



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



IVANA FERRO CARMO

**HERPESVÍRUS BOVINO TIPO I – EFEITO SOBRE A QUALIDADE
ESPERMÁTICA E ESTRATÉGIAS PARA SUA REDUÇÃO EM SÊMEN
EXPERIMENTALMENTE INFECTADO**

IVANA FERRO CARMO

**HERPESVÍRUS BOVINO TIPO I – EFEITO SOBRE A QUALIDADE
ESPERMÁTICA E ESTRATÉGIAS PARA SUA REDUÇÃO EM SÊMEN
EXPERIMENTALMENTE INFECTADO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Ribeiro
Câmara

Coorientador: Prof. Dr. Abelardo Silva
Júnior

Catálogo na fonte Universidade Federal de Alagoas Biblioteca Polo Viçosa

Bibliotecário Responsável: Stefano João dos santos

C287h Carmo, Ivana Ferro.

Herpesvírus Bovino tipo I – efeito sobre a qualidade
espermática e estratégias para sua redução em sêmen
experimentalmente infectado / Ivana Ferro Carmo - 2025.

52f. ; il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade
Federal de Alagoas, Campus Ceca, Polo Viçosa, 2025.

Orientação: Prof. Dr Diogo Ribeiro Câmara

Coorientador: Prof. Dr. Abelardo Silva j

Inclui bibliografia.

1. Ruminantes. 2. Herpesvírus Bovino . I.

FOLHA DE APROVAÇÃO

IVANA FERRO CARMO

HERPESVÍRUS BOVINO TIPO I – EFEITO SOBRE A QUALIDADE ESPERMÁTICA E ESTRATÉGIAS PARA SUA REDUÇÃO EM SÊMEN EXPERIMENTALMENTE INFECTADO

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciência
Animal - PPGCA, da Universidade Federal
de Alagoas, e aprovada em 27/08/2025.

Documento assinado digitalmente
 **DIOGO RIBEIRO CAMARA**
Data: 02/09/2025 10:25:21-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientador: Prof. Dr. Diogo Ribeiro Câmara
(Universidade Federal de Alagoas)

Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente
 **ABELARDO SILVA JÚNIOR**
Data: 04/09/2025 19:15:35-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinador Interno: Prof. Dr. Abelardo Silva Júnior
(Universidade Federal de Alagoas)

Documento assinado digitalmente
 **RAFAEL AUGUSTO SATRAPA**
Data: 03/09/2025 08:28:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinador Externo: Prof. Dr. Rafael Augusto Satrapa
(Universidade Federal de Acre)

DEDICATÓRIA

A todos que seguraram minha
mão quando a estrada apertou,
que enxugaram minhas lágrimas
no silêncio das madrugadas,
e celebraram comigo até as
pequenas vitórias.

Esta página é para vocês, que
moram nas entrelinhas da minha
jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar meus passos e ouvir a minha mais silenciosa e sincera oração.

Aos meus pais, José Ivan e Maria Aparecida, e a minha irmã, Isabelly Ferro, que estiveram presentes em todas as etapas, dedico cada linha escrita com fé e esforço.

Ao meu noivo, Ryan Leonídio, meu companheiro de dias bons e ruins, por ouvir minhas angústias sem julgamento, me incentivar a ir além e comemorar comigo cada passo, por menor que fosse. Sua presença foi abrigo.

Agradeço à Universidade Federal de Alagoas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, por tornarem esse sonho possível.

À CAPES e a FAPEAL, pelo apoio financeiro que tornou este trabalho viável em meio a tantas incertezas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Diogo Ribeiro Câmara, minha profunda gratidão. Sua paciência, escuta e firmeza me ensinaram muito mais do que teoria e método, me ensinaram a acreditar na minha própria trajetória.

A todos os professores que cruzaram o meu caminho, em especial ao Prof. Dr. Abelardo Silva Júnior, por abraçar a nossa ideia e abrir as portas do LAPEVI para a execução do nosso trabalho.

Aos colegas de pesquisa principalmente os do LARAL e LAPEVI, em especial a Emelly Calheiros, que foi meu braço direito no processamento das amostras e nas angústias dos prazos e ao Lucas Matos, por estar comigo no laboratório e nas preocupações com o passo a passo da pesquisa. Nos dias de exaustão, foram vocês que me lembraram que ninguém atravessa uma travessia dessas sozinho.

A toda equipe da Nordeste in Vitro, em nome de Lucas Carvalho e da minha amiga pessoal, Andressa Moreira, por me incentivarem desde a inscrição na seleção do mestrado. Vocês me abriram as portas de uma longa jornada.

Aos que me esperaram com paciência, aos que acreditaram em silêncio, aos que estenderam a mão sem que eu precisasse pedir, meu muito obrigado.

E, por fim, a mim mesma. Por ter seguido mesmo quando tudo parecia pesado demais. Por não ter desistido. Por ter acreditado — nem que fosse um pouquinho — que eu conseguiria.

RESUMO

As biotecnologias reprodutivas bovinas utilizadas no Brasil colocam o país em destaque mundial. Todavia, aspectos sanitários podem ser melhorados, como por exemplo o alto percentual de animais soropositivos para o Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), um vírus capaz de reduzir índices reprodutivos tanto *in vivo* quanto *in vitro*, considerando que touros de alto valor genético podem estar contribuindo para a disseminação do BoHV-1. Neste trabalho, foi feita uma breve revisão a respeito do BoHV-1, sua distribuição no Brasil, e técnicas para remoção de vírus em amostras biológicas. Experimentalmente, foi avaliado o efeito do BoHV-1 sobre o espermatozoide bovino descongelado, bem como a eficácia do gradiente de Percoll (GP) e nanopartículas magnéticas associadas a anticorpos anti- BoHV-1 (MNP) para a redução da carga viral de sêmen experimentalmente infectado. No Experimento I, diferentes concentrações de BoHV-1 (10^4 a 10^8 TCID₅₀/mL) foram incubadas com sêmen descongelado de touros (n = 3) negativos para BoHV-1. Foram observados efeitos do touro e tempo de incubação sobre a cinética espermática ($P < 0,01$) e do tempo de incubação sobre a morfologia e integridade de membrana dos espermatozoides ($P < 0,01$), sem efeito do vírus. No Experimento II, o sêmen descongelado dos mesmos touros foi artificialmente infectado com BoHV-1 (10^4 TCID₅₀/mL), mantido sem tratamento por até uma hora (controle positivo), ou tratado com: 1) GP; 2) incubação das MNPs por 15, 30 e 60 min; 3) Associação de MNP e GP. Utilizou-se como controle negativo amostra de sêmen não infectada. A carga viral em todas as amostras foi determinada por titulação. Quando avaliada a motilidade espermática, enquanto o GP elevou os valores ($P < 0,05$), não houve influência das MNPs após incubação por 60 min, enquanto tanto as MNPs quanto GP reduziram a concentração espermática em aproximadamente 20 e 50%, respectivamente, quando comparado às amostras controle positivo ($P < 0,05$). Observou-se que o uso do GP e MNP, após 60 min de incubação, resultou em titulação negativa das amostras. Conclui-se que o BoHV-1 não exerceu efeito direto sobre a qualidade espermática e que o GP foi eficaz em reduzir a carga viral. Caso a concentração espermática pós-tratamento seja um parâmetro importante, a incubação por 60 min com MNP é uma alternativa para redução viral, sem aparente toxicidade sobre os espermatozoides.

Palavras-chave: Carga viral, reprodução bovina, Rinotraqueíte Infeciosa Bovina, Nanopartículas.

ABSTRACT

Reproductive biotechnologies used in Brazilian cattle farming have positioned the country as a global leader. However, herd health still presents concerning issues, for instance, the high percentage of cattle seropositive for Bovine Herpesvirus Type 1 (BoHV-1), a virus capable of reducing both *in vivo* and *in vitro* reproductive performance, considering that high-genetic-value bulls may be contributing to the spread of BoHV-1. This study provides a brief review of BoHV-1, its distribution in Brazil, and techniques for viral removal from biological samples. Experimentally, the effects of BoHV-1 on thawed bovine sperm and the efficacy of Percoll gradient (PG) and antibody anti-BoHV-1 conjugated with magnetic nanoparticles (MNP) for reducing viral load in experimentally infected semen were assessed. In Experiment I, different viral concentrations of BoHV-1 (10^4 to 10^8 TCID₅₀/mL) were incubated with thawed semen samples from BoHV-1-negative bulls ($n = 3$). Effects of bull and incubation time were observed on sperm kinematics ($P < 0.01$), whereas incubation time affected sperm morphology and membrane integrity ($P < 0.01$), with no viral effect detected. In Experiment II, thawed semen from the same bulls were artificially infected with BoHV-1 (10^4 TCID₅₀/mL) and either left untreated for up to one hour (positive control) or treated with: 1) PG; 2) Samples incubated with MNPs for 15, 30, and 60 min; or 3) a combination of MNP and PG. Uninfected semen served as the negative control. Viral load was determined in all samples by titration. Sperm motility was higher after PG ($P < 0.05$), with no effect of MNP treatment, whereas MNPs and PG reduced sperm concentration by approximately 20% and 50%, respectively ($P < 0.05$), compared to untreated samples. Both PG and MNP, with an incubation of 60 min, resulted in negative titration. In conclusion, BoHV-1 had no direct impairment on sperm quality, and PG eliminated viral titers. Furthermore, if sperm concentration post-treatment is a critical parameter, incubation with MNP during 60 min provides an alternative for viral reduction, without apparent sperm toxicity.

Keywords: Viral load, bovine reproduction, Infectious Bovine Rhinotracheitis, Nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Prevalência de animais sororreagentes para Herpesvírus Bovino tipo 1, obtidos por estudos realizados em diferentes estados brasileiros.	17
Fig 1	Effect of Percoll gradient and incubation with magnetic nanoparticles associated with anti-BoHV-1 antibodies (MNPs) for 60 minutes on motility (A) and sperm concentration (B) in thawed bovine semen samples artificially infected with Bovine Herpesvirus 1 (10^4 TCID ₅₀ /mL).	40
Figura 1	Eletoforese em gel de agarose evidenciando os produtos de PCR amplificados. LD: ladder, S: samples, PC: controle positivo, NC: controle negativo.....	49

LISTA DE TABELAS

Table 1	Titration for Bovine Herpesvirus 1 in thawed bovine semen samples artificially infected (10^4 TCID ₅₀ /mL), treated with Percoll gradient (PG) or magnetic nanoparticles associated with anti-BoHV-1 antibodies (MNPs) for different periods....	41
Tabela 1.	Sequência de oligonucleotídeos utilizados para a detecção de herpesvírus por nested PCR.....	48
Tabela 2.	Avaliação dos efeitos touro, tempo e concentração viral sobre parâmetros cinemáticos de espermatozoides bovinos descongelados, infectados experimentalmente	50
Tabela 3.	Resultados da análise estatística dos efeitos touro, tempo e vírus sobre os parâmetros cinemáticos de espermatozoides bovinos descongelados, infectados experimentalmente	50
Tabela 4.	Titulação após infecção experimental com Herpesvírus bovino tipo-1 (10^4 TCID ₅₀ /mL) em amostras de sêmen bovino descongeladas e não tratadas (CP), tratadas com gradiente de Percoll (GP), tratadas com nanopartículas magnéticas associadas a anticorpos anti-BoHV-1 (MNP), ou tratadas com associação das técnicas (MNP+GP).....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BoHV-1	Herpesvírus Bovino tipo 1
CCPS	Centros de Coleta e Processamento de Sêmen
DNA	Ácido desoxiribonucleico
GP	Gradiente de Percoll
HCV	Vírus da hepatite C
IA	Inseminação Artificial
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBR	Rinotraqueíte infecciosa bovina
IETS	Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões
MNP	Nanopartículas magnéticas associadas a anticorpos anti-BoHV-1
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
SOV	Superovulação
TE	Transferência de embrião
TNRS	Taxa de não retorno ao serviço

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1. Herpesvírus Bovino tipo 1	15
2.2. Biotecnologias reprodutivas e o impacto do Herpesvírus Bovino tipo 1....	18
2.3. Resistência do vírus no sêmen bovino.....	20
2.4. Nanopartículas magnéticas – seu uso na identificação e isolamento de material biológico	20
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	22
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
5. APÊNDICE I	35
6. APÊNDICE II.....	47
7. ANEXO – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO	52

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a última pesquisa divulgada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, em 2023 o rebanho bovino brasileiro apresentava 238,6 milhões de cabeças (IBGE, 2023), gerando emprego e renda para milhares de brasileiros, com a pecuária de corte ocupando grande área do território nacional (MALAFAIA *et al.*, 2019). A Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS) divulgou que em 2023 foram produzidos 2.247.729 embriões bovinos, colocando o Brasil como o segundo maior produtor mundial, responsável por aproximadamente 27% da produção, com 473.872 embriões produzidos tanto *in vitro* quanto *in vivo* (VIANA, 2024).

Pouco mais de 83% dos embriões bovinos produzidos no mundo em 2023 foram obtidos através da técnica de produção *in vitro* (PIVE), um aumento de quase 16% em relação ao ano anterior (VIANA, 2024). Essa biotécnica possibilita aumento da produtividade na bovinocultura através da multiplicação de animais geneticamente melhorados (VIANA *et al.*, 2017), uma vez que a seleção passa a ser mais criteriosa, além de reduzir o intervalo entre partos (VARAGO *et al.*, 2008). A PIVE também pode ser utilizada como ferramenta de reprodução assistida para fêmeas de alto valor genético e que possuam patologias reprodutivas adquiridas (DAYAN, 2001).

Todavia, a contaminação por microrganismos nos materiais biológicos dos animais doadores utilizados na PIVE (oócitos e sêmen) pode ter sua origem a partir de uma infecção sistêmica ou específica do trato reprodutor, ou ainda, ocorrer durante a manipulação desses materiais no laboratório (BIELANSKI, 2007). Além disso, diversas doenças infecciosas do trato reprodutor do touro podem impactar na fertilidade, por efeito direto sobre qualidade seminal, ou liberando o agente no sêmen, infectando as fêmeas e reduzindo sua fertilidade (WRATHALL *et al.*, 2006).

O Herpesvírus Bovino tipo 1 (BoHV-1, *Varicellovirus bovinealpha1*), também conhecido como o vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina ou Vulvovaginite Pustular Infecciosa Bovina (TANGHE *et al.*, 2005), é transmitido por contato direto ou indireto, geralmente pelo trato respiratório ou pela mucosa do trato reprodutivo, sendo causador de diversas alterações reprodutivas em bovinos, como endometrites, absorção embrionária e abortos, além do nascimento de animais com o sistema nervoso central acometido, comprometendo aspectos econômicos e sanitários dos rebanhos (STRAUB, 1990). O portador latente pode sofrer reativação viral, com ou

sem eliminação do vírus, mas uma vez infectado será portador por toda sua vida (ASHBAUGH *et al.*, 1997).

Como citado anteriormente, o Brasil é um dos maiores produtores mundiais de embriões *in vitro*. Sabe-se que o BoHV-1 reduz os resultados da PIVE por diminuir a atividade fertilizante dos espermatozoides e, quando infecta os oócitos, reduz a formação e desenvolvimento embrionário (ALVES *et al.*, 2019). O vírus possui camada superficial pela membrana plasmática dos espermatozoides, podendo aderir à região pós-nuclear, o que contribui para o aumento das anomalias e redução da capacidade de fertilização dos gametas (EL-MOHAMADY *et al.*, 2020). As pesquisas sobre os riscos de transmissão de infecções por gametas e embriões, bem como os possíveis prejuízos causados pela presença de um patógeno durante o procedimento de PIVE, estimularam a criação de protocolos de controle e da certificação sanitária dos produtos utilizados (WALDROP *et al.*, 2004). Dessa forma, é importante utilizar ferramentas que sejam capazes de reduzir ou eliminar a carga viral em amostras de sêmen.

O gradiente de Percoll é uma técnica de separação celular baseada na centrifugação em meios de diferentes densidades, amplamente utilizada na seleção de espermatozoides para a PIVE bovinos. Sua principal importância reside na capacidade de isolar subpopulações de espermatozoides com maior motilidade, integridade de membrana e potencial fertilizante. Além disso, a técnica pode ser ajustada em termos de volume, força e tempo de centrifugação, sem comprometer a qualidade espermática ou o desenvolvimento embrionário (MISSIO *et al.*, 2018).

Uma vez que esse vírus também causa impacto negativo sobre a PIVE na espécie bovina, o desenvolvimento de estratégias que permitam minimizar ou eliminar o efeito negativo desse vírus sobre a biotecnologia da PIVE seria capaz de elevar os índices de produção de embriões. Até o momento, não foi possível identificar nenhum estudo que testou diferentes estratégias para remoção de BoHV-1 em amostras de sêmen bovino, mas isso já foi feito para outros vírus em sêmen de outras espécies (BIELANSKI, 2007).

O uso de nanopartículas magnéticas associadas a anticorpos representa uma abordagem inovadora para a remoção eficiente de partículas virais em diferentes contextos biomédicos e ambientais, conferindo alta especificidade para a captura do vírus-alvo (DELAVIZ *et al.*, 2015).

Caso seja demonstrada a eficácia da técnica, a estratégia tem o potencial de ser utilizada para o controle de taxas de infecção causadas por outros vírus, em amostras de sêmen, ou mesmo outras espécies que também utilizam a PIVE como estratégia reprodutiva, como a humana, onde a contaminação viral em amostras de sêmen tem sido um problema observado em laboratórios de reprodução assistida (MICHOU *et al.*, 2012). Além disso, pode permitir o uso do sêmen de reprodutores de alto valor genético com a infecção viral, eliminando o risco de transmissão do vírus para as vacas inseminadas ou embriões produzidos, melhorando índices produtivos na bovinocultura nacional.

Dessa forma, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito do BoHV-1 sobre a qualidade espermática em sêmen bovinos descongelados e a eficácia do gradiente de percoll e o uso de nanopartículas magnéticas para a remoção do BoHV-1 de amostras de sêmen artificialmente infectadas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Herpesvírus Bovino tipo 1

O Herpesvírus Bovino tipo 1 (BoHV-1, *Varicellovirus bovinealpha1*) é um membro da família *Orthoherpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*, cujas principais características são a presença de um cerne contendo DNA linear de fita dupla e um capsídeo icosadeltahédrico (FRANCO, 2012). Os membros dessa subfamília apresentam uma ordem constante na forma de sua organização gênica, ocorrendo pouca alteração na forma de aparecimento da maioria dos genes quando comparados aos diferentes tipos de herpesvírus, além de possuírem ciclo replicativo rápido, causando grande taxa de destruição celular nos tecidos infectados (ENGELS e ACKERMANN, 1996).

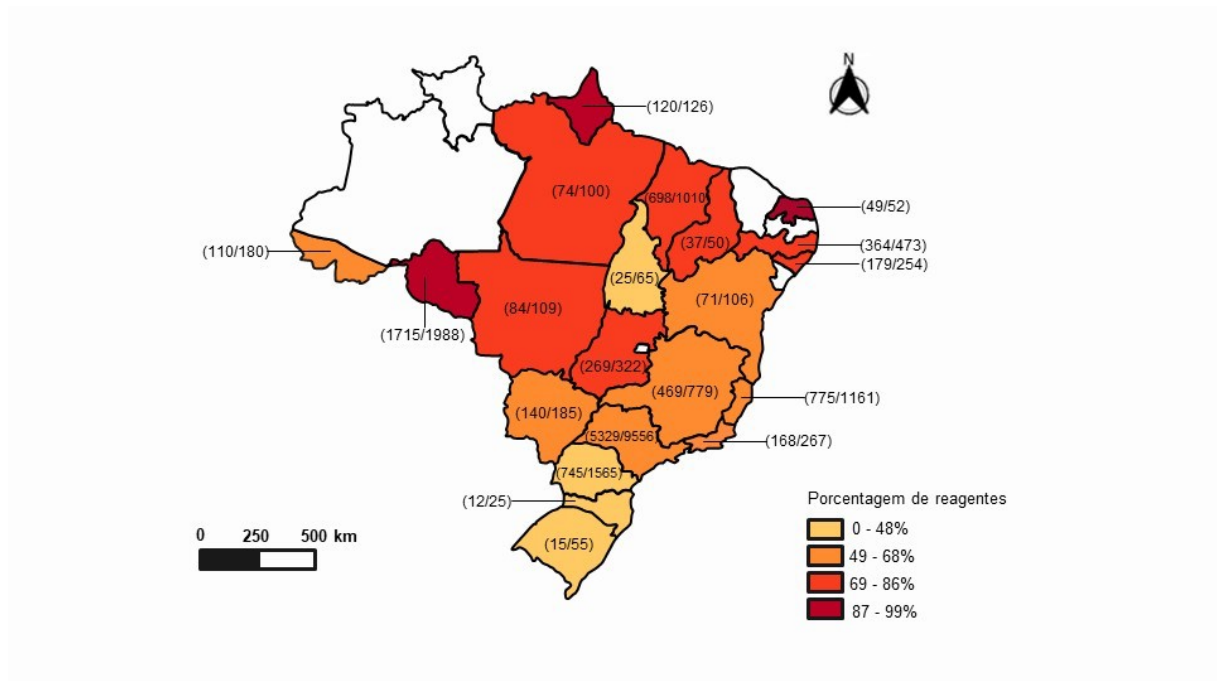
O BoHV-1 apresenta as glicoproteínas gB, gD, gH e gL, sendo gB e gD as principais proteínas responsáveis pela replicação viral e pela interação com as células. A penetração do vírus na célula hospedeira ocorre por uma fusão única do envelope viral com a membrana plasmática, seguida do movimento para dentro do citoplasma, através da formação de poros e invaginação da membrana plasmática (SCHWYZER e ACKERMANN, 1996).

A infecção por BoHV-1 causa prejuízos sanitários e econômicos no rebanho bovino, sendo a sua manifestação respiratória comumente denominada Rinotraqueite Infecciosa Bovina (IBR), enquanto a apresentação de sua forma genital é denominada Vulvovaginite/Balanopostite Pustular Infecciosa Bovina (LOY *et al.*, 2013). A via de transmissão mais importante é a via direta horizontal, que ocorre por meio do contato direto entre os animais através da cópula, sendo também possível a transmissão por aerossóis e fômites, além da inseminação artificial, causa importante de ingresso do agente em rebanhos que nunca tiveram contato com o vírus (BROWLIE, 1990). Caso o contato da fêmea com o vírus ocorra durante o período gestacional, o embrião e o feto são infectados por via vertical/transplacentária (LEMAIRE *et al.*, 1994).

O BoHV-1 está disseminado por todas as regiões do Brasil (Figura 1), atingindo elevados índices de infecção nos rebanhos (BEZERRA *et al.*, 2012b), sendo um vírus capaz de induzir latência sem produção de progênie viral (ENGELS e ACKERMANN, 1996). A latência, nesse contexto, representa um estado em que não há replicação viral ativa nem manifestação de sinais clínicos, impedindo a excreção do vírus pelos animais infectados. Esse período de inatividade viral é estabelecido pela supressão da expressão dos genes alfa. Uma vez que os produtos desses genes são cruciais para as fases subsequentes de expressão gênica e replicação do genoma viral, sua inibição resulta na interrupção do ciclo viral (COLODEL *et al.*, 2002).

Durante a infecção latente, exames nos animais não revelam evidências da infecção, exceto pela detecção de anticorpos, que são uma resposta à infecção aguda anterior. No animal portador do vírus em latência, pode ocorrer a reativação viral em consequência de estresse significativo do animal, eliminando partículas virais, muitas vezes sem apresentar sinais clínicos (COLODEL *et al.*, 2002).

Figura 1. Prevalência de animais sororreagentes para Herpesvírus Bovino tipo 1, obtidos por estudos realizados em diferentes estados brasileiros.



Fonte: MÉDICI e ALFIERI, 2000; DIAS *et al.*, 2008; HOLZ, 2009; LIMA *et al.*, 2011; BEZERRA *et al.*, 2012a; SANTOS *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2015; NOGUEIRA, 2018; DE ARRUDA *et al.*, 2019; MENDES *et al.*, 2025. Estados em branco: não foi localizado artigo com soroprevalência

O BoHV-1 pode interferir nos índices reprodutivos dos plantéis infectados (TAKIUCHI *et al.*, 2005). A infecção pelo BoHV-1 pode comprometer tanto o desenvolvimento do embrião como do feto, embora seja observado abortamento mais frequentemente no segundo e terceiro trimestres de gestação (KIRKBRIDE, 1985). Todos os bovídeos saudáveis atuam como hospedeiros suscetíveis nesta cadeia epidemiológica (FRANCO e ROEHE, 2007).

As manifestações clínicas da infecção pelo BoHV-1 podem ser controladas e prevenidas através dos programas de vacinação. No Brasil esses programas requerem uma análise de custo-benefício que deve considerar a prevalência, manifestação clínica da doença, o grau de melhoramento genético dos animais, despesas com exames laboratoriais (sorodiagnóstico e identificação viral), vacinação e descarte de animais infectados (VAN OIRSCHT, 1999).

2.2. Biotecnologias reprodutivas e o impacto do Herpesvírus Bovino tipo 1

Sendo o agronegócio um setor importante na economia do Brasil, sua expansão deu espaço para a participação de investimentos vindo tanto de empresas nacionais quanto multinacionais (MEDINA, 2021). Em números, a pecuária brasileira alcançou a marca de 2,29 milhões de toneladas de carne exportadas em 2023, 1,31% acima do montante descrito no ano anterior, demonstrando a solidez da atividade mesmo em tempos de instabilidade econômica (ABIEC, 2024).

Com a expansão do mercado, várias biotecnologias foram desenvolvidas e aprimoradas, principalmente na espécie bovina. Inicialmente, a inseminação artificial (IA) teve um importante papel na disseminação do material genético do macho e, posteriormente, técnicas como o controle do ciclo estral, superovulação (SOV) e transferência de embriões (TE) proporcionaram um aumento na possibilidade da multiplicação do material genético da fêmea (DAYAN, 2001). Este é o cenário que confirma o uso das diferentes biotécnicas da reprodução e o seu crescimento permanente. Além disso, o Brasil é detentor de um bom nível técnico-científico nesta área, destacando-se como um dos maiores produtores de embriões *in vitro* bovino, não só pelo domínio da técnica, mas pela qualidade do seu rebanho (DA SILVA *et al.*, 2015).

Sabe-se que a replicação do BoHV-1 acontece principalmente na mucosa prepucial e uretral, contaminando o sêmen durante a ejaculação, quando o líquido seminal entra em contato com as mucosas infectadas. Foi comprovado que mais de 90% do DNA do BoHV-1 está no fluido seminal, praticamente não havendo detecção do vírus junto aos espermatozoides (VAN ENGELBURG *et al.*, 1993). Durante os últimos anos, foi demonstrado que o BoHV-1 pode estar presente no material utilizado no sistema de produção *in vitro* (VANROOSE *et al.*, 1999), no fluido folicular, associado às células epiteliais de oviduto, nos oócitos (BIELANSKI *et al.*, 1993) e nos espermatozoides de touros infectados (ROCHA *et al.*, 1998). Uma vez que este vírus pode estar presente em animais aparentemente saudáveis, devido a capacidade de latência, o risco de transmissão do BoHV-1 através da produção *in vitro* de embriões deve ser considerado (FENNER, 1993).

Devido às informações supracitadas, o Código Sanitário para os Animais Terrestres da Organização Mundial de Saúde Animal – OIE, afirma que os reprodutores bovinos devem ser testados a fim de ingressarem e se manterem em

centros de coleta e processamento de sêmen (OIE, 2024a). Dentre os testes recomendados pela OIE para a detecção do BoHV-1 no sêmen, de forma a garantir a segurança do sêmen destinado à inseminação artificial e as demais biotécnicas da reprodução, estão o isolamento viral e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (OIE, 2024b). A segurança sanitária no comércio de sêmen bovino é crucial para impulsionar as exportações e importações. Ao garantir essa segurança, minimiza-se os riscos de surtos de doenças e a introdução de novas enfermidades em rebanhos controlados, protegendo assim a saúde animal e a economia do setor (EAGLESOME e GARCIA, 1997).

Todavia, os Centros de Coleta e Processamento de Sêmen – CCPS que seguem as determinações nacionais oficiais podem estar disseminando esse agente para os rebanhos brasileiros através da comercialização nacional de sêmen bovino, levando em consideração que as regulamentações vigentes no Brasil não determinam exigências sanitárias em relação ao BoHV-1 para o processamento e comercialização do sêmen no país (BRASIL, 2003). Já o sêmen utilizado na produção de embriões para o comércio internacional provém, na maioria das vezes, de lotes processados em centrais de inseminação internacionalmente credenciadas. Esses touros são rigorosamente testados e contam com certificados negativos para enfermidades agudas e epidêmicas (como febre aftosa), além de doenças crônicas como brucelose, tuberculose, leptospirose, herpesvirose, campilobacteriose e tricomonose (WRATHALL *et al.*, 2006).

Os estudos demonstram que os impactos do BoHV-1 sobre as taxas de fertilidade são variáveis. WHITE e SNOWDON (1973) avaliaram 149 vacas provenientes de 20 rebanhos distintos, quando investigaram o impacto da contaminação sêmen pelo BoHV-1 e a taxa de não retorno ao serviço (TNRS). Os resultados revelaram uma TNRS significativamente menor em animais inseminados com sêmen contaminado por BoHV-1 (13,4%) em comparação com o grupo controle, que utilizou sêmen não contaminado (60,8%). Adicionalmente, entre as fêmeas que retornaram ao serviço, 22,1% apresentaram encurtamento do ciclo estral, tendo duração inferior a 18 dias. De um grupo de 11 animais, ELAZHARY *et al.* (1980) isolaram o BoHV-1 do conteúdo uterino de oito vacas, caracterizadas por apresentarem baixa taxa de prenhez e elevada taxa de serviço, levando em consideração que o touro empregado no programa de reprodução do plantel excretava o vírus no sêmen.

Já o estudo realizado por KUPFERSCHIMIED *et al.* (1986) verificou a contaminação de vacas inseminadas com sêmen importado, contaminado pelo BoHV-1, proveniente de touro soronegativo. Essas vacas demonstraram taxas de não retorno ao cio 10% abaixo da média do rebanho, além de soroconversão. OLIVEIRA *et al.* (2011) analisaram 23 amostras de sêmen congelado de uma central de inseminação artificial brasileira, sendo cinco (21,7%) positivas para BoHV-1.

Para avaliarem os impactos do BoHV-1 na PIVE, AGUIAR *et al.* (2014) realizaram uma pesquisa onde 1329 embriões foram transferidos, sendo 161 oriundos de doadoras positivas e 1168 oriundos de doadoras negativas para BoHV-1. As receptoras que receberam embriões das vacas positivas obtiveram uma taxa de prenhez de 39,13% (63/161), já as que receberam embriões de doadoras negativas, apresentaram a taxa de 44,95% (525/1168).

2.3. Resistência do vírus no sêmen bovino

O BoHV-1 é o vírus mais frequentemente encontrado no sêmen bovino (AFSHAR e EAGLESOME, 1990) e, infelizmente, o processamento das amostras de sêmen utilizando refrigeração e congelação não é capaz de reduzir a titulação ou mesmo a virulência do BoHV-1. A infectividade do BoHV-1 no sêmen pode permanecer conservada por até sete dias em temperatura de 4 °C e por cinco dias em temperatura ambiente (DREW *et al.*, 1987). Chapman *et al.* (1979) demonstraram, por meio de isolamento em cultivo celular e quantificação, que não há perda significativa no título de BoHV-1 em sêmen bovino armazenado em nitrogênio líquido por mais de um ano. Corroborando essa persistência, Spradbrow (1968), ao examinar o sêmen de 40 touros, isolou o BoHV-1 em três ampolas distintas de uma mesma coleta, descongeladas em momentos diferentes, utilizando cultivo celular de rim bovino. Notavelmente, após 12 meses de armazenamento, o vírus permaneceu detectável em uma das amostras, a uma concentração de $10^{4.3}$ TCID₅₀/ml.

2.4. Nanopartículas magnéticas – seu uso na identificação e isolamento de material biológico

A nanotecnologia favorece o desenvolvimento de materiais em nanoescala com tamanho, forma e área de superfície definidos, compatíveis aos de entidades

biológicas, como células, vírus, moléculas, proteínas e até mesmo genes, as tornando adequadas às aplicações biomédicas (SAVUNTHARI *et al.*, 2021). Devido a isso, esses nanomateriais estão se tornando comuns em pesquisas biomédicas como adjuvantes de novas terapias para a administração eficaz de medicamentos, reconhecimento de patógenos e/ou sensores biomoleculares (ROUT *et al.*, 2018). Além disso, as nanopartículas estão atraindo interesse de diferentes campos, como a química de materiais, tecnologia da informação, agricultura, eletrônica, meio ambiente, energia e sensores (AROKIYARAJ *et al.*, 2015; SURENDRA *et al.*, 2016).

As ferramentas da nanotecnologia permitem acelerar o desenvolvimento tecnológico, reduzir custos e tempo de produção, impactos econômicos e ambientais, como, por exemplo, na remoção de contaminantes de águas residuais como metais tóxicos, orgânicos e microrganismos (DESHPANDE *et al.*, 2020). Cerca de 70% dos diagnósticos médicos são embasados em resultados de exames laboratoriais, cujas despesas chegam até 25% dos custos com diagnósticos no país (SUMITA e SHCOLNIK, 2017).

Além disso, a nanotecnologia é promissora para a terapêutica veterinária. Sabe-se que a terapia mediada por nanocarreadores de mistura é eficaz no tratamento de doenças que afetam animais que produzem alimentos para consumo humano (KLIER *et al.*, 2012). Uma vez que a resistência bacteriana aos antibióticos convencionais representa uma grave ameaça à saúde global, as nanopartículas emergem como uma alternativa promissora, oferecendo novas abordagens para combater infecções, especialmente aquelas mediadas por biofilmes, com menor probabilidade de induzir resistência ao longo do tempo. A eficácia das nanopartículas reside em seus diversos mecanismos de ação, que dificultam a adaptação bacteriana e o desenvolvimento de inúmeros sistemas baseados em nanopartículas, visando aprimorar a eficácia antimicrobiana (GUPTA *et al.*, 2016).

Com a aplicação de um revestimento superficial, as nanopartículas magnéticas podem ser eficientemente dispersas em solventes compatíveis, resultando na formação de suspensões transparentes como fluidos magnéticos. Essa característica possibilita uma gama diversificada de aplicações biomédicas. Elas podem ser empregadas como agentes de contraste em ressonância magnética (FERGUSON *et al.*, 2009; SCHLORF *et al.*, 2010), atuar como carreadores de medicamentos guiados por campo magnético (YUAN *et al.*, 2010), como também são utilizadas em diagnósticos e na separação biomolecular magnética (FERGUSON *et al.*, 2009).

No campo da produção de vacinas veterinárias, o uso de nanopartículas é capaz de elevar a resposta imunológica, fazendo com que os antígenos sejam liberados lentamente e consequentemente aumentando o desempenho vacinal (KIM *et al.*, 2010). Além disso, as nanopartículas têm um grande impacto na proteção e sustentação da liberação de hormônios da reprodução, como hormônios esteroides e hormônios gonadotrópicos, bem como no diagnóstico e tratamento de problemas reprodutivos (JOANITTI e SILVA, 2014).

Uma das vantagens significativas das nanopartículas magnéticas sobre outras nanopartículas é sua maior resistência a condições corrosivas, ácidas e oxidantes, juntamente com uma melhor biocompatibilidade (MARKIDES *et al.*, 2012). Além disso, as nanopartículas magnéticas destacam-se como uma ferramenta ideal para a remoção de partículas virais de sistemas biológicos, principalmente devido às suas propriedades magnéticas intrínsecas, característica ausente em nanopartículas metálicas não magnéticas. Essa particularidade permite que as nanopartículas magnéticas, juntamente com as partículas virais a elas ligadas, sejam facilmente separadas da solução por meio da aplicação de um campo externo magnético.

Um estudo realizado por Delaviz *et al.* (2015) avaliou a aplicação de nanopartículas magnéticas revestidas de amido para a remoção de partículas do vírus da hepatite C (HCV) de amostras de plasma humano. Através da metodologia adotada, foi observada uma redução significativa da carga viral alcançando uma eficiência de captura de até 91%.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É possível perceber que a infecção por BoHV-1 está amplamente disseminada no Brasil, caracterizado como o país que possui o maior rebanho e é o maior exportador de carne bovina do mundo. Todavia, quando comparado a outros países da Europa e América do Norte, as regulamentações no país não elencam estratégias para o controle desta infecção. Além disso, o real impacto econômico do BoHV-1 no sistema produtivo, seja ele tradicional ou com o emprego de biotecnologias reprodutivas, é desconhecido.

Mesmo tendo sido demonstrado o risco de que o BoHV-1 seja transmitido através de amostras de sêmen comercializadas pelas centrais de produção de sêmen nacionais, e que, nos últimos anos, novas estratégias para o controle de transmissão

de vírus através do sêmen tenham sido desenvolvidas, ainda não são empregadas nas rotinas das centrais. Dessa forma, este trabalho pode contribuir para o controle da disseminação do BoHV-1 de animais de alto valor genético, mas portadores da infecção.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC, **Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne**. Perfil da pecuária no Brasil – Relatório anual 2024. Disponível em: <<https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2024-perfil-da-pecuaria-no-brasil.pdf>>. Acesso em: 22 Ago 2024.

AFSHAR A, EAGLESOME MD. Viruses associated with bovine semen. **Veterinary Bulletin**, v. 60, n. 2, p. 93-109, 1990.

AGUIAR TS. **Relação de doadoras infectadas pelo herpesvírus bovino tipo 1 e vírus da diarreia viral bovina com a produção in vitro e in vivo de embriões**. 2014. 70p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2014.

AROKIYARAJ S, KUMAR VD, ELAKYA V, KAMALA T, PARK SK, RAGAM M, SARAVANAN M, BOUOUDINA M, ARASU MV, KOVENDAN K, VINCENT S. Biosynthesized silver nanoparticles using floral extract of *Chrysanthemum indicum* L.—potential for malaria vector control. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 13, p. 9759–9765, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4148-9>

ALVES SVP, COSTA EP, QUEIROZ-CASTRO VLD, MACHADO-NEVES M, GUIMARÃES JD, GOMES LL, AZEVEDO JUNIOR MA, SILVA JUNIOR A. Bovine herpesvirus 1 can impact the bovine oocyte development during in vitro maturation. **Research in Veterinary Science**, v. 123, p. 135-140, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.12.020>

ASHBAUGH SE, THOMPSON KE, BELKNAP EB, SCHUTEISS PC, CHOWDURY S, COLLINS JK. Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic**

Investigation, v. 9, n. 4, p. 387-394, 1997.

<https://doi.org/10.1177/104063879700900408>

BEZERRA DC, CHAVES NP, SOUSA VE, SANTOS HP, PEREIRA HM. Fatores de risco associados à infecção pelo Herpesvírus Bovino Tipo 1 em rebanhos bovinos leiteiros da região Amazônica maranhense. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 1, p. 107-111, 2012a. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/aib/a/FqBBFSgjLzCyymJrvqv6qzQ/?lang=pt>

BEZERRA DC, CHAVES NP, SOUSA VA, SANTOS HP, PERREIRA HM. Prevalência e fatores de risco associados à infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 em rebanhos bovinos leiteiros no estado do Maranhão. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 19, n. 3, p. 158–162, 2012b. <http://dx.doi.org/10.4322/rbcv.2014.099>

BIELANSKI A, LOEWEN KS, DEL CAMPO MR, SIRARD MA, WILLADSEN S. Isolation of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and bovine diarrhea virus (DVDV) in association with the in vitro production of bovine embryos. **Theriogenology**, v.40, p. 531-538, 1993. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(93\)90406-u](https://doi.org/10.1016/0093-691x(93)90406-u)

BIELANSKI A. Disinfection procedures for controlling microorganisms in the semen and embryos of humans and farm animals. **Theriogenology**, v.68, n.1, p.1-22, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.03.025>

LIMA MS, NOGUEIRA AHC, OKUDA LH, DE STEFANO E, PITUCO EM. Pesquisa de anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo I no Brasil. **Biológico**, v. 73, n. 2, p. 214-218, 2011. Disponível em:

https://biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/docs/bio/v73_2/p214-218.pdf

BRASIL, 2003. Instrução Normativa 48/2003. Secretaria de Defesa Agropecuária. Requisitos sanitários mínimos para a produção e comercialização de sêmen bovino e bubalino no Brasil. Diário Oficial da União, n. 117, Seção 1, p. 6-7, 20 de junho de 2003. Disponível em:

<https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=6&data=20/06/2003>

BROWLIE J. The pathogenesis of bovine viral diarrhea virus infections. **Revue Scientifique Technique, Organización Internacional des Epizoties**, Paris, v. 9, n.1, p. 43-59, 1990. <https://doi.org/10.20506/rst.9.1.491>

CHAPMAN MS, LUCAS MH, HEBERT CN, GOODEY RG. Survival of infectious bovine rhinotracheitis virus in stored bovine semen. **Veterinary Sciences Communications**, v. 3, n. 2, p. 137-139, 1979. <https://doi.org/10.1007/BF02268959>

COLODEL EM, NAKAZATO L, WEIBLEN R, MELLO RM, PINHEIRO DA SILVA RR, SOUZA MA, OLIVEIRA FILHO JA, CARON L. Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por herpesvírus bovino no estado de mato grosso, Brasil. **Ciência Rural**, v. 32, n. 2, p. 293-298, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782002000200018>

DA SILVA JS, BORGES LS, MARTINS LELL, LIMA LA, BARBOSA YGS, SILVA NA, PAIVA BRITO TK. Aspectos comerciais da transferência de embriões e fertilização in vitro em bovinos–revisão. **Nutritime Revista Eletrônica**. Vol. 12, n. 5, 2015 ISSN: 1983-9006. 2015.

DAYAN A. **Fatores que interferem na produção de embriões bovinos mediante aspiração folicular e fecundação *in vitro***. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2001.

DE ARRUDA EF, SILVA TIB, ARAGÃO BB, CASTRO RS, GOMES YA. Soroprevalence of bovine alphaherpesvirus type 1 (BoHV-1) and risk factors associated with dairy properties of the municipality of Senador Guimard, Acre, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 86, e1362018, 2019. <https://doi.org/10.1590/1808-1657001362018>

DELAVIZ N, GILL P, AJAMI A, AARABI M. Aptamer-conjugated magnetic nanoparticles for the efficient removal of HCV particles from human plasma samples.

RSC **Advances**, v. 5, n. 97, p. 79433–79439, 2015.

<https://doi.org/10.1039/C5RA12209K>

DESHPANDE BD, AGRAWAL PS, YENKIE MKN, DHOBLE SJ. Prospective of nanotechnology in degradation of waste water: A new challenges. **Nano-Structures & Nano-Objects**, v. 22, p. 100442, abr. 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2020.100442>

DIAS JA, ALFIERI AA, MÉDICI KC, FREITAS JC, NETO JFS, MÜLLER EE. Fatores de risco associados à infecção pelo herpesvírus bovino 1 em rebanhos bovinos da região Oeste do Estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p. 161–168, mar. 2008. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/pvb/a/7b4XSRK5PDMZVPYs5qb7spP/?lang=pt>

DREW TW, HEWITT-TAYLOR C, WATSON L, EDWARDS S. Effect of storage conditions and culture technique on the isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from bovine semen. **Veterinary Record**, v. 121, n. 23, p. 547-548, 1987. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2832997/>

EAGLESOME MD, GARCIA MM. Disease risks to animal health from artificial insemination with bovine semen. **Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 16, n. 1, p. 215–225, 1 abr. 1997.

ELAZHARY MASY, LAMOTHE P, SILIM A, ROY RS. Bovine Herpesvirus type 1 in the sperm of a bull from a herd with fertility problems. **Canadian Veterinary Journal**, v. 21, n. 12, p. 336-339, 1980. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1789830/>

EL-MOHAMADY, BEHOUR R, RAWASH T,. Concurrent detection of bovine viral diarrhoea virus and bovine herpesvirus-1 in bulls' semen and their effect on semen quality. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 8, 106 – 114, 2020. <https://doi.org/10.1080/23144599.2020.1850197>.

ENGELS M, ACKERMANN M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Veterinary Microbiology**, v.53, n.1-2, p.3- 15, 1996. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(96\)01230-8](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(96)01230-8)

FENNER FJ, GIBBS EPL, MURPHY FA, ROTT R, STUDDERT ML, WHITE DO. Diseases caused by alphaherpesvíruses. *In: Veterinary Virology*, Edition 2. Academic Press, San Diego. 1993, 345-348.

FERGUSON RM, MINARD KR, KRISHNAN KM. Optimization of nanoparticle core size for magnetic particle imaging. **Journal of magnetism and magnetic materials**, v. 321, n. 10, p. 1548–1551, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2009.02.083>

FRANCO AC, ROEHE PM. Herpesviridae. *In: FLORES, EDUARDO FURTADO (Org.). Virologia Veterinária*. 1. ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 2007, p. 435-447.

FRANCO AC. **Virologia veterinária: Herpesviridae**. Santa Maria: UFMS, 2012. p.433-477.

GUPTA A, LANDIS RF, ROTELLO VM. Nanoparticle-Based Antimicrobials: Surface Functionality is Critical. **F1000Research**, v. 5, p. 364, 2016. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7595.1>

HOLZ CL, CIBULSKI SP, TEIXEIRA TF, BATISTA HBCR, CAMPOS FS, SILVA JR, VARELA APM, CENCI A, FRANCO AC, ROEHE PM. Soroprevalência de herpesvírus bovinos tipos 1 e/ou 5 no Estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 767–773, 1 set. 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2009000900014>

IBGE – **INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA**. Pesquisa Pecuária Municipal, 2023. Rio de Janeiro: IBGE, 2023.

JOANITTI G, SILVA L. The emerging potential of by-products as platforms for drug delivery systems. **Current Drug Targets**, v. 15, n. 5, p. 478–485, 2014. <https://doi.org/10.2174/13894501113149990171>

KIM BYS, RUTKA JT, CHAN WCW. Nanomedicine. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 25, p. 2434–2443, 2010. <https://doi.org/10.1056/nejmra0912273>

KIRKBRIDE CA. Managing an outbreak of livestock abortion - 2: diagnosis and control of bovine abortion. **Veterinary Medicine**, v.80, n.5, p.70-79, 1985.

KLIER J, FUCHS S, MAY A, SCHILLINGER U, PLANK C, WINTER G, COESTER C, GEHLEN H. A nebulized gelatin nanoparticle-based CpG formulation is effective in immunotherapy of allergic horses. **Pharmaceutical Research**, v. 29, n. 6, p. 1650–1657, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0686-8>

KUPFERSCHIMIED HU, KIHM U, BACHMAN P, MÜLLER KH, ACKERMANN M. Transmission of IBR/IPV virus in bovine semen: a case report. **Theriogenology**, v. 25, n. 3, p. 439-443, 1986. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(86\)90052-x](https://doi.org/10.1016/0093-691x(86)90052-x)

LEMAIRE M, PASTORET PP, THIRY E. Le contrôle de l'infection pas le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. **Annales de Médecine Vétérinaire**, v.138, n.3, p.167-180, 1994.

LOY JD, GANDER J, MOGLER M, VANDER VEEN R, RIDPATH J, HARRIS DH, KAMRUD K. Development and evaluation of a replicon particle vaccine expressing the E2 glycoprotein of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in cattle. **Virology Journal**, v. 10, n. 35, 2013. <https://doi.org/10.1186/1743-422x-10-35>

MALAFIA GC, AZEVEDO DB, PEREIRA MA, MATIAS MJA. A Sustentabilidade na Cadeia Produtiva da Pecuária de Corte Brasileira. In: BUNGENSTAB, D. J., ALMEIDA, R. G., LAURA, V. A., BALBINO, L. C., FERREIRA, A. D. (Ed.). **ILPF: inovação com integração de lavoura, pecuária e floresta**. Brasília, DF: Embrapa, 2019. p. 117-130. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1112915/a-sustentabilidade-na-cadeia-produtiva-da-pecuaria-de-corte-brasileira>

MARKIDES H, ROTHERHAM M, EL HAJ AJ. Biocompatibility and toxicity of magnetic nanoparticles in regenerative medicine. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, p. 1–11, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/614094>

MÉDICI KC, ALFIERI AA. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1, decorrente de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 347–350, 2000. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782000000200025>

MEDINA GS. Economia do agronegócio no Brasil: participação brasileira na cadeia produtiva da soja entre 2015 e 2020. **Novos Cadernos NAEA**, v. 24, n. 1, p. 231-254, 2021. Disponível em: <https://periodicos.ufpa.br/index.php/ncn/article/view/8521>

MENDES MB, BITTAR JFF, PEREIRA WAB, ARDUINO GGC, BITTAR ER, PANETTO JCC, SANTOS JP. Determinação da prevalência das principais doenças da reprodução no rebanho bovino da região de Uberaba-MG. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, p. 772–777, 2025. <https://doi.org/10.5216/cab.v1i0.7900>

MICHOU V, LIARMAKOPOULOU S, THOMAS D, TSIMARATOU K, MAKAROUNIS K, CONSTANTOULAKIS P, ANGELOPOULOU R, TSILIVAKOS V. Herpes virus infected spermatozoa following density gradient centrifugation for IVF purposes. **Andrologia**, v. 44, n. 3, p. 174-180, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2010.01121.x>

MISSIO, D. et al. Reduction in Percoll volume increases recovery rate of sex-sorted semen of bulls without affecting sperm quality and early embryonic development. **Animal Reproduction Science**, v. 192, p. 146–153, 4 mar. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.002>

OIE. **Terrestrial Animal Health Code**. 2024a. Disponível em: https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-code-online-access/?id=169&L=1&htmlfile=chapitre_coll_semen.htm.

OIE. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 2024b.

Disponível

em:

https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/A_summry.htm

OLIVEIRA MT, CAMPOS FS, DIAS MM, VELHO FA, FRENEAU GE, BRITO, WMED, RIJSEWIJK FAM, FRANCO AC, ROEHE PM. Detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in semen from Brazilian bulls. **Theriogenology**, v. 75, n. 6, p. 1139-1145, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.025>

ROCHA MA, BARBOSA EF, GUIMARÃES SE, DIAS NETO E, GOUVEIA AM. A high sensitivity nested PCR assay for BHV-1 detection in semen of naturally infected bulls. **Veterinary Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 1-11, 1998. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(98\)00213-2](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(98)00213-2)

ROUT GK, SHIN HS, GOUDA S, SAHOO S, DAS G, FRACETO LF, PRATA JK. Current advances in nanocarriers for biomedical research and their applications. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 46, sup. 2, p. 1053–1062, 2018. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1478843>

SANTOS MR, FERREIRA HCC, SANTOS MA, SARAIVA GL, TAFURI NF, SANTOS GM, TOBIAS FL, MOREIRA MAS, ALMEIDA MR, SILVA JUNIOR A. Antibodies against Bovine herpesvirus 1 in dairy herds in the state of Espírito Santo, Brasil. **Revista CERES**, v. 61, n. 2, p. 280–283, 2014. <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2014000200017>

SAVUNTHARI KV, ARUNAGIRI D, SHANMUGAN S, GANESAN S, ARASU MV, ALDHABI NA, CHI NTL, PONNUSAMY VK. Green synthesis of lignin nanorods/g-C₃N₄ nanocomposite materials for efficient photocatalytic degradation of triclosan in environmental water. **Chemosphere**, v. 272, p. 129801, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129801>

SCHLORF T, MEINCKE M, KOSSEL E, GLÜER CC, JANSEN O, MENTLEIN R. Biological Properties of Iron Oxide Nanoparticles for Cellular and Molecular Magnetic

Resonance Imaging. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 1, p. 12–23, 2010. <https://doi.org/10.3390/ijms12010012>

SCHWYZER M, ACKERMANN M. Molecular virology of ruminant herpesvirus. **Veterinary Microbiology**, v.53, n. 1-2, p.17-29, 1996. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(96\)01231-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(96)01231-X)

SILVA S, OLIVEIRA JMB, BATISTA FILHO AFB, RIBEIRO CP, PITUCO EM, PINHEIRO-JUNIOR JW. Seroepidemiological Survey of Infection Bovine Herpesvirus Type 1 (BoHV-1) in Cattle in the State of Pernambuco. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 43, e1324, 2015. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/actavet/43/PUB%201324.pdf>

SOUZA WJ, NASCENTE EP, SANTOS FC, MALAQUIAS JV, SERENO JRB, VIANA EF, SILCA CG, MARTINS CF. Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1): método de diagnóstico e sua influência na qualidade espermática em touros infectados experimentalmente. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 4, p. 1163–1171, 2018. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10229>

SPRADBROW WA. The isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from bovine semen. **Australian Veterinary Journal**, v. 44, n. 9, p. 410-412, 1968. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1968.tb09134.x>

STRAUB OC. Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus. In: STRAUB, O.C. **Virus Infections of Ruminants**. Nova Iorque: Elsevier, 1990, p. 71-99.

SUMITA N M, SHCOLNIK W. **Excessos de exames: desperdícios na saúde? Rio de Janeiro (RJ): Associação de Gastroenterologia do Rio de Janeiro, 2017**. Disponível em: <https://socgastro.org.br/novo/2017/03/excessos-de-exames-desperdicios-na-saude/>.

SURENDRA TV, ROOPAN SM, ARASU MV, AL-DHABI NA, RAYALU GM. RSM optimized Moringa oleifera peel extract for green synthesis of M. oleifera capped palladium nanoparticles with antibacterial and hemolytic property. **Journal of**

Photochemistry and Photobiology B: Biology, v. 162, p. 550–557, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.07.032>

TAKIUCHI E, MÉDICI KC, ALFIERI AF, ALFIERI AA. Bovine herpesvirus type 1 abortions detected by a semi-nested PCR in Brazilian cattle herds. **Research in Veterinary Science**, v.79, n.1, p. 85-88, 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2004.11.005>

TANGHE S, VANROOSE G, VAN SOOM A, DUCHATEAU L, YSEBAERT MT, KERKHOLFS P, THIRY E, VEN DER HURK SDL, VAN OOSTVELDT P, NAUWYHCK H. Inhibition of bovine sperm–zona binding by bovine herpesvirus-1. **Reproduction**, v. 130, n. 2, p. 251–259, 2005. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00636>

VAN ENGELBURG FA, MAES RK, VAN OIRSCHOT JT, RIJSEWIJK FA. Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 12, p. 3129-3135, 1993.
<https://doi.org/10.1128/jcm.31.12.3129-3135.1993>

VANROOSE G, NAUWYNCK H, VAN SOOM A, VANOPDENBOSCH E, DE KRUIF A. Effect of bovine herpesvirus-1 or bovine viral diarrhea virus on development of in vitro-produced bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.54, n. 3, p.255-263, 1999. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2795\(199911\)54:3%3C255::aid-mrd6%3E3.0.co;2-z](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2795(199911)54:3%3C255::aid-mrd6%3E3.0.co;2-z)

VAN OIRSCHOT JT. Diva vaccines that reduce virus transmission. **Journal of Biotechnology**, v. 73, n. 2-3, p. 195–205, 1999. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(99\)00121-2](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(99)00121-2)

VARAGO FC, MENDONÇA LF, LAGARES MA. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, p.100-109, 2008.

VIANA JHM, FIGUEIREDO ACS, SIQUEIRA LGB. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. **Animal Reproduction**, v.14, p.476-481, 2017. Disponível em: <https://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RB152%20Varago%20pag100-109.pdf>

VIANA JHM. 2023 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. **Embryo Technology Newsletter**, v.42, n.4, p.1-15, 2024. Disponível em: https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2023.pdf

WALDROP JG, STRINGFELLOW DA, RIDDELL KP, GALIK PK, RIDDELL MG, GIVENS MD, CARSON RL, BROCK KV. Different strains of noncytopathic bovine viral diarrhea virus (BVDV) vary in their affinity for in vivo derived bovine embryos. **Theriogenology**, v.62, n. 1-2, p.45-55, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.06.009>

WRATHALL AE, SIMMONS HA, VAN SOOM A. Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilization with virus-infected semen. **Theriogenology**, v. 65, n.2, p. 247-274, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.043>

WHITE MB, SNOWDON WA. The breeding record of cows inseminated with a batch of semen contaminated with infectious bovine rhinotracheitis virus. **Australian Veterinary Journal**, v. 49, n. 11, p. 501-506, 1973. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1973.tb02332.x>

YUAN HL, WANG YQ, ZHOU SM, LIU LS, CHEN XL, LOU SY, YUAN SJ, HAO YM, LI N. Low-Temperature Preparation of Superparamagnetic CoFe₂O₄ Microspheres with High Saturation Magnetization. **Nanoscale Research Letters**, v. 5, n. 11, p. 1817–1821, 2010. <https://doi.org/10.1007/s11671-010-9718-7>

5. APÊNDICE I

**ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA TROPICAL ANIMAL HEALTH AND
PRODUCTION – Fator de Impacto 1,7**

Effects of bovine herpesvirus 1 on thawed bull sperm and evaluation of methods for its removal from experimentally infected semen

Ivana Ferro Carmo¹ [0000-0002-8918-8649](#), Emelly Barbosa Calheiros² [0009-0000-7383-3968](#), Juliana Carla Cavalcanti Marques¹ [0000-0003-3205-7020](#), Lucas Santos Matos¹ [0000-0003-1438-9734](#), Abelardo Silva-Júnior² [0000-0002-9379-1686](#), Diogo Ribeiro Câmara^{1*} [0000-0002-9873-7419](#)

¹Laboratório de Reprodução Animal de Alagoas, Universidade Federal de Alagoas - UFAL

²Laboratório de Pesquisas em Virologia e Imunologia, Universidade Federal de Alagoas - UFAL

*Corresponding author - email: diogo@vicosa.ufal.br

Abstract

In the present study, the effects of different concentrations (0, 10⁴, 10⁵, and 10⁶ TCID₅₀/mL) of bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) on thawed semen samples from BoHV-1-PCR negative bulls (PCR-negative) were initially evaluated during incubation. In the second experiment, the efficacy of Percoll gradient (PG), magnetic nanoparticles associated with anti-BoHV-1 antibodies (MNPs), and the association of both techniques for reducing the viral load in semen experimentally infected with BoHV-1 (10⁴ TCID₅₀/mL) was assessed by viral titration. Sperm kinematics were influenced by both bull and time, with bull × time interaction ($P < 0.001$), while membrane integrity and morphology were influenced only by time ($P < 0.01$), with no effect of viral infection ($P > 0.05$). All PG-treated samples were negative after viral titration, whereas MNP resulted in negative viral titration when samples were incubated with MNPs for 60 min. It is concluded that BoHV-1 had no direct effect on thawed bull sperm quality and that PG was effective in reducing the viral load. Furthermore, MNP is an alternative for viral control in semen samples, with no apparent toxicity to spermatozoa.

Keywords: Cattle, Reproductive virus, Magnetic nanoparticles, Semen treatment.

Introduction

Transmitted among animals through direct or indirect contact, usually via the respiratory tract or the mucosa of the reproductive tract, BoHV-1 causes reproductive disorders in cattle, compromising the economic and sanitary aspects of herds (Straub, 1990). Once infected, an animal becomes a lifelong carrier (Ashbaugh et al., 1997). Furthermore, BoHV-1 impairs the outcomes of *in vitro* embryo production, not only decreasing the

fertilizing capacity of sperm but also impairing embryonic formation and development when it infects the oocytes (Vanroose et al., 1999; Alves et al., 2019).

In Brazil, the prevalence of BoHV-1 in herds is considered high, with approximately 70% of animals from properties with a history of abortion being seropositive (Lima et al., 2011). However, current Brazilian regulations do not establish sanitary requirements regarding BoHV-1 bulls allocated in AI Centers (BRASIL, 2003). A previous study used PCR for BoHV-1 detection in 76 fresh semen samples from bulls in reproductive activity and 23 frozen semen samples from an AI Center, resulting in 44.7% and 21.7% positive samples, respectively (Oliveira et al., 2011).

Bielanski et al. (1998) demonstrated that the use of 0.3% trypsin can eliminate the virus from bovine semen samples artificially infected with BoHV-1 (10^3 or 10^4 TCID₅₀/mL), but this strategy negatively affected sperm quality. Other techniques for virus removal have been tested in semen from other species, including washing strategies, medium acidification, and incubation with monoclonal antibodies that inhibit the binding of the virus to the target cell (Bielanski, 2007; Wrathall et al., 2006).

Considering that viral contamination in semen samples has been a problem in assisted reproduction laboratories (Michou et al., 2011), the high prevalence of BoHV-1 infection in Brazil, and that bulls of high genetic merit may be BoHV-1 positive, strategies reducing viral load in bull semen might alleviate the negative effect on *reproductive* outcomes. Furthermore, it could be a strategy for controlling viral infection in the semen of other species. Thus, the present study evaluated the influence of BoHV-1 on sperm quality and the efficiency of Percoll gradient (PG) and magnetic nanoparticles associated with anti-BoHV-1 antibodies (MNPs) for reducing the viral load in experimentally infected bovine semen.

Materials and methods

Biologicals

Semen samples from three Angus bulls, obtained from the same batches at an AI Center and negative for BoHV-1 DNA (Nested-PCR), were used in the experiments. The BoHV-1 virus was the Los Angeles strain, replicated in MDBK cultured in monolayers (37 °C, 5% CO₂), using Low Glucose DMEM (Gibco™, Grand Island, USA) with 0.4 mg/L streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 1.6 mg/L penicillin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco-BRL, Grand Island, USA). Viral titration was obtained using the TCID₅₀ (Tissue Culture Infectious Dose) technique described by Reed and Muench

(1938). The blood serum, for incubation with the magnetic nanoparticles, was obtained from naturally infected cows, exhibiting an anti-BoHV-1 titer of 128, measured by the serum neutralization technique (House and Baker, 1971).

Experiment I – Effect of BoHV-1 on thawed bull sperm

Three straws from each bull were thawed (37 °C, 30 s) with the contents individually loaded into microtubes. After one minute (Time 0, T0), sperm kinetics (CASA; total motility, VCL, VSL, and VAP), physical membrane integrity (eosin-nigrosin), and sperm morphology were evaluated. Sperm endpoints were assessed as described by Matias et al. (2021).

Subsequently, the sample was equally distributed into four microtubes, and BoHV-1 was added to achieve final concentrations of 0 (control), 10^4 , 10^5 , and 10^6 TCID₅₀/mL. The tubes were then maintained in a water bath at 37°C and evaluated after 2, 4, and 8 hours of experimental infection (T2, T4, and T8, respectively). At the different incubation times, the same sperm analyses described for time T0 were performed.

Experiment II – Evaluation of Percoll gradient (PG) and magnetic nanoparticles associated with anti-BoHV-1 antibodies (MNPs) to reduce viral load

This study was performed in duplicate. For each replicate, three straws from each bull were thawed (37 °C, 30 s), the contents were pooled into a single microtube, and homogenized. As a negative control, an aliquot (200 µL) of the non-infected semen was transferred to a microtube at room temperature (approximately 22 °C) under agitation, and at different intervals (0, 15, 30, and 60 min), the aliquots were stored for titration.

Artificial infection of the semen was performed by serial dilution of thawed BoHV-1 stock solution (10^8 TCID₅₀/mL; 37 °C, 30 s) in TL-Semen (Bioembryo, Bauru, Brazil), to obtain a final concentration of 10^4 TCID₅₀/mL of semen. After 10 min under agitation at room temperature, aliquots were harvested for titration (positive control, T0), to determine sperm concentration (Neubauer chamber), total motility (CASA), and to execute PG and MNPs treatments. The remaining infected sample was kept at room temperature under agitation, and after 15, 30, and 60 min, the aliquots were collected for both titration (positive control T15, T30, and T60, respectively) and MNP treatment.

The PG (90% and 45%) was prepared by diluting Percoll (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in TL-Semen. In a conical-bottom microtube (1.5 mL), 500 µL of 90% Percoll was slowly deposited under the 45% Percoll layer, finalizing with the addition of 200 µL of the infected semen on top of the gradient. The sample was

centrifuged (7000 g, 5 min), and 50 μ L of the formed pellet was collected for titration (PG treatment). Aliquots of the sperm pellet were also taken for the determination of sperm concentration and total motility, as described.

For the preparation of the MNPs, 50 μ L of nanoparticles (Dynabeads™ Protein G, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 100 μ L of serum, and 100 μ L of TL-Semen were added to a microtube and maintained at room temperature under agitation for 10 minutes. Subsequently, the microtube was placed on a magnetic stand (ExoFlow 700A-1, System Biosciences, CA, USA) until the nanoparticles adhered to the wall of the tube. The solution was carefully removed without disturbing the nanoparticles, then 1.0 mL of artificially infected semen was added, maintained under agitation at room temperature for different intervals (15, 30, and 60 min). At each time point, the microtube was again placed on the magnetic stand, and after the nanoparticles were separated, aliquots were collected for titration. Also, aliquots of infected semen treated for 60 min with MNPs were used to assess sperm concentration and total motility.

For titration, aliquots (50 μ L) from all samples (negative control, positive control, GP, and MNPs treated) were diluted in TL-Semen (50 μ L), homogenized, loaded into 0,25 mL straws, and stored in liquid nitrogen until analysis. Viral titrations were performed on MDBK cell lineages culture in Low Glucose DMEM medium (37 °C, 5% CO₂), using the TCID₅₀ technique (Reed and Muench, 1938). The experiment was conducted in a 96-well microtitration plate (USA Scientific, Inc., Ocala, FL) containing 50 μ L of Low Glucose DMEM, supplemented with 2% FBS (Gibco™), 1% PSA (Gibco™), and 1% L-Glutamine (Gibco™), containing 5 x 10⁴ MDBK cells. The test was analyzed after 72 hours of incubation to check for the absence or presence of a cytopathic effect, compared to negative and positive controls (OIE, 2021).

Statistical analysis

In Experiment I, data normality was assessed using the Shapiro-Wilk test. The influence of the variables bull, time, and viral concentration, as well as their interactions, was determined using two-way ANOVA. Differences between means were compared using Tukey's test. In Experiment II, the effects of PG and MNPs (60 min) treatment on sperm concentration and motility, compared to infected non-treated samples, were assessed using the Mann-Whitney test. For all comparisons, differences with probabilities lower than 5% ($P < 0.05$) were considered significant.

The efficacy of PG or MNPs (T15, T30, T60) for reducing the viral load in the semen samples was compared using descriptive statistics, considering the effectiveness in achieving negative titration results.

Results

Experiment I

After eight hours of incubation, no motile spermatozoa were identified in any of the treatments; therefore, this time point was disregarded for statistical analysis. For all sperm kinetic parameters (TM, VSL, VCL, and VAP), there was an effect of bull and time ($P < 0.001$), with an interaction between them ($P < 0.001$), but no effect of viral infection ($P > 0.05$). Regarding plasma membrane integrity and the percentage of normal spermatozoa, a time effect was observed ($P < 0.001$), but no effect of bull or viral concentration was found ($P > 0.05$), and no interaction was detected.

Experiment II

Following Experiment 1, the addition of BoHV-1 at the different concentrations tested did not influence the evaluated sperm parameters. Therefore, in Experiment 2, the effects of PG and incubation with MNP for 60 min on sperm motility and concentration were compared with untreated infected samples. The PG treatment resulted in higher motility ($P < 0.05$), while no effect of MNPs was observed for this parameter (Fig. 1A). Furthermore, although MNP treatment reduced sperm concentration compared to untreated infected semen, PG resulted in the lowest post-treatment sperm concentration ($P < 0.05$) – Fig. 1B.

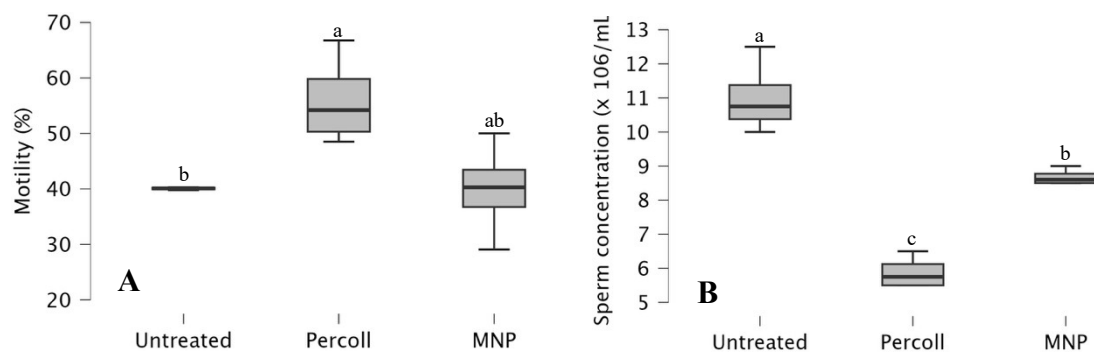


Fig. 1 Effect of Percoll gradient and incubation with magnetic nanoparticles associated with anti-BoHV-1 antibodies (MNPs) for 60 minutes on motility (A) and sperm concentration (B) in thawed bovine semen samples artificially infected with Bovine Herpesvirus 1 (10^4 TCID₅₀/mL). Different letters above each boxplot indicate significant differences ($P < 0.05$) between the different treatments for the same parameter.

No cytopathic effect was observed during titration in any of the negative control samples. The positive control samples (semen infected with 10^4 TCID₅₀/mL of BoHV-1, after 0, 15, 30, and 60 minutes of incubation at room temperature post-thaw) showed an increase in titer over the incubation period, from approximately 10^2 TCID₅₀/mL to 10^3 TCID₅₀/mL after 60 min.

The use of PG resulted in 100% negative samples after viral titration, while the use of MNPs resulted in a reduction of the mean titer as the incubation time increased, achieving 100% negative samples after titration only when the infected semen was incubated with MNPs for 60 minutes (Table 1).

Table 1 Titration for Bovine Herpesvirus 1 in thawed bovine semen samples artificially infected (10^4 TCID₅₀/mL), treated with Percoll gradient (PG) or magnetic nanoparticles associated with anti-BoHV-1 antibodies (MNPs) for different periods.

Treatment*	Viral titre (TCID ₅₀ /mL)	Positive samples after titration (%)
PG	Below detection	0
MNP15	$10^{2.3}$	50
MNP30	$10^{1.5}$	50
MNP60	Below detection	0

*15, 30 e 60 refer to diferente incubation times (min) of infected samples with MNP.

Discussion

The absence of direct effects of BoHV-1 on bovine spermatozoa, detected in the present study, even adding viral concentrations thousands of times higher than those reported in ejaculates of artificially infected bulls (10^4 TCID₅₀/mL; Spradbrow, 1968), is consistent with previous findings. Tanghe et al. (2005) stated that the virus can interfere with the binding between the sperm and the oocyte's zona pellucida but observed no alteration in the kinematics or acrosomal integrity of bovine spermatozoa. Souza et al. (2018) also reported no impact of experimental infection of bulls with BoHV-1 on sperm quality in fresh or post-thaw semen. In bulls naturally infected with BoHV-1, used in a natural mating system, no influence on sperm parameters or bull fertility was identified (Montoya-Monsalve et al., 2021).

Conversely, El-Mohamady et al. (2020) reported that bulls naturally infected with BoHV-1 exhibited lower motility, concentration, and sperm viability, in addition to a higher percentage of sperm defects, when compared to negative bulls. We infer the findings of El-Mohamady et al. (2020) may reflect individual variation,

since the negative control consisted of bulls not carrying BoHV-1, or even systemic conditions that were reflected in sperm quality.

The increase in titration in the positive control samples over the incubation period was an unexpected result, since when cultivated in MDBK cells, BoHV-1 can only increase the viral titer from 10^4 TCID₅₀/mL to approximately 10^5 TCID₅₀/mL after 24 hours (Marin et al., 2012). These results may indicate a reduction in viral infectivity in the initial moments after experimental semen infection, either due to differences in biochemical composition between the virus culture medium and the dilution medium, or even effects of the semen and its extender, as they contain factors that can influence viral activity/infectivity, such as proteolytic enzymes (Bielanski et al., 1998), directly impacting titration results, as demonstrated in humans (Münch et al., 2007; Chen et al., 2021). It should be noted that there is no evidence that BoHV-1 replicates directly in spermatozoa (Engelenburg et al., 1993).

In the present experiment, the Percoll gradient demonstrated effectiveness in reducing BoHV-1 titration. These results corroborate those of Galuppo et al. (2012), who demonstrated that the Percoll gradient reduced the viral load in semen samples contaminated with bovine viral diarrhea virus (BVDV) from $10^{6.7}$ to values between $10^{2.3}$ and 10^1 TCID₅₀/mL. Similar results were observed by Hideji Hanabusa et al. (2000) with human immunodeficiency virus 1 (HIV-1), where Percoll gradient centrifugation followed by swim-up reduced HIV-1 RNA and proviral DNA to undetectable levels, while the Percoll gradient alone resulted in 8% positive samples.

It is important to note that the results regarding the effectiveness of eliminating positive titration for BoHV-1 with the Percoll gradient in the present study should be viewed with caution, as the technique was performed approximately 10 minutes after experimental infection, a period in which a low titer value was demonstrated through the titration of the positive control samples.

It was demonstrated that the use of serum from animals with a high titer for BoHV-1, as a source of antibodies to be conjugated to the nanoparticles, resulted in negative titrations for BoHV-1 after 60 minutes of incubation, we suggest that the use of purified polyclonal or monoclonal antibodies for association with the nanoparticles could result in greater efficacy, reducing the time required for viral removal, since the concentration of antibodies conjugated to the nanoparticles influences separation efficiency (Smith et al., 2011; Haghighi et al., 2020).

Furthermore, it was demonstrated that the MNPs did not result in apparent toxicity to bovine spermatozoa, reinforcing the idea that this could be a strategy used not only for virus elimination. It is possible to associate populations of nanoparticles with different "targets" in the same semen sample, aiming, for example, at bacterial

control and the control of other contaminants, without compromising sperm quality and expanding biosafety strategies in assisted reproduction (Pérez-Duran et al., 2020), like removing nanoplastics (Chen et al., 2024), or defective sperm (Odhiambo et al., 2014).

Thus, it is concluded that, even at high concentrations, BoHV-1 did not reduce the quality of artificially infected bovine spermatozoa, and the use of the Percoll gradient was effective in reducing BoHV-1 in semen samples infected with 10^4 TCID₅₀/mL. Furthermore, the use of magnetic nanoparticles conjugated with anti-BoHV-1 antibodies caused no apparent toxicity to thawed bovine spermatozoa, representing a promising alternative for viral reduction when conjugated to antibodies.

Authors contributions

IFC, DRC, and ASJ conceptualized the work and designed the study; IFC, EBC, JCCM, and LSM collected and provided the data; IFC, DRC, EBC, and ABJ analyzed the data; IFC and DRC wrote the manuscript; DRC and ASJ critically reviewed the manuscript. All the authors read and reviewed the manuscript.

Funding

The authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL) for the financial support (Code 0001 and Process number 60030.0000001651/2023, respectively).

Data availability

The data generated in the present study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

ALVES SVP et al (2019). Bovine herpesvirus 1 can impact the bovine oocyte development during in vitro maturation. *Res Vet Sci*, 123:135-140. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.12.020>

ASHBAUGH SE et al (1997). Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest*, 9(4): 387-394.

<https://doi.org/10.1177/104063879700900408>

BIELANSKI A (2007). Disinfection procedures for controlling microorganisms in the semen and embryos of humans and farm animals. *Theriogenology*, 68:1-22. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.03.025>

BIELANSKI A et al (1988). Inactivation of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) from in vitro infected bovine semen. *Theriogenology*, 30(4): 649-657. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(88\)90300-7](https://doi.org/10.1016/0093-691X(88)90300-7)

BRASIL. Instrução Normativa 48/2003. Secretaria de Defesa Agropecuária. Requisitos sanitários mínimos para a produção e comercialização de sêmen bovino e bubalino no Brasil. *Diário Oficial da União*, n. 117, Seção 1, p. 6-7, 20 de junho de 2003. Disponível em:

<https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=6&data=20/06/2003>

CHEN R et al (2021). Characterization of an Antiviral Component in Human Seminal Plasma. *Front Immunol*, (12), 580454. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.580454>

CHEN Y et al (2024). Occurrence, toxicity, and removal of polystyrene microplastics and nanoplastics in human sperm. *Environ Chem Lett*. <https://doi.org/10.1007/s10311-024-01752-0>

EL-MOHAMADY RS, BEHOUR TS, RAWASH ZM (2020). Concurrent detection of bovine viral diarrhoea virus and bovine herpesvirus-1 in bulls' semen and their effect on semen quality. *Int J Vet Sci Med*, 8(1):106–114. <https://doi.org/10.1080/23144599.2020.1850197>

ENGELBURG, VAN, et al (1993). Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. *J Clin Microbiol*, 31(12), 3129–3135.

<https://doi.org/10.1128/jcm.31.12.3129-3135.1993>

GALUPPO A G (2012). Evaluation of the effectiveness of semen processing techniques to remove bovine viral diarrhoea virus from experimentally contaminated semen samples. *J Virol Methods*, 187(2), 443–448.

<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.11.029>

HAGHIGHI AH et al (2020). Effects of different quantities of antibody conjugated with magnetic nanoparticles on cell separation efficiency. *Heliyon* 6:e03677. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03677>

HIDEJI HANABUSA et al (2000). An evaluation of semen processing methods for eliminating HIV-1. *AIDS*, 14(11), 1611–1616. <https://doi.org/10.1097/00002030-200007280-00017>

HOUSE JA, BAKER JA (1971). Bovine herpesvirus IBR-IPV. The antibody virus neutralization reaction. *Cornell Vet*, 61(2):320-335. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4325253/>

- LIMA MS et al (2011). Pesquisa de anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo I no Brasil. *Biológico*, 73(2):214-218. Available at: https://biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/docs/bio/v73_2/p214-218.pdf
- MATIAS MC et al (2021). Use of galactose to vitrify ram semen in straws. *Ciênc Anim Bras*, 22:e67525. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v22e-67525>
- MARIN MS et al (2012). In vitro replication of bovine herpesvirus types 1 and 5. *J Virol Methods*, 181:80-85. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.01.016>
- MICHOU V et al (2011) Herpes virus infected spermatozoa following density gradient centrifugation for IVF purposes. *Andrologia*, 44(3):174-180. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2010.01121.x>
- MONTOYA-MONSALVE G et al (2021). Impact of overuse and sexually transmitted infections on seminal parameters of extensively managed bulls. *Animals*, 11(3):827. <https://doi.org/10.3390/ani11030827>
- MÜNCH J et al (2007). Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection. *Cell*, 131(6), 1059–1071. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.014>
- ODHIAMBO JF et al (2014). Increased conception rates in beef cattle inseminated with nanopurified bull sperm. *Biol Reprod*, 91(4):1-10. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.121897>
- OIE. World organization for animal health. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2021. **Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis**. 2021. Available at: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.11_IBR_IPV.pdf
- OLIVEIRA MT et al (2011). Detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in semen from Brazilian bulls. *Theriogenology*, 75(6): 1139-1145. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.025>
- PÉREZ-DURAN F et al (2020). Toxicity and antimicrobial effect of silver nanoparticles in swine sperms. *Syst Biol Reprod Med*, 66(4), 281–289. <https://doi.org/10.1080/19396368.2020.1754962>
- REED LJ, MUENCH H (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoint. *Am J Epidemiol*, 27(3):493-497. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
- SMITH JE et al (2011). Optimization of antibody-conjugated magnetic nanoparticles for target preconcentration and immunoassays. *Anal Biochem* 410(1):124-132. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.11.005>
- SOUZA WJ et al (2018). Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1): método de diagnóstico e sua influência na qualidade espermática em touros infectados experimentalmente. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 70(4):1163–1171. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10229>
- SPRADBROW WA (1968). The isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from bovine semen. *Aust Vet J*, 44(9):410-412. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1968.tb09134.x>

STRAUB OC (1990). Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus. In: STRAUB, O.C. Virus Infections of Ruminants. Nova York: Elsevier, 1990, p. 71-99.

TANGHE S et al (2005). Inhibition of bovine sperm–zona binding by bovine herpesvirus-1. Reproduction, 130(2):251–259, 2005. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00636>

VANROOSE G et al (1999). Effect of bovine herpesvirus-1 or bovine viral diarrhea virus on development of in vitro-produced bovine embryos. Mol Reprod Devel, 54(3):255-263. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2795\(199911\)54:3%3C255::aid-mrd6%3E3.0.co;2-z](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2795(199911)54:3%3C255::aid-mrd6%3E3.0.co;2-z)

WRATHALL AE et al (2006). Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilization with virus-infected semen. Theriogenology, 65(2):247-274. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.043>

6. APÊNDICE II

DADOS ORIGINAIS

6.1 PAN-Nested-PCR para detecção de herpesvírus nas amostras de sêmen

Os primers (Sintese Biotecnologia, Belo Horizonte, Brasil) utilizados estão apresentados na Tabela 1. Para a PCR primária foram adicionados em cada poço 12,5 µL de GoTaq® MasterMix (Promega Corporation, WI, USA), 1 µL dos primers DFA, ILK e KG1 (10 µM), 4,5 µL de água livre de nucleases e 5 µL de sêmen descongelado. Foram efetuados 45 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 46 °C por 60 segundos e 72 °C por 60 segundos, com uma extensão final de 72 °C por sete minutos (VeritiPro™ Thermal Cycler. Applied Biosystems, MA, USA). Como controle positivo, utilizou-se uma amostra da cepa Los Angeles de BoHV-1.

Para a realização da PCR secundária, foram adicionados 12,5 µL de GoTaq® MasterMix; 1 µL dos primers TGV e IYG (10 µM), 5,5 µL de água livre de nucleases e 5 µL do produto da PCR primária. O ciclo foi o mesmo utilizado na PCR primária. Os fragmentos oriundos 5 µL do produto da PCR secundária de cada amostra foram visualizados em gel de agarose (2%). O gel foi preparado com 50 mL de TBE 1X, 1 g de agarose e 5 µL de Sybr Safe DNA Gel Stain (Promega Corporation, WI, USA). O tamanho do fragmento esperado para a confirmação de amostras positivas foi entre 215 pb e 315 pb.

Tabela 1. Sequência de oligonucleotídeos utilizados para a detecção de herpesvírus por nested PCR.

PRIMER	SEQUÊNCIA
DFA	5'-GAYTTYGCNAGYYTNTAYCC-3'
ILK	5'-TCCTGGACAAGCAGCARNYSGCNMTNAA-3'
KG1	5'-GTCTTGCTCACCAGNTCNACNCCYTT-3'
TGV	5'-TGTAACTCGGTGTA YGGNTTYACNGGNGT-3'
IYG	5'-CACAGAGTCCGTRTCNCCRTADAT-3'

Nenhuma das amostras de sêmen foi positiva para BoHV-1 (Figura 2).

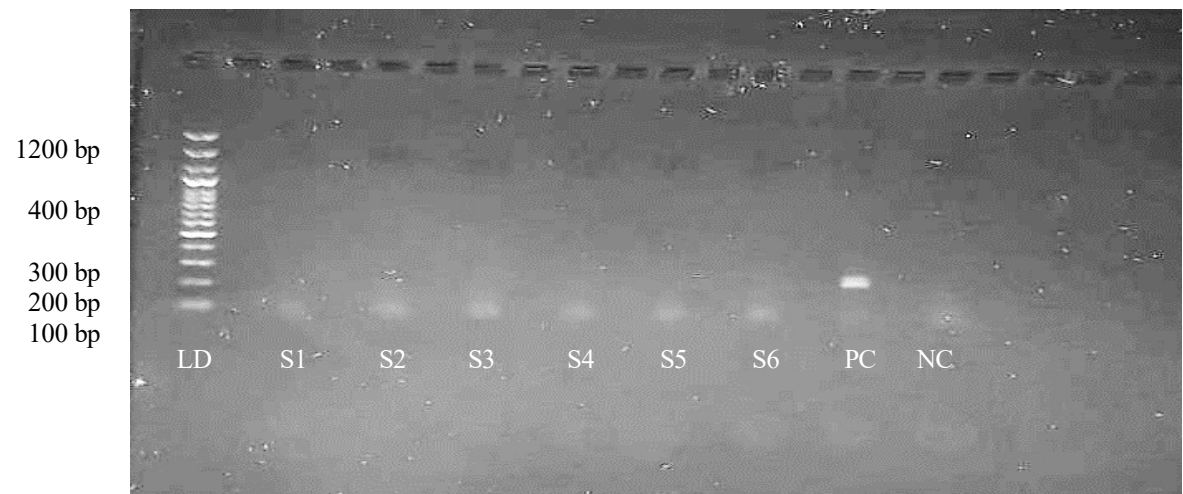


Figura 1 Eletroforese em gel de agarose evidenciando os produtos de PCR amplificados. LD: ladder, S: samples, PC: controle positivo, NC: controle negativo.

6.2 Dados do efeito da infecção experimental com Hespesvírus bovino tipo 1 em amostras de sêmen descongelado bovino

Tabela 2. Avaliação dos efeitos touro, tempo e concentração viral sobre parâmetros cinemáticos de espermatozoides bovinos descongelados, infectados experimentalmente.

TOURO	TEMPO (H)	VIRUS (TCID ₅₀ /mL)	MOTILIDADE TOTAL (%)	VSL (μm/s)	VCL (μm/s)	VAP (μm/s)
1	0	0	79.1 ± 1.1	36.6 ± 1.6	72.3 ± 1.4	41.6 ± 1.8
	γ	0	42.6 ± 4.6	27.2 ± 0.9	63.6 ± 2.4	33.1 ± 1.1
		10 ⁴	36.3 ± 4.5	17.0 ± 1.9	51.2 ± 3.6	25.8 ± 1.5
		10 ⁵	47.8 ± 2.3	30.1 ± 0.8	72.3 ± 0.9	37.6 ± 0.8
		10 ⁶	44.6 ± 2.4	29.7 ± 2.2	64.6 ± 2.2	33.5 ± 1.1
	4	0	7.4 ± 1.6	11.5 ± 1.4	32.8 ± 1.6	21.1 ± 1.0
		10 ⁴	11.8 ± 1.9	10.2 ± 0.9	42.3 ± 3.1	23.3 ± 1.6
		10 ⁵	7.5 ± 1.3	9.8 ± 1.0	44.8 ± 2.2	24.9 ± 0.8
		10 ⁶	13.3 ± 2.1	6.8 ± 0.6	31.8 ± 0.9	20.9 ± 0.8
2	0	0	78.7 ± 1.3	44.2 ± 1.1	79.1 ± 1.4	48.1 ± 1.1
	γ	0	64.9 ± 2.3	26.8 ± 1.2	65.6 ± 1.7	33.1 ± 1.1
		10 ⁴	48.9 ± 4.2	24.1 ± 1.7	68.5 ± 1.7	30.2 ± 1.5
		10 ⁵	37.5 ± 4.3	25.6 ± 1.8	66.1 ± 2.5	30.6 ± 1.5
		10 ⁶	59.0 ± 4.5	29.7 ± 2.2	73.6 ± 3.0	35.7 ± 2.5
	4	0	6.8 ± 1.4	7.5 ± 0.9	32.6 ± 2.6	23.2 ± 1.4
		10 ⁴	2.9 ± 0.4	4.7 ± 0.4	24.1 ± 1.6	15.3 ± 1.6
		10 ⁵	5.4 ± 1.0	6.3 ± 0.3	41.4 ± 0.9	22.4 ± 0.9
		10 ⁶	6.6 ± 1.4	5.7 ± 0.4	23.8 ± 1.4	15.0 ± 1.6
3	0	0	46.8 ± 2.8	40.9 ± 1.5	76.3 ± 2.3	45.8 ± 1.5
	γ	0	31.9 ± 3.1	17.8 ± 1.2	50.3 ± 2.2	28.3 ± 0.8
		10 ⁴	21.0 ± 1.8	11.3 ± 1.3	54.5 ± 3.9	22.6 ± 1.6
		10 ⁵	28.4 ± 4.4	12.9 ± 1.4	52.5 ± 3.0	26.0 ± 1.0
		10 ⁶	21.8 ± 5.0	11.0 ± 1.3	42.7 ± 2.8	21.3 ± 1.1
	4	0	4.4 ± 0.5	5.6 ± 0.3	30.2 ± 1.8	18.7 ± 2.2
		10 ⁴	2.7 ± 0.4	4.0 ± 0.3	24.4 ± 3.9	12.3 ± 3.1
		10 ⁵	3.9 ± 0.3	5.4 ± 0.4	30.1 ± 3.5	16.5 ± 1.0
		10 ⁶	3.6 ± 0.5	5.6 ± 0.4	29.6 ± 2.2	15.8 ± 1.2

Tabela 3. Resultados da análise estatística dos efeitos touro, tempo e vírus sobre os parâmetros cinemáticos de espermatozoides bovinos descongelados, infectados experimentalmente.

PARÂMETRO	FATOR			INTERAÇÃO		
	TOURO	TEMPO	VIRUS	TOURO ×	TOURO ×	VIRUS ×
				TEMPO	VIRUS	TEMPO
MOTILIDADE	< 0.001	< 0.001	0.15	< 0.001	0.42	0.07
VSL	< 0.001	< 0.001	0.08	< 0.001	0.83	0.06
VCL	< 0.001	< 0.001	0.09	< 0.001	0.88	0.36
VAP	< 0.001	< 0.001	0.18	< 0.001	0.55	0.37

6.3 Dados originais das análises de titulação viral

Tabela 4. Titulação após infecção experimental com Herpesvírus bovino tipo-1 (10^4 TCID₅₀/mL) em amostras de sêmen bovino descongeladas e não tratadas (CP), tratadas com gradiente de Percoll (GP), tratadas com nanopartículas magnéticas associadas a anticorpos anti-BoHV-1 (MNP), ou tratadas com associação das técnicas (MNP+GP).

Tratamento*	Titulação média (TCID ₅₀ /mL)	Amostras positivas pós-titulação
CP0	$10^{1.5}$	100
CP15	$10^{2.0}$	100
CP30	$10^{1.6}$	100
CP60	$10^{3.0}$	100
GP	Não detectado	0
MNP15	$10^{2.3}$	50
MNP30	$10^{1.5}$	50
MNP60	Não detectado	0
MNP15 + GP	Não detectado	0
MNP30 + GP	Não detectado	0
MNP60 + GP	Não detectado	0

7. ANEXO – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

em

SPRINGER
NATURE

Tropical Animal Health and Production

Diogo Câmara

Home

Main Menu

Submit a Manuscript

About

Help

← Submissions Being Processed for Author

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Results per page 10

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
View Submission Author Status Send E-mail	TROP-D-25-01583	Effects of bovine herpesvirus 1 on thawed bull sperm and evaluation of methods for its removal from experimentally infected semen	21 Aug 2025	21 Aug 2025	Submitted