

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP CÂMPUS DE  
JABOTICABAL**

**TREMOR CONGÊNITO EM SUÍNOS: O VÍRUS DA DIARREIA  
VIRAL BOVINA É UM AGENTE ETIOLÓGICO?**

**Marina Lopes Mechler**

Médica Veterinária

**2018**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP CÂMPUS DE  
JABOTICABAL**

**TREMOR CONGÊNITO EM SUÍNOS: O VÍRUS DA DIARREIA  
VIRAL BOVINA É UM AGENTE ETIOLÓGICO?**

**Marina Lopes Mechler**

**Orientador: Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, Clínica Médica Veterinária

**2018**

Mechler, Marina Lopes  
M486t Tremor congênito em suínos: o vírus da diarreia viral bovina é um agente etiológico? / Marina Lopes Mechler. -- Jaboticabal, 2018  
xv, 40 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018  
Orientador: Luís Guilherme de Oliveira  
Banca examinadora: Edviges Maristela Pituco, Samir Issa Samara  
Bibliografia

1. Hipoplasia cerebelar. 2. Infecção experimental. 3. Inoculação intrauterina. 4. Leitões. 5. Mioclonia. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.98:636.4

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: TREMOR CONGÊNITO EM SUÍNOS: O VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA É UM AGENTE ETIOLÓGICO?**

**AUTORA: MARINA LOPES MECHLER**

**ORIENTADOR: LUIS GUILHERME DE OLIVEIRA**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em **MEDICINA VETERINÁRIA**, área: **MEDICINA VETERINARIA PREVENTIVA** pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. **LUIS GUILHERME DE OLIVEIRA**

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Pesquisadora Doutora **EDVIGES MARISTELA PITUCO**

Instituto Biológico / Sao Paulo, SP



Prof. Dr. **SAMIR ISSA SAMARA**

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 02 de fevereiro de 2018

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

MARINA LOPES MECHLER – Nascida em 20 de maio de 1988, na cidade de Juiz de Fora, Estado de Minas Gerais, é Médica Veterinária formada pela Universidade Federal de Lavras – UFLA – em 2015. Realizou o estágio curricular no Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária – FCAV – UNESP, Câmpus Jaboticabal, sob supervisão do Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira. Concluindo a graduação com o Trabalho de Conclusão de Curso, sob orientação do Prof. Dr. Christian Hirsch, intitulado “Estágio Supervisionado realizado no Laboratório de Pesquisa em Suínos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp - Câmpus de Jaboticabal”. Em 2016, ingressou no programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Medicina Veterinária Preventiva, pela UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como bolsista FAPESP, com o número de processo 2016/02982-3, sob orientação do Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira. O projeto obteve auxílio FAPESP, com o número de processo 2016/21421-2, e auxílio do CNPq, processo 409435/2016-3.

“Ninguém é suficientemente perfeito que não possa aprender com o outro, e ninguém é totalmente destituído de valores que não possa ensinar algo ao seu irmão.”

São Francisco de Assis

Ao meu noivo, pelo apoio incondicional de todas as horas. À minha família, pelo esforço e compreensão para que meu sonho se realizasse.

## AGRADECIMENTOS

Mais uma conquista. Conquista que veio com muito esforço, trabalho, noites mal dormidas, preocupações, e que valeram cada minuto! Por isso agradeço a Deus, antes de tudo, por me permitir viver e aprender a cada dia mais.

À minha mãe, Luciene, e meu padrasto Gilmar, meus avós Licinha e Jair, por estarem ao meu lado, por compreenderem a necessidade da nossa distância física, e torcerem por mim em todos os momentos. Ao meu noivo, Rodrigo, pelo apoio em todas as horas, decisões, pelo companheirismo em todos esses anos, inclusive em madrugadas no Laboratório acompanhando partos e colheitas de sangue. Sem você aqui meu caminho seria muito mais difícil!

Ao Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira, pela orientação e amizade. O senhor abriu as portas para mim e acreditou na minha vontade de aprender, abraçou minhas ideias e esteve sempre ao meu lado para resolvermos os problemas. Ao senhor, minha gratidão!

Ao Felipe, por conduzir grande parte deste trabalho junto comigo, além de colaborar e auxiliar em todos os momentos, pela amizade e companheirismo; à Karla, que esteve comigo desde que cheguei, foi minha parceira de muitos momentos, e mesmo de longe continuou prestando seu apoio e me ajudando com as análises. Amiga pra vida toda! Ao Felipe “Acerola”, que conduziu sua iniciação científica conosco e muito nos ajudou; ao meu cunhado Rafael, pela ajuda com as avaliações neurológicas dos leitões. Muito obrigada! Sem vocês esse trabalho não teria sido possível!

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Suínos pelos momentos de alegria e aprendizado, pela amizade e apoio, e aos estagiários e alunos de iniciação científica que já passaram por lá e nos ajudaram. Muito obrigada!

Ao Laboratório de Víruses da Reprodução, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, principalmente à Andrea, por ter executado os testes de virusneutralização com todo cuidado e dedicação.

Ao Laboratório de Epidemiologia Molecular, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, em especial à Andressa, por todo auxílio e paciência durante

as análises moleculares, e também à Roberta, Ingrid e Luciana pela companhia e momentos de descontração.

Ao Laboratório de Patologia Veterinária da FCAV, por me ceder espaço para realizar parte das análises histológicas.

Ao Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade de Brasília (LPV/UnB), em especial ao residente André Leonardo e Professores Pedro Pedroso e Juliana Targino, pela colaboração em parte das análises histológicas.

Ao Instituto Biológico de São Paulo, em especial a Dra. Edviges Maristela Pituco e a Dra. Claudia Pestana Ribeiro, por nos cederem o inóculo utilizado neste experimento e nos auxiliarem com diversos diagnósticos moleculares para sanarem nossas dúvidas. Muito obrigada!

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal e a todos os funcionários pela colaboração e empenho para que o projeto pudesse ser executado, principalmente o Arildo “Baiano”, que me ajudou inúmeras vezes com carregamento de ração dos animais, me auxiliou em diversos outros momentos durante todo meu mestrado, e foi fundamental para que eu conseguisse dar andamento ao meu experimento. Sou muito grata a vocês, de coração!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos processo número 2016/02982-3, e auxílio à pesquisa (2016/21421-2). Ao CNPq, pelo auxílio à pesquisa (409435/2016-3), que possibilitaram o desenvolvimento do projeto de pesquisa finalizado nessa dissertação.

## SUMÁRIO

	Página
Certificado Comissão de Ética para Experimentação Animal .....	xi
RESUMO .....	xii
ABSTRACT .....	xiii
LISTA DE TABELAS .....	xiv
LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS .....	xv
CAPÍTULO I – Considerações gerais .....	1
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 Tremor congênito .....	3
2.2 Gênero Pestivirus.....	4
2.3 Epidemiologia.....	5
2.4 Patogenia do tremor congênito.....	5
2.5 Atualidades sobre a doença.....	7
3 REFERÊNCIAS .....	8
CAPÍTULO II – Tremor Congênito em suínos: O Vírus da Diarreia Viral Bovina é um agente etiológico?.....	12
RESUMO.....	12
1 INTRODUÇÃO .....	14
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	16
2.1 Seleção e manejo dos animais .....	16
2.2 Delineamento experimental.....	16
2.2.1 Inóculo.....	17
2.2.2 Grupo 1 (G1) – inoculação oronasal das porcas gestantes.....	17
2.2.3 Grupo 2 (G2) – infecção intrauterina dos fetos.....	17
2.2.4 Grupo 3 (G3) – Grupo controle.....	18
2.3 Exame físico e colheita de amostras.....	18
2.4 Teste de Virusneutralização.....	20
2.5 Análises anatomohistopatológicas.....	21

2.6 RT-PCR .....	21
3 RESULTADOS.....	22
3.1 Grupo 1 (G1) – inoculação oronasal das porcas gestantes.....	22
3.1.1 Virusneutralização – Grupo 1.....	22
3.2 Grupo 2 (G2) – inoculação intrauterina dos fetos.....	23
3.2.2 Virusneutralização – Grupo 2.....	24
3.3 Exame físico.....	24
3.4 Análises anatomohistopatológicas.....	25
3.5 RT-PCR.....	25
4 DISCUSSÃO.....	25
5 CONCLUSÃO.....	29
6 AGRADECIMENTOS.....	29
7 CONFLITO DE INTERESSES.....	30
8 REFERÊNCIAS.....	30
APÊNDICES.....	38

## CERTIFICADO COMISSÃO DE ÉTICA PARA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal



### CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

#### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "**Mioclonia congênita em suínos: o vírus da diarreia viral bovina é um agente etiológico?**", protocolo nº 2.820/16, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luis Guilherme de Oliveira, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL - SP, em reunião ordinária de 03 de março de 2016.

Vigência do Projeto	15/03/2016 a 15/03/2018
Espécie / Linhagem	Suínos
Nº de animais	42
Peso / Idade	8 kg / 35 dias – 130 Kg/1,5 anos
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Laboratório de Pesquisa em Suínos

Jaboticabal, 03 de março de 2016.

  
**Profª Drª Lizandra Amoroso**  
Coordenadora – CEUA

## TREMOR CONGÊNITO EM SUÍNOS: O VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA É UM AGENTE ETIOLÓGICO?

**RESUMO** – O tremor congênito em suínos possui diversas etiologias, inclusive os pestivirus. O objetivo deste trabalho foi avaliar se o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é um dos agentes etiológicos da enfermidade. Para tal, foi realizada inoculação de dez fêmeas suínas gestantes com BVDV-2 em dois diferentes modelos experimentais, sendo o primeiro a inoculação oronasal das fêmeas (Grupo 1; n=4), e o segundo a inoculação fetal intrauterina (Grupo 2; n=4). O terceiro grupo (Grupo 3) foi o controle. As mães e os fetos foram desafiados aos 45 dias de gestação com BVDV-2. Foram colhidas amostras de sangue de todos os leitões nascidos para obtenção de sangue total e soro, para determinação dos títulos de anticorpos pela virusneutralização (VN) e detecção de RNA viral pela técnica de RT-PCR. Um terço dos neonatos foram eutanasiados ao terceiro dia de idade, e deles coletaram-se fragmentos de encéfalo, tronco encefálico e medula espinhal para avaliação anatomohistopatológica e RT-PCR. Os leitões que permaneceram vivos foram avaliados clinicamente todos os dias, e foi realizada colheita de sangue periodicamente durante 35 dias, as quais foram submetidas à sorologia (VN) e RT-PCR. Os leitões de ambos os grupos não apresentaram sinais clínicos neurológicos e nasceram com ausência de vírus no sangue e nos órgãos. Os leitões do Grupo 1 não apresentaram anticorpos contra o BVDV-2 ao nascimento, que posteriormente foram adquiridos por transferência passiva materna. Ao contrário, os leitões do Grupo 2 nasceram com altos títulos de anticorpos contra o agente, que permaneceram altos até o término do período experimental. Microscopicamente, não foram observadas alterações dignas de nota. Macroscopicamente, observou-se que 29,5% do total de leitões abatidos dos grupos infectados nasceram com baixa relação entre cérebro e cerebelo, o que pode ser indicativo de hipoplasia cerebelar. Desta forma, concluiu-se que o BVDV não parece ser um agente etiológico para o tremor congênito suíno.

**Palavras-chave:** hipoplasia cerebelar, infecção experimental, inoculação intrauterina, leitões, mioclonia

## CONGENITAL TREMOR IN PIGLETS: IS BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS AN ETIOLOGICAL AGENT?

**ABSTRACT** - Congenital tremor in pigs has several etiologies, including pestiviruses. The objective of this study was to evaluate whether bovine viral diarrhea virus (BVDV) is one of the etiological agents of this disease. Ten pregnant gilts were inoculated with BVDV-2 in two different experimental models, the first being the oronasal inoculation of the females (group 1; n=4), and the second was the intrauterine fetal inoculation (group 2; n=4). The third group (group 3) constituted the control group. Gilts and fetuses were challenged at 45 days of gestation with strain BVDV-2 SV 280. Blood samples were collected from all piglets born to obtain whole blood and serum for determination of antibody titers by virus neutralization (VN) and detection of viral RNA by the RT-PCR technique. One third of the neonates were euthanized at the third day of age, and fragments of brain, cerebellum, brain stem and spinal cord were collected for anatomopathological and RT-PCR evaluation. The piglets that remained alive were clinically evaluated every day, and blood samples were collected periodically for 35 days, which were submitted to serology (VN) and RT-PCR. The piglets of both groups showed no clinical neurological signs and were born without virus in the blood and organs. Group 1 piglets did not present antibodies against BVDV-2 at birth, which were acquired by passive maternal transfer. In contrast, Group 2 piglets were born with high antibody titers against the agent, which remained high until the end of the experimental period. Microscopically, no noticeable changes were observed. Macroscopically, it was observed that 29.5% of the total piglets slaughtered from the infected groups were born with a low ratio between brain and cerebellum, which may be indicative of cerebellar hypoplasia. Thus, it was concluded that BVDV does not appear to be an etiological agent for congenital pig tremor.

**Key words:** cerebellar hypoplasia, congenital tremor, experimental infection, intrauterine inoculation, piglets, myoclonus

**LISTA DE TABELAS**

	Página
Tabela 1. Data de soroconversão das porcas inoculadas pela via oronasal com solução viral de BVDV-2 e titulações apresentadas no teste de virusneutralização na primeira e última amostra reagente. Jaboticabal, SP, 2016 - 2017 .....	35
Tabela 2. Títulos de anticorpos anti-BVDV-2 em leitões inoculados pela via intrauterina, durante 35 dias. Jaboticabal, SP, 2016 - 2017.....	35
Tabela 3. Número de leitões distribuídos por faixa de proporção entre cerebelo e cérebro. Jaboticabal, SP, 2016 - 2017.....	35

## LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS

	Página
<p><b>Gráfico 1.</b> Percentual de leitões nascidos de porcas inoculadas com solução viral de BVDV-2 que apresentaram títulos de anticorpos contra o vírus, sendo A: animais provenientes da leitegada 1; B: animais provenientes da leitegada 2; C: animais provenientes da leitegada 3. D=Dia pós-nascimento Jaboticabal, SP, 2016.....</p>	36
<p><b>Figura 1.</b> Cortes de medula espinhal corados por Luxol Fast Blue; contra corados por Cristal Violeta para avaliação da mielinização do sistema nervoso central de neonatos suínos. Fig. 1a: Controle positivo de equino em quadro de desmielinização da substância branca. Fig. 1b. Corte de medula de leitão infectado pela via intrauterina, sem alterações na composição do tecido. Jaboticabal, SP, 2016 – 2017.....</p>	37
<p><b>Figura 2.</b> Cortes histológicas de fragmentos do sistema nervoso central de leitões corados por hematoxilina e eosina. <b>a.</b> Células ependimárias sem alteração. <b>b.</b> Camada germinativa externa, vista normalmente em recém-nascidos. <b>c.</b> Corpos de neurônio distribuídos na substância branca do cérebro, sem alteração. <b>d.</b> Corte de cerebelo normal. Jaboticabal, SP, 2016 – 2017.....</p>	37

## **CAPÍTULO 1 – Considerações gerais**

### **1. Introdução**

Os pestivírus são considerados agentes virais com grande capacidade de causar enfermidade disseminada e persistir sem ser detectado dentro de um rebanho. Os suínos podem ser infectados pelo BVDV em condições naturais, e os efeitos da infecção do BVDV no sistema nervoso de suínos ainda não foram esclarecidos. Entretanto, hipoplasia cerebelar, hipomielinização e tremores em bovinos já foram relatados. Transmissões verticais e suas diversas manifestações reprodutivas em bovinos foram relatados, mas os estudos com os suínos são escassos.

Dentro dos tipos de tremor congênito já documentados encontra-se o tipo A2, caracterizado por etiologias virais desconhecidas. Acreditava-se que o Circovírus Suíno tipo 2 (PCV-2) era o principal agente causador desta enfermidade, porém estudos recentes descartaram esta etiologia, o que fez ressurgirem as dúvidas quanto aos agentes etiológicos. Um dos principais causadores de tremor do tipo A1, o vírus da peste suína clássica (PSC), pertence ao mesmo gênero viral do estudo em questão. Além disso, um novo pestivírus já foi identificado como agente etiológico da doença, o que reforça a necessidade de se pesquisar a atuação do BVDV no sistema nervoso de suínos, visto que outros vírus deste gênero são comprovadamente causadores de tremor.

Por afetar principalmente primíparas, esta afecção pode caracterizar um problema em granjas produtoras de suínos, já que compromete o plantel de reposição e as leitegadas futuras. A ocorrência de tremor congênito impacta negativamente na economia, uma vez que os animais acometidos apresentam dificuldades de locomoção, gerando mortes por esmagamento e inanição, uma vez que os mesmos não conseguem alcançar os tetos para se alimentarem, levando a perdas produtivas e prejuízos aos produtores.

Atualmente há poucos estudos sobre a patogenicidade do BVDV na espécie suína, pois a maioria dos estudos está concentrada na espécie bovina. Este trabalho visa determinar, por meio de inoculações experimentais, se o BVDV-2 é capaz de

causar hipomielinização e outras lesões no sistema nervoso central de neonatos suínos, sendo um agente causador de tremor, além de esclarecer aspectos ligados às manifestações clínicas, patogenia, e o impacto na produção.

## 2. Revisão de literatura

### 2.1. Tremor Congênito

Doenças que afetam a formação da bainha de mielina ou as sinapses nervosas interrompem os impulsos elétricos, levando ao tremor (KENT SCARRAT, 2004). O tremor congênito suíno - TCS (Mioclonia Congênita) foi caracterizado por tremores da cabeça e dos membros em recém nascidos (EDWARDS & MULLEY, 1999). Está associado à desmielinização do cérebro e medula espinhal e é clinicamente observado em surtos de tremores em leitões neonatos por um período limitado de tempo, mas podem persistir até a idade de abate (BLOMSTRÖM et al., 2014). Os sinais clínicos do tremor estão associados a vários graus de hipomielinogênese da medula espinhal ou cérebro (DONE, 1976).

Existem duas classificações para os tremores congênitos. O tremor do Tipo A baseia-se na deficiência de mielina no sistema nervoso central e periférico, enquanto que na Tipo B não há deficiência de mielina (SEGALÉS et al., 2004). Além disso, o TCS Tipo A é dividido em 5 subtipos diferentes (A1-A5) (EDWARDS & MULLEY 1999).

Dentro das possíveis causas do TCS Tipo A encontram-se o vírus da Peste Suína Clássica (tipo A1), infecções virais por agentes não definidos (tipo A2), mioclonia ligada aos cromossomos sexuais (tipo A3), ligada aos genes recessivos de cromossomos autossômicos (tipo A4), intoxicação por triclorfon (tipo A5), e intoxicação por micotoxinas tremorigênicas (A6), sendo esta última apenas evidenciada experimentalmente (MARE & KLUGE, 1974; SOBESTIANSKY & BARCELOS, 2012). O tipo A2 é a forma mais comum de mioclonia congênita na maioria das granjas produtoras de suínos em diversos países e afeta ambos os sexos e todas as raças (MARE & KLUGE, 1974; SOBESTIANSKY & BARCELOS, 2012).

Sabe-se que o vírus da Peste Suína Clássica é capaz de causar tremores congênitos em leitões infectados pela via intrauterina, além do nascimento de crias fracas e inviáveis, malformações congênitas, abortos e nascimento de animais persistentemente infectados (RIDPATH, 2012). Assim como na PSC, Tunca et al.

(2006) afirmam que as malformações mais comuns em fetos bovinos infectados pelo BVDV por via transplacentária são hipoplasia cerebelar e hipomielinização.

## 2.2 Gênero Pestivirus

O gênero *Pestivirus* pertence à família Flaviviridae, constituído pelos vírus da peste suína clássica, o vírus da diarreia viral bovina e o vírus da doença das fronteiras, que infectam exclusivamente os animais (HOEHE, 2012; RIDPATH et al., 2012), e se caracteriza por vírus esféricos com 40 a 60 nm de diâmetro e nucleocapsídeo icosaédrico, revestido por um envelope derivado das membranas da célula do hospedeiro (WEBER, 2013; SCHWEIZER; PETERHANS, 2014).

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) pode infectar hospedeiros de diferentes espécies (bovinos, búfalos, ovinos, caprinos e suínos) em condições naturais (RIDPATH et al., 2012.)

Os pestivirus são classificados em dois biotipos, os citopáticos (cp) e os não citopáticos (ncp). Não existem evidências que comprovem haver relação entre a citopatogenicidade e a virulência, uma vez que cepas ncp do BVDV, em geral, causam a forma mais grave da enfermidade (RIDPATH et al., 2000).

Os ncp são normalmente encontrados a campo e capazes de produzir infecção persistente em fetos bovinos, no caso do BVDV essas infecções persistentes ocorrem em fetos bovinos infectados entre 40 e 120 dias de prenhez, porém os cp são considerados uma mutação do biotipo ncp e por isso são menos comuns na natureza (RIDPATH et al., 2012).

Também se observa a apresentação do BVDV em dois genótipos, BVDV tipo 1 e BVDV tipo 2, de acordo com as características antigênicas e análises filogenéticas (RADOSTITS et al., 2007). O BVDV-1 está ligado às infecções mais brandas e moderadas, descritas como amostras clássicas do vírus ou cepas de referência (FLORES et al., 2000). Por outro lado, o BVDV-2 está relacionado a uma alta morbidade e mortalidade em bovinos, levando a problemas reprodutivos, respiratórios ou entéricos, doença hemorrágica e trombocitopenia (BRUM et al., 2013).

### **2.3 Epidemiologia**

No Brasil, Gatto (2015) conduziu estudos de prevalência em 1930 amostras de frigorífico entre 2013 e 2014, e observou 5,34% de positividade para BVDV entre os suínos do estado de São Paulo. Em outro estudo conduzido na região nordeste do estado de São Paulo (2015), Almeida (2015) obteve, em 360 amostras de sangue suíno, 1,94% reagentes ao BVDV-1 e 3,06% reagentes ao BVDV-2, entre os anos de 2014 e 2015.

O BVDV pode ser transmitido por contato direto ou indireto entre os animais. O vírus pode ser eliminado através de secreções nasais, oculares, genitais, orais, como leite, sêmen, urina e fezes. A transmissão vertical aos embriões/fetos é uma consequência frequente em vacas prenhes (THURMOND, 2005).

Quando a infecção ocorrer durante a gestação bovina, o BVDV pode atravessar a barreira transplacentária e acometer o feto. Dependendo do período gestacional e do tipo do vírus que infecta a vaca gestante, pode ocorrer infertilidade temporária, retorno ao cio, mortalidade embrionária ou fetal, abortos ou mumificações, má formações fetais e nascimento de bezerros fracos (FLORES et al., 2000). Se a infecção for causada por uma cepa ncp do BVDV-1 ou BVDV-2 antes dos 120 dias de gestação, o feto não é capaz de possuir imunocompetência e reconhece o vírus como próprio e podem nascer persistentemente infectado (PI), eliminando continuamente vírus no ambiente (GROOMS, 2004).

Em rebanhos positivos para BVDV, as malformações são relatadas quando a infecção do feto ocorre entre 100 e 150 dias de gestação causando problemas no sistema nervoso, pois este período relaciona-se ao estágio final da organogênese. Os achados patológicos descritos com mais frequência são hipoplasia cerebelar, hidrocefalia, microcefalia, mielinização deficiente da medula espinhal, atrofia ou displasia da retina, microftalmia, catarata, além de hipoplasia tímica, hipotricose, braquignatismo e artrogripose (RIDPATH et al., 2012).

### **2.4 Patogenia do tremor congênito**

O vírus da Diarreia Viral Bovina tem uma predileção por tecidos mitoticamente ativos, incluindo células do sistema nervoso central, como as células da glia e retina

(MOENING & LIESS, 1995). O diagnóstico de hipoplasia cerebelar pode ser baseado em sinais de disfunção cerebelar em animais recém-nascidos e confirmado por exame pós-morte (MOENING & LIESS, 1995). Em animais normais, a proporção esperada varia entre 9,5-11%, sendo que em casos de hipoplasia cerebelar esta proporção pode variar entre 7-9% (POPE et al., 1986).

Ainda não é bem definida a patogênese da hipomielinização após a infecção, mas acredita-se que haja um efeito deletério sobre o desenvolvimento e função de oligodendrócitos. Estudos com BVDV têm reproduzido resultados obtidos em estudos com BDV, em que as células infectadas abrangem neurônios, astrócitos, oligodendrócitos, células endoteliais, células ependimais e fibroblastos (MONTGOMERY et al., 2008). As células afetadas pelo BVDV no sistema nervoso são basicamente as células da neurógliia (ou glia), as quais sustentam os neurônios e podem participar da atividade neuronal ou da defesa. No SNC, essas células são os astrócitos, os oligodendrócitos, as células da microglia e as células ependimais (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

Os astrócitos são células que apresentam muitos prolongamentos, em várias direções, e são responsáveis pelo suporte estrutural para os neurônios, proliferação e reparo após injúrias, além de participarem de vias metabólicas moduladoras de íons, neurotransmissores e metabólitos neuronais. Os oligodendrócitos são menores que os astrócitos, e seus prolongamentos envolvem os axônios dentro do SNC, sendo responsáveis pela formação da bainha de mielina. A microglia é uma célula pequena, de difícil identificação e principal apresentadora de antígeno do SNC. Não são abundantes em condições normais, porém em caso de injúrias, são ativadas e podem se proliferar e migrar para o local da lesão. As células ependimais revestem os ventrículos encefálicos, aqueduto do mesencéfalo e o canal central da medula espinhal. Estão relacionadas com a produção do líquido cerebrospinal juntamente com os plexos coriáceos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

As experiências sugerem que as cepas de BVDV tipo 2 infectam o cérebro fetal mais facilmente do que as cepas do tipo 1, embora ambos os tipos tenham tropismo por tecidos semelhantes. Um aumento do número de processos astrocíticos próximos a axônios foi observado no em cordeiros infectados com BVDV (BIELEFELDT-OHMANN et al., 2008).

Processos microgliais adjacentes à bainha de mielina, que contenham restos de substância semelhante à mielina e vacúolos, foram observados em infecção pela Peste Suína Clássica e Doença das Fronteiras. Embora rara, esta constatação sugere que a destruição da mielina pré-formada ou mielina anormalmente formada podem desempenhar um papel na patogênese da doença (BINKHORST ET AL., 1983)

Estudos em bovinos provaram que animais infectados naturalmente em fase gestacional pelo BVDV apresentaram ao nascimento hipoplasia cerebelar, deficiências de crescimento, além de alguns casos de hidrocefalia e hidranencefalia (BLANCHARD et al., 2010). Outros sinais relatados por Binkhorst et al. (1983) abrangem incoordenação moderada, variando da incapacidade de permanecer em estação até movimentos espásmicos incontrolados, tremores da cabeça e do corpo, podendo evoluir para espasmos tetânicos à excitação. Microscopicamente, observou-se deficiência de mielina após coloração especial, comparando-se com cortes controle de animais saudáveis da mesma idade. Também notou-se presença de células gliais anormais. Baseado nas observações clínicas e epidemiológicas, confirmou-se que as alterações neurológicas nos bezerros foram causadas pelo BVDV.

Geralmente as infecções por BVDV em suínos cursam sem sinais clínicos, mas em animais adultos foram relatados problemas reprodutivos, nascimento de leitões fracos, aborto e mumificação fetal (VANNIER & ALBINA, 1999). Porcas prenhes já foram inoculadas experimentalmente com o BVDV-1 no 65º dia de gestação (WALZ et al., 2004), porém não foram encontrados achados relevantes, com isso a necessidade de uma análise mais ampla com diversos isolados em diferentes tempos da gestação para esclarecer as consequências do BVDV nos suínos.

## **2.5 Atualidades**

Estudos recentes identificaram um novo *pestivirus* causador de tremor congênito em leitões, mundialmente presente nos rebanhos suínos, denominado “Atypical Porcine Pestivirus – APPV”, que leva à hipomielinização moderada da substância branca do cerebelo e medula espinhal. O vírus tem sido encontrado

amplamente difundido entre os rebanhos, com grande variabilidade entre as amostras, e já foi encontrado na Espanha, Estados Unidos, Alemanha, Holanda, Áustria, China, e recentemente no Brasil (Hause et al., 2015; Arruda et al., 2016; Beer et al., 2016; De Groof et al., 2016; Schwarz et al., 2017; Yuan et al., 2017; Zhang et al., 2017; Gatto et al., 2017; Mósená et al., 2017). Nestes estudos, o APPV foi capaz de causar tremor congênito em suínos cursando com desnutrição e morte dos leitões afetados.

Conhecimentos mais profundos sobre a doença, bem como os processos patológicos, perdas advindas e suas implicações são necessários, tendo em vista a importância da suinocultura no cenário nacional.

### 3. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, H. M. S. **Epidemiologia e prevalência de infecções pelo Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) em suínos de criações não tecnificadas**. 2015. 43f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista - UNESP. Jaboticabal-SP.

ARRUDA, B. L.; ARRUDA, P. H.; MAGSTADT, D. R.; SCHWARTZ, K. J.; DOHLMAN, T.; SCHLEINING, J. A.; VICTORIA, J. G. Identification of a divergent lineage porcine pestivirus in nursing piglets with congenital tremors and reproduction of disease following experimental inoculation. **PloS one**, v. 11, n. 2, p. e0150104, 2016.

BEER, M.; WERNIKE, K.; DRÄGER, C.; HÖPER, D.; POHLMANN, A.; BERGERMANN, C. High prevalence of highly variable atypical porcine pestiviruses found in Germany. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 64, n. 5, 2017.

BIELEFELDT-OHMANN, H.; TOLNAY, A. E.; REISENHAEUER, C. E.; HANSEN, T. R.; SMIRNOVA, N.; & VAN CAMPEN, H. Transplacental infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus types 1b and 2: viral spread and molecular neuropathology. **Journal of Comparative Pathology**, v. 138, n. 2, p. 72-85, 2008.

BINKHORST, G. J.; JOURNÉE, D. L. H.; WOUDE, W.; STRAYER, P. J.; & VOS, J. H. Neurological disorders, virus persistence and hypomyelination in calves due to intra-uterine infections with bovine virus diarrhoea virus: I. Clinical symptoms and morphological lesions. **Veterinary Quarterly**, v. 5, n. 4, p. 156-164, 1983.

BLANCHARD, P. C.; RIDPATH, J. F.; WALKER, J. B.; HIETALA, S. K. An outbreak of late-term abortions, premature births, and congenital deformities associated with

Bovine Viral diarrhoea Virus 1 subtype b that induces thrombocytopenia. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 22, n. 1, p. 128-131, 2010

BLOMSTRÖM, A. L.; LEY, C.; JACOBSON, M. Astrovirus as a possible cause of congenital tremor type All in piglets? **Acta veterinaria scandinavica**, v. 56, n. 1, p. 82, 2014.

BRUM, J. S.; KONRADT, G.; BAZZI, T.; FIGHERA, R. A.; KOMMERS, G. D.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. L. Características e frequência das doenças de suínos na Região Central do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 10, p. 1208-1214, 2013.

DE GROOF, A.; DEIJS, M.; GUELEN, L.; VAN GRINSVEN, L.; VAN OS-GALDOS, L.; VOGELS, W. Atypical porcine pestivirus: a possible cause of congenital tremor type A-II in newborn piglets. **Viruses**, v. 8, n. 10, p. 271, 2016.

DONE, J. T. The congenital tremor syndrome in pigs. **Veterinary Annual**, 1976.

EDWARDS, M. J.; MULLEY, R. C. Genetic, developmental, and neoplastic diseases. In: STRAW, B. E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W. L. & TAYLOR, D. J. (Eds.) **Diseases of Swine**. 8th Ed. Iowa State University Press, Ames. 1999. p 695-721.

FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; SCHERER, C. F. C.; GIL, L. H. V. G.; PILATI, C.; DRIEMEIER, D.; MOOJEN, V.; WENDELSTEIN, A. C. Identificação do vírus da diarréia viral bovina tipo 2 (BVDV-2) no sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 2, n. 20, p. 85-89, 2000.

GATTO, I. R. H. **Prevalência de anticorpos contra o vírus da diarréia viral bovina em suínos**. 2015. 76f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista - UNESP. Jaboticabal-SP.

GATTO, I. R. H.; ARRUDA, P. H.; SILVA, P.; HARMON, K.; BRADNER, L.; SIMIONATO, G. C.; MECHLER, M. L.; SCHWARTZ, K. J.; OLIVEIRA, L. G.; ARRUDA, B. L. First detection of atypical porcine pestivirus (APPV) in piglets with congenital tremor in South America. **Anais do XVIII Congresso da Abaraves**. 301f , p. 85-86. 2017.

GROOMS, D. L. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 5-19, 2004.

HAUSE, B. M.; COLLIN, E. A.; PEDDIREDDI, L.; YUAN, F.; CHEN, Z.; HESSE, R. A.; ANDERSON, G. Discovery of a novel putative atypical porcine pestivirus in pigs in the USA. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 10, p. 2994-2998, 2015

HOEHE, P.; BRITO, W. D. Infecções por pestivírus de ruminantes. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. E. S. N. (Eds.) **Doenças dos suínos**. 2ª Ed., Goiânia: Cãnone editorial. p 352-354-285, 2012.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido nervoso. In: JUNQUEIRA J.; CARNEIRO F. **Histologia Básica: Texto & Atlas**. 12ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 149-175, 2013.

- MARE, C. J.; KLUGE, J. P. Pseudorabies virus and myoclonia congenita in pigs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 164, n. 3, p. 309, 1974.
- MOENNIG, V.; LIESS, B. Ruminant pestivirus infection in pig. **Revue scientifique et technique International Office of Epizootics OIE**, vol. 9, n.1, p. 151-161, 1990.
- MONTGOMERY, D. L.; VAN OLPHEN, A.; VAN CAMPEN, H.; & HANSEN, T. R. The fetal brain in bovine viral diarrhoea virus-infected calves: lesions, distribution, and cellular heterogeneity of viral antigen at 190 days gestation. **Veterinary Pathology**, v. 45, n. 3, p. 288-296, 2008
- MÓSENA, A. C. S.; WEBER, M. N.; DA CRUZ, R. A. S.; CIBULSKI, S. P.; SILVA, M. S.; PUHL, D. E.; CANAL, C. W. Presence of atypical porcine pestivirus (APPV) in Brazilian pigs. **Transboundary and emerging diseases**, 2017.
- OLIVEIRA, S. J. Mioclonia Congênita. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. **Doença de Suínos**. 2ª ed. Goiânia: Cãnone, p. 775-782, 2012.
- POPE, A. M.; HEAVNER, J. E.; GUARNIERI, J. A.; KNOBLOCH, C. P. Trichlorfon-induced congenital cerebellar hypoplasia in neonatal pigs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 189, n. 7, p. 781-783, 1986.
- RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W. A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. **Veterinary Medicine**, 10th ed., Saunders-Elsevier, Edinburgh, 2156p, 2007.
- RIDPATH, J. F.; NEILL, J. D.; FREY, M.; LANDGRAF, J. G. Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. **Veterinary Microbiology**, v. 77, p. 145-155, 2000.
- RIDPATH, J. F.; BAUERMAN, F. V.; FLORES, E. F. Flaviviridae, In: Flores, E.F. (Ed.) **Virologia Veterinária**. 2ª Ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2012. p 563-592.
- SCHWARZ, L.; RIEDEL, C.; HÖGLER, S.; SINN, L. J.; VOGLMAYR, T.; WÖCHTL, B.; RÜMENAPF, T. Congenital infection with atypical porcine pestivirus (APPV) is associated with disease and viral persistence. **Veterinary Research**, v. 48, n. 1, p. 1, 2017.
- SCHWEIZER, M; PETERHANS, E. Pestiviruses. **Annual Review Of Animal Biosciences**, v. 2, p.141-163, 2014.
- SCARRATT, W. K.. Cerebellar disease and disease characterized by dysmetria or tremors. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 20, n. 2, p. 275-286, 2004.
- THURMOND, M. C. Virus Transmission. In: GOYAL S. M.; RIDPATH J. F. (Eds). **Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, management and control**. Blackwell Publishing, Oxford, UK, p.91-104. 2005.

TUNCA, R.; HAZIROGLU, R.; GUVENC, T.; KUTSAL, O.; OZSOY, S. Y. 2006. Congenital cerebellar hypoplasia associated with BVD-MD virus infection in a naturally infected calf - a case report. **Veterinarski Arhiv**, v. 76, n. 5, p. 453-460, 2006.

VANNIER, P.; ALBINA, E. Bovine viral diarrhoea and border disease. In: STRAW, B.E., D'ALLAIRE, S., MENGELING, W. L., TAYLOR, D. J. (Eds). *Diseases of Swine*, 8th ed., Ames, Blackwell Science, 1999.

WALZ, P. H.; BAKER, J. C.; MULLANEYS, T. P.; MAES, R. K. Experimental Inoculation of Pregnant Swine with Type 1 Bovine Viral Diarrhoea Virus. **Zoonoses and Public Health**, v. 51, n. 4, p. 191-193, 2004

WEBER, M. N. **Identificação, caracterização e análise filogenética de pestivírus em bovinos**. 2013. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

YUAN, J.; HAN, Z.; LI, J.; HUANG, Y.; YANG, J.; DING, H. 2017. Atypical Porcine Pestivirus as a Novel Type of Pestivirus in Pigs in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.

ZHANG, K.; WU, K.; LIU, J.; GE, S.; XIAO, Y.; SHANG, Y.; NING, Z. Identification of atypical porcine pestivirus infection in swine herds in China. **Transboundary and Emerging Diseases**, 2017.

<sup>1</sup>Capítulo II - TREMOR CONGÊNITO EM SUÍNOS: O VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA É UM AGENTE ETIOLÓGICO?

Mechler, M. L., Gomes, F. S., Nascimento, K. A., Pires, F. F. B., Souza-Pollo, Samara, S. I., A., Pituco, E. M., Oliveira, L. G.

**Resumo**

O tremor congênito em suínos possui diversas etiologias, inclusive pestivirus. O objetivo deste trabalho foi avaliar se o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é um dos agentes etiológicos da enfermidade. Para tal, foi realizada inoculação de dez fêmeas suínas gestantes com BVDV-2 em dois diferentes modelos experimentais, sendo o primeiro a inoculação oronasal das fêmeas (Grupo 1; n=4), e o segundo a inoculação fetal intrauterina (Grupo 2; n=4). O terceiro grupo (Grupo 3; n=2) constituiu o grupo controle. As mães e os fetos foram desafiados aos 45 dias de gestação com BVDV-2. Foram colhidas amostras de sangue de todos os leitões nascidos para obtenção de sangue total e soro, para determinação dos títulos de anticorpos por vírusneutralização (VN) e detecção de RNA viral pela técnica de RT-PCR. Um terço dos neonatos foram eutanasiados ao terceiro dia de idade, e deles coletaram-se fragmentos de encéfalo, tronco encefálico e medula espinhal para avaliação anatomohistopatológica e RT-PCR. Os leitões que permaneceram vivos foram avaliados clinicamente todos os dias, e foi realizada colheita de sangue periodicamente durante 35 dias, as quais foram submetidas à sorologia (VN) e RT-PCR. Os leitões de ambos os grupos não apresentaram sinais clínicos neurológicos e nasceram com ausência de vírus no sangue e nos órgãos. Os leitões do Grupo 1 não apresentaram anticorpos contra o BVDV-2 ao nascimento, os quais foram adquiridos por transferência passiva materna. Ao contrário, os leitões do

---

<sup>1</sup> Artigo formatado de acordo com o padrão gráfico da revista Veterinary Microbiology. ISSN 0378-1135

Grupo 2 nasceram com altos títulos de anticorpos contra o agente, os quais permaneceram altos até o término do período experimental. Microscopicamente, não foram observadas alterações dignas de nota. Macroscopicamente, observou-se que 29,5% do total de leitões abatidos dos grupos infectados nasceram com baixa relação entre cérebro e cerebelo, o que pode ser indicativo de hipoplasia cerebelar. Desta forma, concluiu-se que o BVDV não é um agente etiológico para o tremor congênito suíno.

**Palavras-chave:** hipoplasia cerebelar, infecção experimental, inoculação intrauterina, leitões, mioclonia

## 1. Introdução

O gênero *Pestivirus* pertence à família *Flaviviridae*, constituído pelos vírus da Peste Suína Clássica (CSFV), o vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) e o vírus da doença das fronteiras (Hoehe, 2012; Ridpath et al., 2012). O BDV e o BVDV pode ocasionalmente infectar hospedeiros de diferentes espécies (búfalos, ovinos, caprinos e suínos) em condições naturais (Ridpath et al., 2012)

O BVDV pode ser transmitido por contato direto ou indireto entre os animais. O vírus pode ser eliminado por meio de secreções nasais, oculares, genitais, orais, leite, sêmen, urina e fezes, e a transmissão vertical aos embriões/fetos é frequente em vacas prenhes (Thurmond, 2005).

Se a infecção for causada por uma cepa não citopática (ncp) do vírus da Diarreia Viral Bovina tipo 1 (BVDV-1) ou tipo 2 (BVDV-2) antes dos 120 dias de gestação em bovinos, o feto não possui imunocompetência e reconhece o vírus como próprio, podendo nascer persistentemente infectado (PI), eliminando continuamente vírus no ambiente e sem anticorpos contra o agente (Grooms, 2004).

Em rebanhos bovinos infectados pelo BVDV, as malformações fetais descritas com mais frequência são hipoplasia cerebelar, hidrocefalia, microcefalia, mielinização deficiente da medula espinhal, atrofia ou displasia da retina, microftalmia, catarata, além de hipoplasia tímica, hipotricose, braquignatismo e artrogripose (Ridpath et al., 2012).

Doenças que afetam a formação da bainha de mielina ou as sinapses nervosas alteram os impulsos elétricos nos neurônios, levando ao tremor (Scarrat, 2004). O tremor congênito suíno - TCS (Mioclonia Congênita) é caracterizado por tremores da cabeça e dos membros em recém-nascidos (Edwards; Mulley, 1999). Esta patologia está associada à desmielinização do cérebro e medula espinhal e é clinicamente observado em surtos de tremores em leitões

neonatos por um período limitado de tempo, mas podem persistir até a idade de abate (Blomström et al., 2014). Além disso, sabe-se que os sinais clínicos do tremor congênito estão associados a vários graus de hipomielinogênese da medula espinhal ou cérebro (Schwarz, 2017).

Estudos recentes identificaram um novo *pestivirus* causador de tremor congênito em leitões, mundialmente presente nos rebanhos suínos, denominado “Atypical Porcine Pestivirus – APPV”, que leva à hipomielinização moderada da substância branca do cerebelo e medula espinhal. O vírus tem sido encontrado amplamente difundido entre os rebanhos, com grande variabilidade entre as amostras, e já foi encontrado na Espanha, Estados Unidos, Alemanha, Holanda, Áustria, China, e recentemente no Brasil (Hause et al., 2015; Arruda et al., 2016; Schwarz et al., 2017; Gatto et al., 2017; Mósena et al.; 2017). Nestes estudos, o APPV foi capaz de causar tremor congênito em suínos cursando com desnutrição e morte dos leitões afetados.

Sabe-se que o vírus da Peste Suína Clássica é capaz de causar tremores congênitos em leitões infectados pela via intrauterina, além do nascimento de crias fracas e inviáveis, malformações congênitas, abortos e nascimento de animais persistentemente infectados (OIE, 2015c). Assim como na PSC, Tunca et al. (2006) afirmam que as malformações mais comuns em fetos bovinos infectados pelo BVDV por via transplacentária são hipoplasia cerebelar e hipomielinização.

Geralmente as infecções por BVDV em suínos jovens cursam sem sinais clínicos, mas em animais adultos foram relatados problemas reprodutivos, nascimento de leitões fracos, aborto e mumificação fetal (Vannier e Albina, 1999).

Porcas prenhes já foram inoculadas experimentalmente com o BVDV-1 no 65º dia de gestação (Walz et al., 2004), porém não foram encontrados achados relevantes, com isso a

necessidade de uma análise mais ampla com diversos isolados em momentos diferentes da gestação para esclarecer as consequências da infecção pelo BVDV nos suínos.

Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo com inoculação intrauterina de BVDV em suínos, e teve como objetivo avaliar se este vírus é um possível agente etiológico do tremor congênito, com capacidade de causar lesões no SNC de neonatos suínos e hipoplasia cerebelar.

## **2. Material e métodos**

### *2.1 Seleção e manejo dos animais*

Dez fêmeas suínas de linhagem comercial, primíparas, com idade de 180 dias e peso entre 90 a 100 kg, livres de PSC foram adquiridas de empresa especializada na criação e produção de suínos, em região também livre de PSC. As marrãs foram vacinadas contra doenças reprodutivas (parvovirose, leptospirose e erisipela) e eram sorologicamente negativas para BVDV-1 e BVDV-2.

### *2.2 Delineamento experimental*

As dez fêmeas foram organizadas em três grupos experimentais, sendo o grupo 1 (n=4) inoculado pela via oronasal, o grupo 2 (n=4) inoculado pela via intrauterina, e o grupo 3 (n=2) constituiu o grupo controle. Os grupos foram alojados nas mesmas condições, porém o grupo controle foi isolado dos demais, e todos receberam alimentação de acordo com as fases gestacionais, conforme preconiza o Nutricional Research Council (NRC, 2012).

### *2.2.1 Inóculo*

O inóculo utilizado foi isolado de amostra de campo (BVDV SV 260, genótipo 2 ncp), proveniente de isolado de caso clínico em bovino (VOGEL et al., 2001; FLORES et al., 2005), uma vez que ruminantes são a maior fonte de infecção para os suínos (Ridpath, 2010). Foi administrada uma dose viral com título  $10^{5.5}$  TCID<sub>50</sub>/mL de BVDV-2 cultivada em células MDBK. O inóculo foi testado em bezerro, sendo confirmada a capacidade de causar viremia e levar o animal à soroconversão. Os resultados das análises de sangue e soro do bezerro inoculado podem ser observados no Apêndice A.

### *2.2.2 Grupo 1 (G1) – inoculação oronasal das porcas gestantes*

A inoculação oronasal das fêmeas visou simular condições naturais para infecção pelo BVDV, as quais permitem a interferência do sistema imunológico materno na dinâmica da infecção. Para tal, quatro porcas gestantes foram inoculadas aos 45° dia gestação.

As porcas foram inoculadas pelas vias intranasal e oral, para simular as vias de infecção natural. O inóculo foi administrado em 15 ml de EMEM (Eagles Minimal Essential Medium), sendo 10 mL instilados por seringa nas narinas e 5 ml administrados por via oral, segundo cálculos de Cabezón et al. (2010). Todas as marrãs passaram por colheitas de sangue em intervalos de 72h, para observação da ocorrência de viremia e soroconversão, até o momento do parto.

### *2.2.2 Grupo 2 (G2) – infecção intrauterina dos fetos*

Este modelo visou avaliar os efeitos do vírus diretamente no feto, excluindo-se a atuação da barreira placentária e do sistema imunológico da fêmea. Quatro porcas gestantes

foram submetidas à laparotomia ao 45º dia de gestação para a inoculação intrauterina, em que cada feto recebeu o inóculo nas respectivas vesículas amnióticas.

A indução pré-anestésica foi realizada com aplicação intramuscular de uma combinação de cetamina e midazolam, nas doses de 3 mg/kg e 0,5 mg/kg, respectivamente. Após a indução, foi preparado o acesso venoso por meio da veia auricular medial ou lateral, para manutenção anestésica com infusão contínua de propofol a 4 mg/kg. Cada porca foi colocada em decúbito lateral esquerdo, e o abdômen direito preparado para laparotomia asséptica. Em seguida, realizou-se bloqueio local em “L invertido” com lidocaína 2%, não ultrapassando 7 mg/kg, e 3 ml da mesma para bloqueio do nervo torácico lateral.

Para acesso à cavidade, foi feita uma incisão paramediana de 25 cm aproximadamente, preservando-se o tecido mamário. O útero foi exteriorizado e cada feto recebeu 0,5ml da mesma solução viral em suas respectivas vesículas amnióticas, utilizando-se agulha de calibre 12,7 mm x 0,33 mm. A parede abdominal foi suturada em três camadas usando fio de sutura absorvível sintético. Cada procedimento levou aproximadamente 1 hora.

### *2.2.3 Grupo 3 (G3) – Grupo controle*

As duas porcas deste grupo receberam 15 ml de placebo, administrado pelas vias intranasal e oral, sendo 10 mL instilados com seringa nas narinas e 5 ml por via oral, contendo apenas meio EMEM. As fêmeas passaram por colheitas de sangue em intervalos de 72h até o momento do parto.

### *2.3 Exame físico e colheitas de amostras*

A gestação foi acompanhada para observação de quaisquer alterações, e os partos foram assistidos para garantir que os leitões nascidos não ingerissem o colostro antes da primeira

colheita de sangue, e que recebessem os primeiros cuidados ao nascimento. Dos leitões nascidos vivos, 1/3 de cada leitegada foi aleatoriamente selecionado para eutanásia e necropsia ao terceiro dia, de modo que fosse possível a observação clínica nos três primeiros dias de vida.

A eutanásia dos leitões foi realizada conforme preconizam os métodos aceitáveis nas diretrizes e práticas de eutanásia aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (protocolo nº 2820/16). Na necropsia, foi realizada a colheita de fragmentos de córtex cerebral (frontal, temporal, parietal e occipital), bulbo, tálamo, hipotálamo, cerebelo, medula espinhal (cervical e lombar) para exame anatomopatológico e RT-PCR. Os fragmentos de tecido nervoso foram divididos em três amostras para acondicionamento, sendo uma em formol 10% para avaliações histopatológicas e duas armazenadas em freezer a -80°C.

Todas as mães e leitões passaram por colheitas de sangue e soro em intervalos de 72h, para observação de viremia e soroconversão. As fêmeas foram avaliadas até o momento do parto, e todos os leitões passaram por colheitas de sangue ao nascimento, antes da ingestão do colostro, e os leitões remanescentes foram avaliados até os 35 dias de vida. As amostras de sangue foram coletadas com seringa estéril descartável, livres de anticoagulantes, e obtidas a partir da punção da veia jugular com agulhas 25x7. O sangue era depositado em tubos esterilizados, com EDTA, para obtenção do sangue total; e em tubos livres de anticoagulantes seguidas de centrifugação a 15000 x g por 10 minutos para obtenção de soro sanguíneo. As amostras de sangue total e soro foram armazenadas em duplicatas em microtubos graduados de 2,0 mL, acondicionados em freezer a -80°C e -20°C, respectivamente, até o momento da realização das análises.

Devido ao curto período de meia-vida dos anticorpos colostrais (Blecha, 1998), o sangue dos leitões do G1 foi colhido em intervalos de 72h, enquanto que o sangue dos

animais do G2 foi colhido em intervalos de sete dias, já que a resposta imune individual possui maior duração (Morein, 2002).

Os neonatos dos três grupos que permaneceram vivos passaram por exame clínico neurológico, para avaliação quanto ao acometimento do sistema nervoso durante os primeiros 35 dias de vida. Os parâmetros clínicos avaliados nos leitões foram avaliações neurológicas e de comportamento (*head tilt*, *head turn*, rigidez descerebrada, rigidez descerebelada, marcha, tremores involuntários), reações posturais (propriocepção e saltitamento), avaliação de nervos cranianos (resposta à ameaça, reflexo pupilar, reflexo palpebral e sensibilidade facial, nistagmo fisiológico), reflexos miotáticos e de tônus muscular (membros torácicos, membros pélvicos e reflexo perianal), avaliação sensorial (nocicepção e palpação da coluna). O modelo da ficha de avaliação está representado no Apêndice B.

#### 2.4 Teste de Virusneutralização (VN)

Todas as amostras de soro foram testadas ao mesmo tempo, e foram submetidas a diluições sucessivas iniciando-se em 1:10 até 1:5120, sendo consideradas reagentes as amostras que apresentaram neutralização total de 100 TCID<sub>50</sub> de BVDV-2 em uma concentração acima de 1:10 conforme preconizado pelo “*Manual of Diagnostic Tests and Vaccines of Terrestrial Animals*” (OIE, 2015a), exceto pelo fato de que as amostras foram processadas em duplicatas. Para a realização do teste foram utilizadas células epiteliais de rim bovino da linhagem *Madin-Darby Bovine Kidney* (MDBK) e como vírus padrão o BVDV-2 citopático (cp). O título de anticorpos considerado para as amostras reagentes foi equivalente à recíproca da maior diluição na qual ocorreu neutralização total das 100 TCID<sub>50</sub>, fato verificado pela ausência de efeito citopático no tapete celular.

### *2.5 Análises anatomohistopatológicas*

Foram realizadas análises macroscópicas e microscópicas. Dentre as análises macroscópicas, foi mensurada a proporção entre cérebro e cerebelo para verificação da ocorrência de hipoplasia cerebelar. Para tal cálculo, cada órgão foi pesado individualmente em balança de precisão. Em animais com quadro de de hipoplasia cerebelar esta proporção pode variar entre 7%-9%, segundo Pope et al., 1986.

Para análises microscópicas, todas as amostras foram fixadas por imersão em formalina por 72 horas e depois em álcool 70%, para posterior inclusão em parafina. Amostras de tecidos foram cortadas e coradas pelas técnicas de Hematoxilina/Eosina e Luxol Fast Blue (Sigma®) com contra coloração por Cristal Violeta, e avaliadas quanto à presença de lesões e desmielinização do sistema nervoso central.

### *2.6 RT-PCR*

Os fragmentos de córtex cerebral (frontal, temporal, parietal e occipital), bulbo, tálamo, hipotálamo, cerebelo, medula espinhal (cervical e lombar) e amostras de sangue total foram avaliados para detecção do BVDV por RT-PCR. Todo material coletado foi armazenado em tubos estéreis, livres de RNAses, e refrigerados em freezer a -80°C até o momento da extração.

O RNA das amostras foi extraído utilizando Tri reagent (Sigma) e transcrito em cDNA pela utilização do kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), segundo instruções do fabricante. Para identificação do BVDV nas amostras, foi utilizado o par de primers 103 (5'- TAG CCA TGC CCT TAG TAG GAC - 3') e 392 (5'- ACT CCA TGT GCC ATG TAC AGC - 3') que amplifica um produto de 290 pb (Weinstock et al., 2001).

As reações de PCR foram compostas por tampão 1X (KCl 50 mM, Tris-HCl 200 mM pH 8,4); MgCl<sub>2</sub> 2 mM; dNTP's 0,2 mM, 1,0U de Taq DNA polimerase, 5 pmol de cada

oligonucleotídeo iniciador, 3 µL de produto da RT-PCR e água pura estéril para um volume final de 20 µL. Para a amplificação, utilizou-se um termociclador programado para realizar um ciclo a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos a 94°C por 30 seg., 30 seg. 58°C e 40 seg. a 72°C, e para finalizar, um ciclo a 72°C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos a uma segunda amplificação utilizando-se o mesmo protocolo descrito anteriormente.

Os produtos da segunda amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5mg.mL<sup>-1</sup>) e padrão de tamanho molecular 100 pb DNA Ladder Plus (Thermo Scientific), e após foram visualizados sob luz UV, em equipamento de fotodocumentação GEL DOC XR (BioRad).

### **3. Resultados**

#### *3.1 Grupo 1 - inoculação oronasal das porcas gestantes*

As fêmeas 1, 2, 3 e 4 não apresentaram alterações clínicas durante o período gestacional. A leitegada 4 foi retirada do estudo, já que a porca apresentou comportamento agressivo pós-parto, culminando com a morte da leitegada. As leitegadas 1, 2 e 3 totalizaram 45 animais.

##### *3.1.1 Virusneutralização - Grupo 1*

As análises sorológicas mostraram que as quatro marrãs infectadas apresentaram soroconversão entre duas e três semanas após a inoculação experimental. Os primeiros títulos de anticorpos anti- BVDV-2 foram detectados no 17º, 20º, 18º e 22º dias pós-infecção (dpi) nas fêmeas 1, 2, 3 e 4, respectivamente, e se mantiveram até o momento do parto. Os títulos

variaram entre 20 e 40 nas primeiras colheitas, e as últimas amostras apresentaram títulos entre 20 e 10, conforme apresentado na Tabela 1.

No que diz respeito aos leitões, as análises sorológicas estão representadas no Gráfico 1, que equivale às leitegadas das fêmeas 1, 2 e 3 (L1, L2 e L3), respectivamente. É possível observar que ao nascimento - D(0) - nenhum leitão apresentou títulos de anticorpos contra o agente. No entanto, após a ingestão do colostro, 85% (12/14), 33% (5/15) e 68% (11/16) dos leitões, respectivamente, apresentaram sorologia reagente para o BVDV-2 no D(3).

Os títulos não se mantiveram constantes durante o período lactacional. Nas leitegadas 1 e 2 houve forte decréscimo entre a 2ª e 3ª semana de lactação, visto que somente 7% dos leitões (L1) apresentaram títulos aos 18 dias de idade, e 20% aos 12 dias (L2); enquanto que na leitegada 3 (L3) os anticorpos estiveram presentes até o fim da fase de maternidade em 6% dos animais.

A virusneutralização indicou que a transferência de imunidade colostrar ocorreu em todas as leitegadas, porém a manutenção dos níveis de anticorpos anti-BVDV-2 é inconstante e pouco eficiente, com rápido decréscimo dos títulos. Nenhum leitão apresentou títulos após o desmame, realizado aos 28 dias de idade.

### *3.2 Grupo 2 – inoculação intrauterina dos fetos*

Das quatro porcas que passaram por procedimento cirúrgico para inoculação intrauterina, duas desenvolveram febre e abortaram todos os fetos no 1º e 2º dpi. Desta forma, apenas duas porcas mantiveram a gestação e pariram naturalmente, sem intervenção, na data esperada.

As duas leitegadas totalizaram 19 animais, sendo dois mumificados, três natimortos e 14 vivos. De acordo com a estimativa da idade fetal dos mumificados (BARLOW, 1998),

acredita-se que os mesmos foram a óbito aos 56 e 61 dias de gestação, ou seja, aos 11 e 16 dpi respectivamente.

### *3.2.2 Virusneutralização - Grupo 2*

Diferentemente dos leitões do Grupo 1, todos os animais deste grupo apresentaram altos títulos de anticorpos contra o BVDV-2 ao nascimento, os quais se mantiveram altos até o fim do período experimental. Nota-se que alguns animais (3, 4 e 6) foram capazes de intensificar a resposta imunológica contra o agente durante o período amostral. Apesar da citotoxicidade de algumas amostras em diferentes momentos, pode-se afirmar que todos os leitões apresentavam títulos do 1° ao 35° dia de colheita, visto que apresentaram anticorpos neutralizantes contra o vírus em amostras anteriores e posteriores àquelas citotóxicas. Os títulos de anticorpos presentes nos leitões do Grupo 2 durante os 35 dias de vida estão dispostos na Tabela 2.

### *3.3 Exame Físico*

Todos os leitões foram avaliados diariamente quanto ao acometimento do sistema nervoso. Não foram observadas alterações dignas de nota nos mesmos, pois todas as respostas aos estímulos apresentavam normalidade desde o nascimento, e passaram a ser mais intensas à medida em que os animais se desenvolviam. Desta forma, não foi observada nenhuma característica de tremor congênito nos animais estudados. Os mesmos resultados foram observados nos leitões do grupo controle.

### *3.4 Análises anatomohistopatológicas*

As proporções entre cérebro e cerebelo, calculada à partir do peso individual de cada órgão, estão indicadas na Tabela 3, representado pelo número de leitões plotados em diferentes faixas de distribuição das proporções. Observa-se que 29,5% dos leitões dos grupos infectados apresentaram proporção menor que 9%, o que pode ser indicativo de hipoplasia cerebelar. O restante dos animais apresentou proporção dentro do que é considerado normal para a espécie, ou valores acima da média. Porém, não houve diferença significativa no teste de Tukey entre os leitões do grupo infectado e os leitões do grupo controle.

Microscopicamente, a coloração por HE mostrou que não houve lesão característica da infecção nos diferentes tecidos amostrados. Ademais, a coloração por Luxol Fast Blue indicou que não houve hipomielinização ou perda de tecido nos fragmentos avaliados. As imagens das lâminas estão demonstradas nas Figuras 1 e 2.

### *3.5 RT-PCR*

Não foi detectada presença do RNA viral por RT-PCR nas amostras de órgãos e sangue dos leitões avaliados, assim como nos tecidos dos mumificados e natimortos. Os animais controle foram negativos em todos os testes. Em relação às fêmeas do G1, não foi detectada viremia nas amostras testadas.

## **4. Discussão**

Diferentemente do que se observou em infecções experimentais com APPV em suínos e com BVDV em ruminantes, os resultados deste estudo não possibilitaram atribuir ao BVDV-2 uma das etiologias do tremor congênito, visto que nenhum leitão nascido de fêmeas inoculadas durante a gestação, tanto pela via oronasal quanto pela via intrauterina, apresentou sinais de alteração clínica ou patológica ao nascimento sugestivo desta enfermidade.

No Grupo 1, os animais nasceram com ausência de vírus e anticorpos contra o BVDV-2, mas estes foram obtidos pelos neonatos após ingestão do colostro em todas as leitegadas. Já no Grupo 2, os leitões nasceram não virêmicos porém com títulos de anticorpos entre 80 e 640 contra o agente viral.

A característica epiteliocorial da placenta suína, na qual a circulação materna está separada da fetal por seis camadas de tecidos, possui função primordial na proteção uterina contra patógenos. Por outro lado, esta barreira física impede também a transferência de imunoglobulinas da mãe para o feto via placenta, o que faz com que os leitões sejam totalmente dependentes da aquisição de imunidade colostrar (Salmon, 1984; Salmon et al., 2009). Este fato corrobora com os achados de anticorpos anti-BVDV-2 nos leitões do G1, e indiretamente indicam que não houve transmissão vertical do vírus para os leitões, confirmado pela não detecção de RNA viral nas amostras por RT-PCR e pela sorologia negativa ao nascimento.

De um modo geral, os títulos de anticorpos colostrais permanecem altos até cerca de duas a três semanas de idade (Boersema et al., 1998; Butler et al., 2009). No Grupo 1, a manutenção da imunidade contra o agente durou entre duas e três semanas, apesar dos títulos de anticorpos anti-BVDV-2 encontrados abaixo de 160.

Observou-se grande variação na transferência de imunidade colostrar entre as leitegadas, já que os percentuais de leitões imunizados variaram de 34% a 85%. Este fato pode ser atribuído à qualidade colostrar de porcas primíparas, à variação individual das porcas na resposta imunológica contra o BVDV-2, e à diferença na capacidade absorptiva entre leitões de uma mesma leitegada, visto que houve variações tanto nos valores dos títulos de anticorpos neutralizantes de um animal para outro, quanto na duração da resposta. De modo geral, os títulos de anticorpos contra o BVDV em suínos desafiados são baixos, com média de 20 a 40.

A infecção pelo BVDV-2 pode levar à ocorrência de malformações fetais em bovinos, porém, se o feto sobreviver à infecção por tempo suficiente, mudanças não específicas de maturação podem ocorrer nos tecidos linfoides. Investigações sorológicas em fetos bovinos experimentalmente inoculados com o vírus indicaram o desenvolvimento de competência imune específica anterior ao período já estabelecido na literatura (Ohmann, 1982). Esta condição também foi observada no Grupo 2, em que todos os fetos inoculados apresentaram soroconversão frente ao desafio antes dos 70 dias de gestação, período caracterizado pelo início da imunocompetência fetal suína (Barlow, 1998). Acredita-se que os fetos inoculados cirurgicamente neste estudo, após receberem o estímulo infeccioso, deram início a uma resposta imunológica precoce, que foi se desenvolvendo paralelamente ao amadurecimento do sistema imunológico dos mesmos. Desta forma, houve o desenvolvimento de altos títulos de anticorpos contra o BVDV-2 ao nascimento, os quais persistiram até o final do período experimental.

Os resultados observados no Grupo 2 indicam que houve infecção pelo vírus, e a permanência da resposta imune em títulos crescentes após o nascimento sugere que o BVDV-2 poderia ainda estar presente em órgãos dos leitões, estimulando continuamente a resposta imunológica. Estudos de repertório de anticorpos indicaram que os fetos que sobrevivem a alguns tipos de infecções virais são capazes de produzir uma resposta específica contra os agentes (Butler et al., 2009). Esta resposta à infecção é inicialmente fraca, tendo aumento perto do nascimento, quando há maior maturidade do sistema imunológico (Sinkora e Butler, 2009).

Informações sobre o desenvolvimento de resposta imune inata em suínos são escassas, mas acredita-se que as primeiras células de defesa aparecem juntamente com as primeiras atividades hematopoiéticas (Sinkora e Butler, 2009). A linfopoiese está intimamente ligada à

hematopoiese, já que em suínos as células B se desenvolvem em órgãos hematopoiéticos primários, como o fígado fetal, aproximadamente aos 30 dias de gestação, e algumas células T aos 45 (Sinkora et al., 2003).

Este estudo revelou que 29,5% dos leitões dos grupos infectados (G1 e G2) apresentaram proporção menor que 9%. Por outro lado, 52% dos animais apresentaram proporção acima de 11%, incluindo animais do Grupo controle (G3). Pope et al. (1986) afirmam que, em quadros de hipoplasia cerebelar, a proporção entre cérebro e cerebelo varia entre 7% e 9%, enquanto que os padrões de normalidade se estabelecem entre 9,5% e 11%. Estes resultados confrontam os dados existentes na literatura no que concerne ao padrão de normalidade para a espécie, e mostraram que há variações mesmo entre animais não desafiados. No entanto, esses dados não são corroborados pelos achados de histopatologia dos órgãos do sistema nervoso central dos leitões no presente estudo, e sugerem que novas pesquisas sejam conduzidas para avaliar a real proporção entre estes órgãos na espécie suína, já que os dados utilizados para comparação disponíveis na literatura são antigos e não parecem ser apropriados para tal.

Histopatologicamente, os tecidos fetais se apresentaram sem alterações microscópicas características da infecção, o que contrasta o encontrado por Ohmann (1982), que inoculou uma cepa de BVDV-2 em fetos bovinos pela via intrauterina, e observou alterações cerebelares que consistiam em necrose e depleção da camada germinativa externa, além de infiltrados mononucleares.

O estudo em questão também contrapõe os dados encontrados por Postel et al. (2016) em estudo sobre tremor congênito causado por APPV, que observaram que leitões afetados pelo tremor apresentaram diminuição da mielina em cortes de medula; e Blanchard et al.

(2010), também relataram que fetos bovinos infectados por BVDV apresentaram deficiência de mielina na medula e cerebelo.

A dificuldade de detecção de RNA viral em amostras de sangue não necessariamente implica em ausência de viremia no período estudado, visto que a viremia do BVDV em suínos pode ser de caráter transiente, ocorrendo em curtos intervalos. Casos em que a infecção pelo BVDV induziu grande quantidade de lesões em suínos adultos são causados por cepas virais com longo histórico de passagem e infecções nesta espécie (Terpstra e Wensvoort, 1988).

Embora o BVDV não represente uma ameaça importante aos plantéis de suínos, a presença do vírus no rebanho pode culminar com reação sorológica cruzada com o vírus da PSC, devido à semelhança antigênica, interferindo negativamente nos programas de monitoramento e vigilância da Peste Suína Clássica, e levando a confusões diagnósticas da mesma (Loeffen et al., 2009).

## **5. Conclusão**

A infecção experimental intrauterina de fetos suínos por BVDV-2 no terço médio da gestação levou ao desenvolvimento de intensa resposta imunológica contra o vírus, o que não foi observado em leitões nascidos de mães inoculadas com o agente. Este trabalho mostrou que, experimentalmente, a infecção pelo BVDV-2 não cursou com sinais clínicos ou lesões anatomohistopatológicas, e não levou ao quadro de tremor congênito em suínos.

## **6. Agradecimentos**

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; 2016/02982-3) pela concessão da bolsa de pesquisa e auxílio à pesquisa (2016/21421-2). Ao CNPq, pelo auxílio à pesquisa (409435/2016-3). Ao Prof. Dr. Flores EF, da UFSM, e a Dra. Ribeiro CP,

do Instituto Biológico de São Paulo, pela concessão do inóculo e realização de testes laboratoriais. À Andrea Medeiros, do Laboratório de viroses da Reprodução da FCAV, pelo auxílio com as análises sorológicas. Ao Prof. Dr. Pedrosa PMO e Profa. Dra. Macedo JTSA, do Laboratório de Patologia da UnB, pelo auxílio com as análises histológicas.

## 7. Conflito de interesse

Não há conflito de interesses.

## 8. Referências

- Arruda, B.L., Arruda, P.H., Magstadt, D.R., Schwartz, K.J., Dohlman, T., Schleining, J.A., Victoria, J.G., 2016. Identification of a divergent lineage porcine pestivirus in nursing piglets with congenital tremors and reproduction of disease following experimental inoculation. *PLoS one*, 11(2), e0150104.
- Barlow, A., 1998. A guide to the investigation of porcine abortion/stillbirth. In *Practice*. 20, 559-564.
- Blanchard, P.C., Ridpath, J.F., Walker, J.B., Hietala, S.K., 2010. An outbreak of late-term abortions, premature births, and congenital deformities associated with Bovine Viral diarrhoea Virus 1 subtype b that induces thrombocytopenia. *J Vet Diagn Invest* 22,128 - 131.
- Blecha, F., 1998. Immunological aspects: comparison with other species. *The lactating sow*, 23-44.
- Blomström, A.L., Ley, C; Jacobson, M., 2014. Astrovirus as a possible cause of congenital tremor type AII in piglets? *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56, 82.
- Boersema, W.J., Van Rooij, E.M., Scholten, W.J., Zwart, R.J., Kimman, T.G., Bianchi, A., 1998. Silent memory induction in maternal immune young animals. *Vet Quart*. 20, 89–92.
- Butler, J.E., Un, J., Weber, P., Ford, S.P., Rehakova, Z., Sinkora, J., 2001. Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets. IV. Switch recombination, primarily in fetal thymus occurs independent of environmental antigen and is only weakly associated with repertoire diversification. *J Immunol*; 167, 3239–3249.
- Butler, J.E., Lager, K.M., Splichal, I., Francis, D., Kacs Kovics, I., Sinkora, M., Dewald, R., 2009. The piglet as a model for B cell and immune system development. *Vet Immunol Immunop*, 128, 147-170.

Cabezón, O., Rosell, R., Sibila, M., Lavín, S., Marco, I., Segalés, J., 2010. Experimental infection of pigs with border disease virus isolated from Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica*). *J Vet Diag Invest*, 22, 360–365.

Edwards, M.J., Mulley, R.C., 1999. Genetic, developmental, and neoplastic diseases. In: Straw, B.E., Dállaire, S., Mengeling, W.L. & Taylor, D.J. (Eds.) *Diseases of Swine*. 8th Ed. Iowa State University Press, Ames. pp 695-721.

Flores, E. F., Weiblen, R., Vogel, F. S. F., Roehe, P. M., Alfieri, A. A., & Pituco, E. M. 2005. A infecção pelo vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) no Brasil: histórico, situação atual e perspectivas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. Rio de Janeiro, RJ. Vol. 25, n. 3, p. 125-134.

Gatto, I. R. H.; Arruda, P. H.; Silva, P.; Harmon, K.; Bradner, L.; Simionato, G. C.; Mechler, M. L.; Schwartz, K. J.; Oliveira, L. G.; Arruda, B. L. 2017. First detection of atypical porcine pestivirus (APPV) in piglets with congenital tremor in South America. *Proceedings of XVIII Congresso da Abraves*. 301p , p. 85-86.

Grooms, D.L., 2004. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. *Vet Clin N Am-Food A*. 20, 5-19.

Hause, B.M., Collin, E.A., Peddireddi, L., Yuan, F., Chen, Z., Hesse, R.A., Anderson, G., 2015. Discovery of a novel putative atypical porcine pestivirus in pigs in the USA. *J Gen Virol*. 96, 2994-2998.

Hoehe, P., Brito, W.D., 2012. Infecções por pestivírus de ruminantes. In: Sobestiansky, J., Barcellos, D.E.S.N. (Eds). *Doenças dos suínos*. 2.ed., Goiânia: Cãnone editorial. pp 352-354-285.

Loeffen, W.L.A., Van Beuningen, A., Quak, S., Elbers, A.R.W., 2009. Seroprevalence and risk factors for the presence of ruminant pestiviruses in the Dutch swine population. *Vet Microbiol*. 136, 240-245.

Morein, B; Abusugra, I; Blomqvist, G., 2002. Immunity in neonates. *Vet immun immunopathol*. 87, 207-213.

Mósen, A.C.S., Weber, M.N., Da Cruz, R.A.S., Cibulski, S.P., Silva, M.S., Puhl, D.E., Canal, C.W., 2017. Presence of atypical porcine pestivirus (APPV) in Brazilian pigs. *Transbound Emerg Dis*.

National Research Council., 2012. *Nutrient requirements of swine*. Natl Acad Press.

OIE - WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH ). Bovine Viral Diarrhea In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines of Terrestrial Animals*. P.698-710. 2015a. Available at <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.04.07\\_BVD.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.07_BVD.pdf)> Accessed on 04 Apr 2016.

OIE – WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. Map of CSF official status. 2015c. Available at <<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/official-diseasestatus/classical-swine-fever/map-of-csf-official-status/>> Accessed on 11 abr. 2016.

- Ohmann, H.B., 1982. Experimental fetal infection with bovine viral diarrhea virus. II. Morphological reactions and distribution of viral antigen. *Can J Comp Med.* 46, 363.
- Pope, A.M., Heavner, J.E., Guarnieri, J.A., Knobloch, C.P., 1986. Trichlorfon-induced congenital cerebellar hypoplasia in neonatal pigs. *J Am Vet Med Assoc.* 189, 781-783.
- Postel, A., Hansmann, F., Baechlein, C., Fischer, N., Alawi, M., Grundhoff, A., Baumgärtner, W., 2016. Presence of atypical porcine pestivirus (APPV) genomes in newborn piglets correlates with congenital tremor. *Sci Rep-UK*, 6, 27735.
- Ridpath, J.F., Bauermann, F.V., Flores, E.F. 2012. Flaviviridae, In: Flores, E.F. (Ed.) *Virologia Veterinária*. 2nd Ed. Santa Maria: Editora UFSM, p 565-589.
- Salmon, H., 1984. Immunity in the fetus and the newborn infant: a swine model. *Reprod Nutri Dev.* 24, 197-206.
- Salmon, H., Berri, M., Gerdt, V., Meurens, F., 2009. Humoral and cellular factors of maternal immunity in swine. *Dev Comp Immunol.* 33, 384-393.
- Scarratt, W.K., 2004. Cerebellar disease and disease characterized by dysmetria or tremors. *Vet Clin Food Anim.* 20, 275-286
- Schwarz, L., Riedel, C., Högl, S., Sinn, L. J., Voglmayr, T., Wöchtel, B., Rügenapf, T., 2017. Congenital infection with atypical porcine pestivirus (APPV) is associated with disease and viral persistence. *Vet Res.* 48, 1.
- Sinkora, M., Sun, J., Sinkorova, J., Christenson, R.K., Ford, S.P., Butler J.E., 2003. Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets. VI. B-cell lymphogenesis occurs at multiple sites with differences in the frequency of in-frame rearrangements. *J Immunol.* 170:1781–1788.
- Sinkora, M, Butler, J E., 2009. The ontogeny of the porcine immune system. *Developmental & Comparative Immunology*, 33, 273-283.
- Terpstra, C., Wensvoort, G., 1988. Natural infections of pigs with bovine viral diarrhoea virus associated with signs resembling swine fever. *Res Vet Sci.* 45, 137-142.
- Tunca, R., Haziroglu, R., Guvenc, T., Kutsal, O., Ozsoy, S.Y. 2006. Congenital cerebellar hypoplasia associated with BVD-MD virus infection in a naturally infected calf - a case report. *Vet Arhiv.* 76, 453-460.
- Thurmond, M.C., 2005. Virus Transmission. In: Goyal S.M., Ridpath J.F. (Eds). *Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, management and control*. Blackwell Publishing, Oxford, UK. pp.91-104.
- Vannier, P; Albina, E., 1999. Bovine viral diarrhea and border disease. In: Straw, B.E., D'allaire, S., Mengeling, W. L., Taylor, D. J. (Eds). *Diseases of Swine*, 8th ed., Ames, Blackwell Science.

Vogel, F. S. F., Scherer, C. F. C., Flores, E. F., Weiblen, R., de Lima, M., & Kunrath, C. F. 2001. Resposta sorológica e avaliação de proteção fetal em ovelhas prenhes vacinadas contra o vírus da diarreia viral bovina (BVDV). *Ciência Rural*, 31(5), 831-838

Walz, P.H., Baker, J.C., Mullaneys, T.P., Maes, R.K., 2004. Experimental Inoculation of Pregnant Swine with Type 1 Bovine Viral Diarrhoea Virus. *J Vet Med*. 51, 191-193.

Weinstock, D., Bhudevi, B., Castro, A.E., 2001. Single-tube single-enzyme reverse transcriptase PCR assay for detection of BVDV in pooled bovine serum. *J Clin Microbiol*. 39, 343–346.

**TABELAS E FIGURAS**

**Tabela 1.** Data de soroconversão das porcas inoculadas pela via oronasal com solução de BVDV-2 e titulações apresentadas no teste de virusneutralização na primeira e última amostra reagente. Jaboticabal, SP, 2016 – 2017.

Fêmea	Soroconversão (dpi*)	Titulação inicial	Titulação final (55 dpi)
1	17°	20	10
2	20°	20	10
3	18°	40	20
4	22°	20	10

\*Dpi = dia pós-infecção.

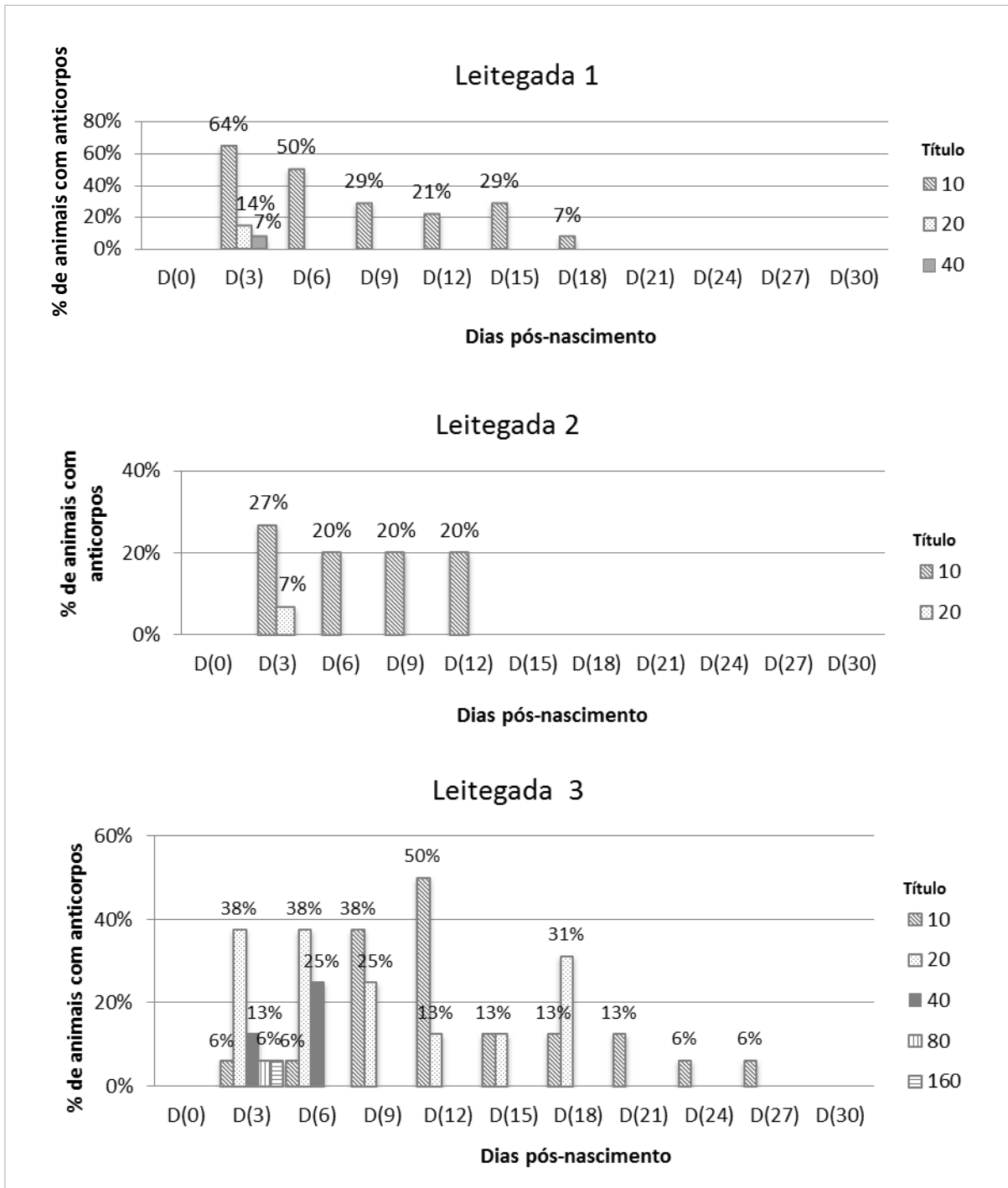
**Tabela 2.** Títulos de anticorpos anti-BVDV-2 em leitões inoculados pela via intrauterina aos 45 dias de gestação. Amostras colhidas durante 35 dias após o nascimento. Jaboticabal, SP, 2016 – 2017.

Leitões	D(0)	D(7)	D(14)	D(21)	D(28)	D(35)
1	640	640	640	CT	320	160
2	640	2560	640	CT	320	320
3	160	640	640	5120	320	160
4	160	5120	CT	1280	2560	1280
5	CT	1280	CT	640	640	320
6	80	1280	CT	5120	5120	5120
7	CT	5120	CT	2560	2560	2560
8	CT	5120	CT	5120	2560	2560
9	640	*	*	*	*	*
10	640	*	*	*	*	*
11	320	*	*	*	*	*
12	640	*	*	*	*	*
13	640	*	*	*	*	*
14	640	*	*	*	*	*

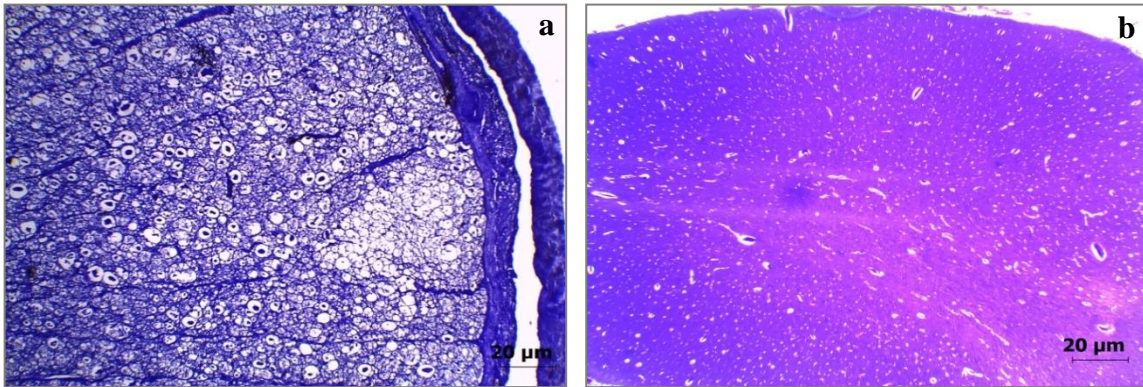
D = dia pós-nascimento. CT = Amostra citotóxica, impossibilidade de leitura. (\*) Animal eutanasiado ao 3º dia de vida.

**Tabela 3.** Número de leitões distribuídos por faixa de proporção entre cerebelo e cérebro em cada grupo experimental. Jaboticabal, SP, 2016 - 2017

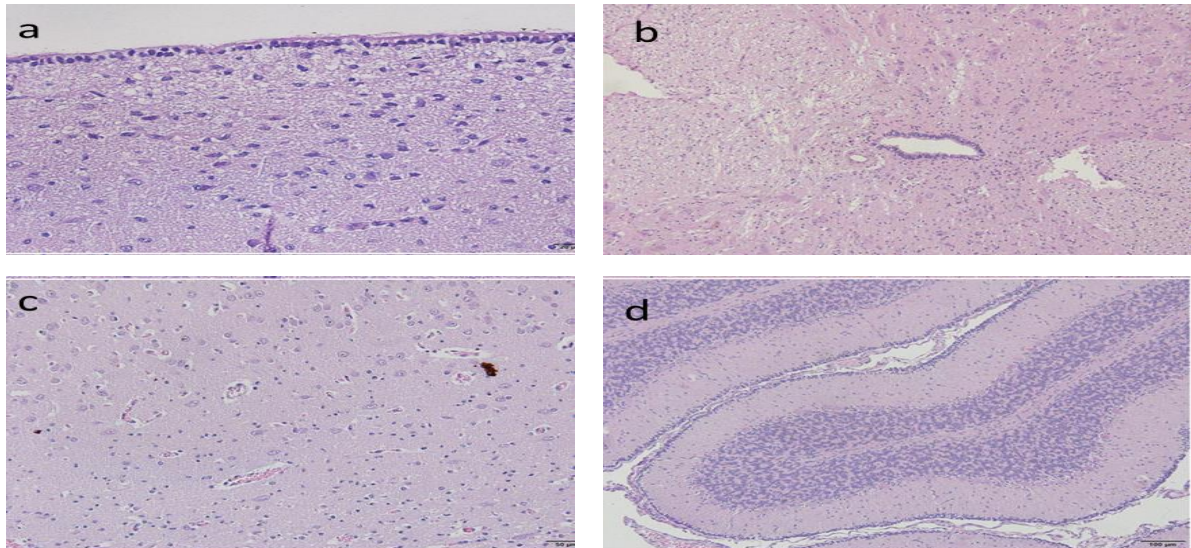
Proporção Cérebro - Cerebelo								
Grupo 1 (n=11)			Grupo 2 (n=6)			Grupo controle (n=6)		
< 9%	9 - 11%	>11%	< 9%	9 - 11%	> 11%	< 9%	9 - 11%	> 11%
n=4	n=1	n=6	n=1	n=2	n=3	n=1	n=2	n=3
(36.4%)	(9.1%)	(54.5%)	(16.6%)	(33.3%)	(50%)	(16.6%)	(33.3%)	(50%)



**Gráfico 1.** Percentual de leitões nascidos de porcas inoculadas com solução viral de BVDV-2 que apresentaram títulos de anticorpos contra o vírus, sendo **A:** animais provenientes da leitegada 1; **B:** animais provenientes da leitegada 2; **C:** animais provenientes da leitegada 3. D=Dia pós-nascimento.



**Figura 1.** Cortes de medula espinhal corados por Luxol Fast Blue; contra corados por Cristal Violeta para avaliação da mielinização do sistema nervoso central de neonatos suínos. Fig. 1a: Controle positivo de equino em quadro de desmielinização da substância branca. Fig. 1b. Corte de medula de leitão infectado pela via intrauterina, sem alterações na composição do tecido. Jaboticabal, SP, 2016 – 2017



**Figura 2.** a. Cortes histológicos de fragmentos do sistema nervoso central de leitões corados por hematoxilina e eosina. a. Células ependimárias sem alteração. b. Camada germinativa externa, vista normalmente em recém-nascidos. c. Corpos de neurônio distribuídos na substância branca do cérebro, sem alteração. d. Corte de cerebelo normal. Jaboticabal, SP, 2016

## APÊNDICES

**APÊNDICE A** – Exames para detecção do vírus da diarreia viral bovina e anticorpos contra o BVDV, por RT-PCR e virusneutralização, respectivamente, em amostras de sangue e soro de um bezerro inoculado com o agente pela via oronasal.

<b>Tipo de amostras/Nºtotal:</b> 14 soros e 14 sangues <b>Espécie:</b> BOVINO <b>Sexo:</b> M			
<b>DATA COLHEITA</b>	<b>BVD</b>		
	<b>BVDV I – VN (soro)</b>	<b>BVDV II – VN (soro)</b>	<b>RT-PCR (sangue)</b>
D(0)	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE	NEGATIVO
D(1)	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE	NEGATIVO
D(2)	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE	NEGATIVO
D(3)	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE	NEGATIVO
D(4)	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE	NEGATIVO
D(5)	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE	<b>POSITIVO</b>
D(6)	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE	<b>POSITIVO</b>
D(7)	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE	<b>POSITIVO</b>
D(8)	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE	<b>POSITIVO</b>
D(9)	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE	<b>POSITIVO</b>
D(10)	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE	<b>POSITIVO</b>
D(11)	NÃO REAGENTE	REAGENTE	<b>POSITIVO</b>
D(12)	NÃO REAGENTE	REAGENTE	<b>POSITIVO</b>
D(13)	NÃO REAGENTE	REAGENTE	<b>POSITIVO</b>
D(14)	NÃO REAGENTE	REAGENTE	<b>POSITIVO</b>
D(15)	NÃO REAGENTE	REAGENTE	<b>POSITIVO</b>
D(16)	NÃO REAGENTE	REAGENTE	NEGATIVO
D(17)	NÃO REAGENTE	REAGENTE	NEGATIVO
D(18)	NÃO REAGENTE	REAGENTE	NEGATIVO
D(19)	NÃO REAGENTE	REAGENTE	NEGATIVO

D=Dias pós inoculação.

**APÊNDICE B** – Roteiro de avaliações clínicas realizadas em todas as leitegadas nos primeiros 35 dias de vida, para observação de ocorrência de alterações neurológicas.

AVALIAÇÃO CLÍNICA			AVALIAÇÃO CLÍNICA		
ALTERAÇÕES	SIM	NÃO	ALTERAÇÕES	SIM	NÃO
<b>ESTADO MENTAL E COMPORTAMENTO</b>			<b>NERVOS CRANIANOS</b>		
Postura			Reflexo pupilar		
Head tilt			Reflexo palpebral e sensibilidade facial		
Head turn			Nistagmo fisiológico		
Rigidez descerebrada			<b>REFLEXOS MIOTÁTICOS (ESPINHAIS) E TÔNUS MUSCULAR</b>		
Rigidez descerebelada			Membros torácicos		
Marcha			Membros pélvicos		
Tremores voluntários			Reflexo perineal		
<b>REAÇÕES POSTURAS</b>			<b>AVALIAÇÃO SENSORIAL</b>		
Propriocepção			Nocicepção		
Saltitamento			Palpação da coluna		