anatomia humana*. 6. ed. Barueri: Manole, 2003.
- VANROOSE, G.; KRUIF, A.; VAN SOON, A. Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. *Anim. Reprod. Sci.*, v.60-61, p.131-43, 2000.

- VANROOSE, G.; NAUWYNCK, H.; VAN SOOM, A. *et al.* Effect of bovine herpesvirus-1 or bovine viral diarrhoea virus on development of *in vitro*-produced bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, v.54, p.255-263, 1999.
- VIANA, J.H.M.; SIQUEIRA, L.G.B.; PALHAO, M.P.; CAMARGO, L.S.A. Features and perspectives of the Brazilian embryo industry. *Anim. Reprod.*, v.9, 2012.
- VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A. A produção de embriões bovinos no Brasil: Uma nova realidade. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.35, n.3, p.915-924, 2007.
- VIANA, J.H.M.; NASCIMENTO, A.A.; PINHEIRO, N.L. *et al.* Caracterização de sequelas subsequentes à punção folicular em bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.2, p.119-124, 2002.
- VIANA, J.H.M.; PALHÃO, M.P.; SIQUEIRA, L.G.B. *et al.* Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gir breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up. *Theriogenology*, v.73, p.966-972, 2010.
- VIGHIO, G.H.; LIPTRAP, R.M. Plasma hormone concentrations after administration of dexamethasone during the middle of the luteal phase in cows. *American Journal of Veterinary Research*, v.51, p.1711-1714, 1990.
- VOGEL, F.S.F.; CARON, L.; FLORES, E.F. *et al.* Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous system of latently, experimentally infected calves. *J. Clin. Microbiol.*, v.41, p.4512-4520, 2003.
- VOGEL, F.S.F.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R. *et al.* Intrapreputial infection of young bulls with bovine herpesvirus type 1.2. (BHV-1.2): acute balanoposthitis, latent infection and detection of viral DNA in regional neural and non-neural tissues 50 days after experimental reactivation. *Vet. Microbiol.* 98:185-196, 2004.
- WANG, G., ZHAO, J., LIU, J. *et al.* Enhancement of IL-2 and IFN-gamma expression and NK cells activity involved in the anti-tumor effect of ganoderic acid Me *in vivo*. *Int Immunopharmacol.*, p.864-870, 2007.
- WINKLER, M.T.; DOSTER, A.; SUR, J.H.; JONES, C. Analysis of bovine trigeminal ganglia following infection with bovine herpesvirus 1. *Veterinary Microbiology*, v.86, p.139-155, 2002.
- WYLER, R.; ENGELS, M.; SCHWYZER, M. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV1). In: WITTMANN, G. (Ed.). *Herpesvirus diseases of cattle, horses, and pigs*. Boston/Dordrecht/London: *Kluwer Academic Publishers*. p. 1-72, 1989.
- YOSHITAKE, N.; XUAN, X.; OTSUKA, H. Identification and characterization of bovine herpesvirus-1 glycoproteins E and I. *Journal of General Virology*, v.78, p.1399-1403, 1997.

9. ANEXO 1 – Análises estatísticas

The SAS System 76
 10:20 Sunday, June 27, 2016
 The GLM Procedure
 Class Level Information

Class	Levels	Values
Grupo	2	GC GT
Dia	11	0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20
Animal	18	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

Number of observations 99
 The SAS System 77
 10:20 Sunday, June 27, 2016
 The GLM Procedure
 Dependent Variable: SN_BoHV_1

Source	DF	Squares	Mean Square	F
Model	35	211988.6222	6056.8178	5.54
Error	63	68914.4889	1093.8808	
Corrected Total	98	280903.1111		

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F
Grupo	1	25919.35452	25919.35452	23.69
Animal(Grupo)	14	52344.17778	3738.86984	3.42
Dia	9	42939.14074	4771.01564	4.36
Grupo*Dia	9	42577.89630	4730.87737	4.32

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for Animal(Grupo) as an Error Term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F
Grupo	1	25919.35452	25919.35452	6.93

The SAS System 78
 10:20 Sunday, June 27, 2016
 The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for SN_BoHV_1
 NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	14
Error Mean Square	3738.87
Critical Value of Studentized Range	3.03319
Minimum Significant Difference	27.96
Harmonic Mean of Cell Sizes	44

NOTE: Cell sizes are not equal.
 Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	Grupo
A	44.97	66	GT
B	11.39	33	GC

The SAS System 79
 10:20 Sunday, June 27, 2016
 The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for SN_BoHV_1
 NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	63
Error Mean Square	1093.881
Critical Value of Studentized Range	4.72300
Minimum Significant Difference	52.069

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	Dia
A	101.78	9	18
A			
B A	64.00	9	20
B A			
B A C	56.00	9	16
B A C			
B A C	54.67	9	14
B C			
B C	28.44	9	12
B C			
B C	19.56	9	10
B C			
B C	12.89	9	4
C			
C	9.78	9	2
C			
C	9.78	9	8
C			
C	9.33	9	0
C			
C	5.33	9	6

The SAS System 76
 10:20 Sunday, June 27, 2016
 The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
Grupo	2	GC GT
Dia	11	0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20
Animal	18	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

Number of observations 99
 The SAS System 77
 10:20 Sunday, June 27, 2016
 The GLM Procedure

Dependent Variable: SN_BoHV_1

Source	DF	Squares	Mean Square	F Value
Model	35	211988.6222	6056.8178	5.54
Error	63	68914.4889	1093.8808	
Corrected Total	98	280903.1111		

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F
Grupo	1	25919.35452	25919.35452	23.69
Animal(Grupo)	14	52344.17778	3738.86984	3.42
Dia	9	42939.14074	4771.01564	4.36

Grupo*Dia 9 42577.89630 4730.87737
 4.32 0.0002
 Tests of Hypotheses Using the Type III MS for
 Animal(Grupo) as an Error Term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Grupo	1	25919.35452	25919.35452		6.93 0.0197

The SAS System 78
 10:20 Sunday, June 27, 2016
 The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for
 SN_BoHV_1
 NOTE: This test controls the Type I experimentwise error
 rate, but it
 generally has a higher Type II error rate than
 REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	14
Error Mean Square	3738.87
Critical Value of Studentized Range	3.03319
Minimum Significant Difference	27.96
Harmonic Mean of Cell Sizes	44

NOTE: Cell sizes are not equal.
 Means with the same letter are not significantly
 different.

Tukey Grouping	Mean	N	Grupo
A	44.97	66	GT
B	11.39	33	GC

The SAS System 79
 10:20 Sunday, June 27, 2016
 The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for
 SN_BoHV_1
 NOTE: This test controls the Type I experimentwise error
 rate, but it
 generally has a higher Type II error rate than
 REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	63
Error Mean Square	1093.881
Critical Value of Studentized Range	4.72300
Minimum Significant Difference	52.069

Means with the same letter are not significantly
 different.

Tukey Grouping	Mean	N	Dia
A	101.78	9	18
A			
B A	64.00	9	20
B A			
B A C	56.00	9	16
B A C			
B A C	54.67	9	14
B C			
B C	28.44	9	12
B C			
B C	19.56	9	10
B C			
B C	12.89	9	4
C			
C	9.78	9	2
C			
C	9.78	9	8
C			
C	9.33	9	0
C			
C	5.33	9	6

The SAS System 128
 10:20 Sunday, June 27, 2016
 The GLM Procedure
 Class Level Information

Class	Levels	Values
Grupo	2	GC GT
Dia	11	0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20
Animal	18	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

Number of observations 99

NOTE: Due to missing values, only 98 observations can be
 used in this
 analysis.

The SAS System 129
 10:20 Sunday, June 27, 2016
 The GLM Procedure
 Dependent Variable: swab_vaginal_t

Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	35	2350.427534	67.155072	1.93	0.0119
Error	62	2160.350599	34.844364		
Corrected Total	97	4510.778133			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	swab_vaginal_t
0.521069	83.83539	5.902912	7.041074

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Grupo	1	445.584845	445.584845	12.79	0.0007
Animal(Grupo)	14	186.817223	13.344087		0.38 0.9750
Dia	9	1024.949101	113.883233	3.27	0.0026
Grupo*Dia	9	578.907876	64.323097		1.85 0.0775

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for
 Animal(Grupo) as an Error Term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Grupo	1	445.5848453	445.5848453		33.39 <.0001

The SAS System 130
 10:20 Sunday, June 27, 2016
 The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for
 swab_vaginal_t
 NOTE: This test controls the Type I experimentwise error
 rate, but it
 generally has a higher Type II error rate than
 REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	14
Error Mean Square	13.34409
Critical Value of Studentized Range	3.03319
Minimum Significant Difference	1.6747
Harmonic Mean of Cell Sizes	43.77551

NOTE: Cell sizes are not equal.
 Means with the same letter are not significantly
 different.

Tukey Grouping	Mean	N	Grupo
A	10.1290	33	GC
B	5.4734	65	GT

The SAS System 131
 10:20 Sunday, June 27, 2016
 The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for
 swab_vaginal_t
 NOTE: This test controls the Type I experimentwise
 error rate.
 Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 62
 Error Mean Square 34.84436
 Critical Value of Studentized Range 4.72580
 Comparisons significant at the 0.05 level are indicated
 by ***.

Comparison	Difference		
	Dia	Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits
14 - 6	5.730	-3.569	15.028
14 - 12	6.512	-3.073	16.097
14 - 10	6.730	-2.569	16.028
14 - 20	7.640	-1.659	16.939
14 - 4	7.845	-1.453	17.144
14 - 16	8.207	-1.092	17.505
14 - 8	8.228	-1.070	17.527
14 - 18	10.854	1.555	20.153 ***
14 - 0	11.526	2.227	20.824 ***
14 - 2	12.317	3.018	21.615 ***
6 - 14	-5.730	-15.028	3.569
6 - 12	0.782	-8.802	10.367
6 - 10	1.000	-8.299	10.299
6 - 20	1.910	-7.388	11.209
6 - 4	2.116	-7.183	11.414
6 - 16	2.477	-6.822	11.776
6 - 8	2.499	-6.800	11.797
6 - 18	5.124	-4.174	14.423
6 - 0	5.796	-3.502	15.095
6 - 2	6.587	-2.712	15.886
12 - 14	-6.512	-16.097	3.073
12 - 6	-0.782	-10.367	8.802
12 - 10	0.218	-9.367	9.802
12 - 20	1.128	-8.457	10.713
12 - 4	1.333	-8.252	10.918
12 - 16	1.695	-7.890	11.279
12 - 8	1.716	-7.869	11.301
12 - 18	4.342	-5.243	13.927
12 - 0	5.014	-4.571	14.599
12 - 2	5.805	-3.780	15.389
10 - 14	-6.730	-16.028	2.569
10 - 6	-1.000	-10.299	8.299
10 - 12	-0.218	-9.802	9.367
10 - 20	0.910	-8.388	10.209
10 - 4	1.116	-8.183	10.414
10 - 16	1.477	-7.822	10.776
10 - 8	1.499	-7.800	10.797
10 - 18	4.125	-5.174	13.423
10 - 0	4.796	-4.502	14.095
10 - 2	5.587	-3.712	14.886
20 - 14	-7.640	-16.939	1.659

The SAS System 132
 10:20 Sunday, June 27, 2016

The GLM Procedure
 Tukey's Studentized Range (HSD) Test for
 swab_vaginal_t
 Comparisons significant at the 0.05 level are indicated
 by ***.

Comparison	Difference		
	Dia	Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits
20 - 6	-1.910	-11.209	7.388
20 - 12	-1.128	-10.713	8.457
20 - 10	-0.910	-10.209	8.388

20 - 4	0.205	-9.093	9.504
20 - 16	0.567	-8.732	9.865
20 - 8	0.588	-8.710	9.887
20 - 18	3.214	-6.085	12.513
20 - 0	3.886	-5.413	13.184
20 - 2	4.677	-4.622	13.975
4 - 14	-7.845	-17.144	1.453
4 - 6	-2.116	-11.414	7.183
4 - 12	-1.333	-10.918	8.252
4 - 10	-1.116	-10.414	8.183
4 - 20	-0.205	-9.504	9.093
4 - 16	0.361	-8.937	9.660
4 - 8	0.383	-8.916	9.682
4 - 18	3.009	-6.290	12.307
4 - 0	3.680	-5.618	12.979
4 - 2	4.471	-4.827	13.770
16 - 14	-8.207	-17.505	1.092
16 - 6	-2.477	-11.776	6.822
16 - 12	-1.695	-11.279	7.890
16 - 10	-1.477	-10.776	7.822
16 - 20	-0.567	-9.865	8.732
16 - 4	-0.361	-9.660	8.937
16 - 8	0.022	-9.277	9.320
16 - 18	2.647	-6.651	11.946
16 - 0	3.319	-5.980	12.618
16 - 2	4.110	-5.189	13.409
8 - 14	-8.228	-17.527	1.070
8 - 6	-2.499	-11.797	6.800
8 - 12	-1.716	-11.301	7.869
8 - 10	-1.499	-10.797	7.800
8 - 20	-0.588	-9.887	8.710
8 - 4	-0.383	-9.682	8.916
8 - 16	-0.022	-9.320	9.277
8 - 18	2.626	-6.673	11.924
8 - 0	3.297	-6.001	12.596
8 - 2	4.088	-5.210	13.387
18 - 14	-10.854	-20.153	-1.555 ***
18 - 6	-5.124	-14.423	4.174
18 - 12	-4.342	-13.927	5.243
18 - 10	-4.125	-13.423	5.174
18 - 20	-3.214	-12.513	6.085
18 - 4	-3.009	-12.307	6.290
18 - 16	-2.647	-11.946	6.651
18 - 8	-2.626	-11.924	6.673
18 - 0	0.672	-8.627	9.970
18 - 2	1.462	-7.836	10.761
0 - 14	-11.526	-20.824	-2.227 ***

The SAS System 133
 10:20 Sunday, June 27, 2016

The GLM Procedure
 Tukey's Studentized Range (HSD) Test for
 swab_vaginal_t
 Comparisons significant at the 0.05 level are indicated
 by ***.

Comparison	Difference		
	Dia	Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits
0 - 6	-5.796	-15.095	3.502
0 - 12	-5.014	-14.599	4.571
0 - 10	-4.796	-14.095	4.502
0 - 20	-3.886	-13.184	5.413
0 - 4	-3.680	-12.979	5.618
0 - 16	-3.319	-12.618	5.980
0 - 8	-3.297	-12.596	6.001
0 - 18	-0.672	-9.970	8.627
0 - 2	0.791	-8.508	10.089
2 - 14	-12.317	-21.615	-3.018 ***

2 - 6	-6.587	-15.886	2.712
2 - 12	-5.805	-15.389	3.780
2 - 10	-5.587	-14.886	3.712
2 - 20	-4.677	-13.975	4.622
2 - 4	-4.471	-13.770	4.827
2 - 16	-4.110	-13.409	5.189
2 - 8	-4.088	-13.387	5.210
2 - 18	-1.462	-10.761	7.836
2 - 0	-0.791	-10.089	8.508

The SAS System 128
10:20 Sunday, June 27, 2016

The GLM Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
Grupo	2	GC GT
Dia	11	0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20
Animal	18	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
Number of observations		99

NOTE: Due to missing values, only 98 observations can be used in this analysis.

The SAS System 129
10:20 Sunday, June 27, 2016

The GLM Procedure

Dependent Variable: swab_vaginal_t

Sum of				
Source	DF	Squares	Mean Square	F
Model	35	2350.427534	67.155072	1.93
Error	62	2160.350599	34.844364	
Corrected Total	97	4510.778133		
R-Square		Coeff Var	Root MSE	swab_vaginal_t
Mean		0.521069	83.83539	5.902912
7.041074				
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F
Grupo	1	445.584845	445.584845	12.79
Animal(Grupo)	14	186.817223	13.344087	
0.38	0.9750			
Dia	9	1024.949101	113.883233	3.27
0.0026				
Grupo*Dia	9	578.907876	64.323097	
1.85	0.0775			

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for Animal(Grupo) as an Error Term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F
Grupo	1	445.5848453	445.5848453	
33.39	<.0001			

The SAS System 130
10:20 Sunday, June 27, 2016

The GLM Procedure
Tukey's Studentized Range (HSD) Test for

swab_vaginal_t

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	14
Error Mean Square	13.34409
Critical Value of Studentized Range	3.03319
Minimum Significant Difference	1.6747
Harmonic Mean of Cell Sizes	43.77551

NOTE: Cell sizes are not equal.
Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	Grupo
A	10.1290	33	GC
B	5.4734	65	GT

The SAS System 131
10:20 Sunday, June 27, 2016

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for swab_vaginal_t

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	62
Error Mean Square	34.84436
Critical Value of Studentized Range	4.72580

Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

Comparison	Difference		Simultaneous 95% Confidence Limits
	Dia	Between Means	
14 - 6	5.730	-3.569	15.028
14 - 12	6.512	-3.073	16.097
14 - 10	6.730	-2.569	16.028
14 - 20	7.640	-1.659	16.939
14 - 4	7.845	-1.453	17.144
14 - 16	8.207	-1.092	17.505
14 - 8	8.228	-1.070	17.527
14 - 18	10.854	1.555	20.153 ***
14 - 0	11.526	2.227	20.824 ***
14 - 2	12.317	3.018	21.615 ***
6 - 14	-5.730	-15.028	3.569
6 - 12	0.782	-8.802	10.367
6 - 10	1.000	-8.299	10.299
6 - 20	1.910	-7.388	11.209
6 - 4	2.116	-7.183	11.414
6 - 16	2.477	-6.822	11.776
6 - 8	2.499	-6.800	11.797
6 - 18	5.124	-4.174	14.423
6 - 0	5.796	-3.502	15.095
6 - 2	6.587	-2.712	15.886
12 - 14	-6.512	-16.097	3.073
12 - 6	-0.782	-10.367	8.802
12 - 10	0.218	-9.367	9.802
12 - 20	1.128	-8.457	10.713
12 - 4	1.333	-8.252	10.918
12 - 16	1.695	-7.890	11.279
12 - 8	1.716	-7.869	11.301
12 - 18	4.342	-5.243	13.927
12 - 0	5.014	-4.571	14.599
12 - 2	5.805	-3.780	15.389
10 - 14	-6.730	-16.028	2.569
10 - 6	-1.000	-10.299	8.299
10 - 12	-0.218	-9.802	9.367
10 - 20	0.910	-8.388	10.209
10 - 4	1.116	-8.183	10.414
10 - 16	1.477	-7.822	10.776
10 - 8	1.499	-7.800	10.797
10 - 18	4.125	-5.174	13.423
10 - 0	4.796	-4.502	14.095
10 - 2	5.587	-3.712	14.886
20 - 14	-7.640	-16.939	1.659

The SAS System 132
10:20 Sunday, June 27, 2016

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for swab_vaginal_t
 Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

Comparison	Difference		Simultaneous 95% Confidence Limits
	Dia	Between	
20 - 6	-1.910	-11.209	7.388
20 - 12	-1.128	-10.713	8.457
20 - 10	-0.910	-10.209	8.388
20 - 4	0.205	-9.093	9.504
20 - 16	0.567	-8.732	9.865
20 - 8	0.588	-8.710	9.887
20 - 18	3.214	-6.085	12.513
20 - 0	3.886	-5.413	13.184
20 - 2	4.677	-4.622	13.975
4 - 14	-7.845	-17.144	1.453
4 - 6	-2.116	-11.414	7.183
4 - 12	-1.333	-10.918	8.252
4 - 10	-1.116	-10.414	8.183
4 - 20	-0.205	-9.504	9.093
4 - 16	0.361	-8.937	9.660
4 - 8	0.383	-8.916	9.682
4 - 18	3.009	-6.290	12.307
4 - 0	3.680	-5.618	12.979
4 - 2	4.471	-4.827	13.770
16 - 14	-8.207	-17.505	1.092
16 - 6	-2.477	-11.776	6.822
16 - 12	-1.695	-11.279	7.890
16 - 10	-1.477	-10.776	7.822
16 - 20	-0.567	-9.865	8.732
16 - 4	-0.361	-9.660	8.937
16 - 8	0.022	-9.277	9.320
16 - 18	2.647	-6.651	11.946
16 - 0	3.319	-5.980	12.618
16 - 2	4.110	-5.189	13.409
8 - 14	-8.228	-17.527	1.070
8 - 6	-2.499	-11.797	6.800
8 - 12	-1.716	-11.301	7.869
8 - 10	-1.499	-10.797	7.800
8 - 20	-0.588	-9.887	8.710
8 - 4	-0.383	-9.682	8.916
8 - 16	-0.022	-9.320	9.277
8 - 18	2.626	-6.673	11.924
8 - 0	3.297	-6.001	12.596
8 - 2	4.088	-5.210	13.387
18 - 14	-10.854	-20.153	-1.555 ***
18 - 6	-5.124	-14.423	4.174
18 - 12	-4.342	-13.927	5.243
18 - 10	-4.125	-13.423	5.174
18 - 20	-3.214	-12.513	6.085
18 - 4	-3.009	-12.307	6.290
18 - 16	-2.647	-11.946	6.651
18 - 8	-2.626	-11.924	6.673
18 - 0	0.672	-8.627	9.970
18 - 2	1.462	-7.836	10.761
0 - 14	-11.526	-20.824	-2.227 ***

The SAS System 133
 10:20 Sunday, June 27, 2016

The GLM Procedure
 Tukey's Studentized Range (HSD) Test for swab_vaginal_t
 Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

Comparison	Difference		Simultaneous 95% Confidence Limits
	Dia	Between	

Comparison	Means	Confidence Limits
0 - 6	-5.796	-15.095 3.502
0 - 12	-5.014	-14.599 4.571
0 - 10	-4.796	-14.095 4.502
0 - 20	-3.886	-13.184 5.413
0 - 4	-3.680	-12.979 5.618
0 - 16	-3.319	-12.618 5.980
0 - 8	-3.297	-12.596 6.001
0 - 18	-0.672	-9.970 8.627
0 - 2	0.791	-8.508 10.089
2 - 14	-12.317	-21.615 -3.018 ***
2 - 6	-6.587	-15.886 2.712
2 - 12	-5.805	-15.389 3.780
2 - 10	-5.587	-14.886 3.712
2 - 20	-4.677	-13.975 4.622
2 - 4	-4.471	-13.770 4.827
2 - 16	-4.110	-13.409 5.189
2 - 8	-4.088	-13.387 5.210
2 - 18	-1.462	-10.761 7.836
2 - 0	-0.791	-10.089 8.508

The SAS System 84
 10:20 Sunday, June 27, 2016

The GLM Procedure
 Class Level Information

Class	Levels	Values
Grupo	2	GC GT
Dia	11	0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20
Animal	18	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

Number of observations 99
 The SAS System 85
 10:20 Sunday, June 27, 2016

The GLM Procedure
 Dependent Variable: VAR9

Source	DF	Squares	Mean Square	F Value
Model	35	959823715	27423535	3.12
Error	63	552886342	8775974	
Corrected Total	98	1512710056		

Source	R-Square	Coeff Var	Root MSE	VAR9
Mean	0.634506	48.09466	2962.427	6159.576

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Grupo	1	17597036.6	17597036.6	2.01	0.1617
Animal(Grupo)	14	220752284.9	15768020.3	1.80	0.0589
Dia	9	299014381.3	33223820.1	3.79	0.0007
Grupo*Dia	9	154818148.3	17202016.5	1.96	0.0592

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for Animal(Grupo) as an Error Term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Grupo	1	17597036.56	17597036.56	1.12	0.3087

The SAS System 86
 10:20 Sunday, June 27, 2016

The GLM Procedure
 Tukey's Studentized Range (HSD) Test for VAR9
 NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it

generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	14
Error Mean Square	15768020
Critical Value of Studentized Range	3.03319
Minimum Significant Difference	1815.8
Harmonic Mean of Cell Sizes	44

NOTE: Cell sizes are not equal.
Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	Grupo
A	6449.0	66	GT
A			
A	5580.7	33	GC

The SAS System 87
10:20 Sunday, June 27, 2016
The GLM Procedure
Tukey's Studentized Range (HSD) Test for VAR9
NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	63
Error Mean Square	8775974
Critical Value of Studentized Range	4.72300
Minimum Significant Difference	4663.8

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	Dia
A	10599	9	2
A			
B A	10022	9	4
B A			
B A C	8021	9	6
B A C			
B D A C	6958	9	18
B D C			
B D C	5656	9	14
D C			
D C	5356	9	16
D C			
D C	5179	9	8
D C			
D C	5056	9	20
D C			
D C	4379	9	10
D C			
D C	3849	9	12
D			
D	2681	9	0

The SAS System 88
10:20 Sunday, June 27, 2016
The GLM Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
Grupo	2	GC GT
Dia	11	0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20
Animal	18	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

Number of observations 99
The SAS System 89
10:20 Sunday, June 27, 2016
The GLM Procedure
Dependent Variable: Linfocitos
Sum of

Source	DF	Squares	Mean Square	F
Value	Pr > F			
Model	35	689728314.5	19706523.3	
5.15	<.0001			
Error	63	240841025.2	3822873.4	
Corrected Total	98	930569339.7		
R-Square				
Coeff Var				
Root MSE				
Linfocitos				
Mean	0.741190	33.04835	1955.217	5916.232

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F
Value	Pr > F			
Grupo	1	64640.8	64640.8	0.02
0.8970				
Animal(Grupo)	14	453342403.0	32381600.2	
8.47	<.0001			
Dia	9	118757373.6	13195263.7	3.45
0.0016				
Grupo*Dia	9	64874673.3	7208297.0	
1.89	0.0704			

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for Animal(Grupo) as an Error Term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F
Value	Pr > F			
Grupo	1	64640.78437	64640.78437	
0.00	0.9650			

The SAS System 90
10:20 Sunday, June 27, 2016
The GLM Procedure
Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Linfocitos
NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	14
Error Mean Square	32381600
Critical Value of Studentized Range	3.03319
Minimum Significant Difference	2602.1
Harmonic Mean of Cell Sizes	44

NOTE: Cell sizes are not equal.
Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	Grupo
A	5968	33	GC
A			
A	5890	66	GT

The SAS System 91
10:20 Sunday, June 27, 2016
The GLM Procedure
Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Linfocitos
NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	63
Error Mean Square	3822873
Critical Value of Studentized Range	4.72300
Minimum Significant Difference	3078.2

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	Dia
A	7967.2	9	12
A			
B A	6906.8	9	18

B	A			
B	A	6906.7	9	0
B	A			
B	A	C	6744.6	9 14
B	A	C		
B	A	C	6653.1	9 20
B	A	C		
B	A	C	6222.3	9 16
B	A	C		
B	A	C	6222.0	9 10
B	A	C		
B	A	C	5057.9	9 2
B	C			
B	C	4805.0	9	6
B	C			
B	C	3924.1	9	4
	C			
	C	3668.9	9	8