

SAULLO VINÍCIUS PEREIRA ALVES

***Bovine herpesvirus 1* INTERFERE NA MATURAÇÃO *in vitro* DE
OVÓCITOS BOVINOS EM MODELO DE INFECÇÃO
ARTIFICIAL E NATURAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

A474b
2018
Alves, Saullo Vinícius Pereira, 1993-
Bovine herpesvirus 1 interfere na maturação *in vitro* de
ovócitos bovinos em modelo de infecção artificial e natural /
Saullo Vinícius Pereira Alves. – Viçosa, MG, 2018.
xi, 47 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Eduardo Paulino da Costa.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 37-47.

1. Bovinos - Doenças. 2. *Bovine herpesvirus 1*. 3. Bovinos -
Reprodução. 4. *Cumulus oophorus*. 5. Óvulos. 6. Ovários.
7. Maturação. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária. II. Título.

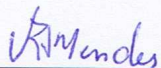
CDD 22. ed. 636.2089691

SAULLO VINÍCIUS PEREIRA ALVES

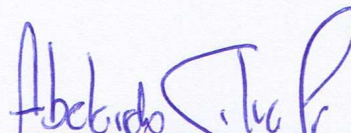
***Bovine herpesvirus 1* INTERFERE NA MATURAÇÃO *in vitro* DE OVÓCITOS BOVINOS
EM MODELO DE INFECÇÃO ARTIFICIAL E NATURAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 23 de julho de 2018.



Vívian Rachel de Araújo Mendes



Abelardo Silva Júnior
Coorientador



Eduardo Paulino da Costa
(Orientador)

Dedico esse trabalho aos meus amados pais, que são razões da minha vida, meus grandes alicerces na construção de uma vida pautada em respeito, educação e trabalho.

AGRADECIMENTOS

Gratidão imensurável a todos envolvidos é o sentimento que fica após essa importante etapa da minha vida. Jornada essa, de muito aprendizado, dedicação e crescimento pessoal.

Aos meus pais, José e Adriana, obrigado pela abdicação de anseios pessoais em prol dos planos de seus filhos, pelo amor, carinho e por todos os ensinamentos. Aos meus irmãos, Marcelle e Talles, agradeço pelo exemplo e momentos de alegria compartilhados. Grato também aos meus familiares, amigos e colegas pelo apoio, companheirismo, atenção e pelos momentos de felicidade.

À minha amada namorada, Daniela, obrigado pela amizade, carinho, amor devotado e pela sua fundamental relevância durante toda essa etapa.

Aos grandes mestres da minha jornada acadêmica, professores da Universidade Federal de Viçosa, da University of Minnesota e o professor Dr. James Richard Pursley da Michigan State University, fica o meu eterno agradecimento por todo o conhecimento compartilhado e por terem suscitado minha grande admiração à vida acadêmica.

Ao professor Eduardo, obrigado pela orientação e pela oportunidade de executar esse trabalho ao lado de alguém de sapiência e maestria ímpares. Fica o meu reconhecimento, respeito e admiração pela sua personalidade de tão peculiar simplicidade e competência. Agradeço pela sólida contribuição em minha formação profissional e pessoal.

Aos professores Abelardo Silva Junior, Mariana Machado Neves e José Domingos Guimarães agradeço pela coorientação, auxílio e aprendizados durante o experimento. Grato também a professora Vívian Rachel de Araújo Mendes pela participação e colaboração na banca.

Agradecimento especial à Vanessa, por todos os anos de amizade e parceria, pelas orientações e pelos seus importantes auxílios nesse trabalho.

À Lidiany e o Marcos agradeço pela amizade e cooperação além dos momentos de aprendizado e descontração durante o mestrado. Aos estudantes de iniciação científica, Carol, Rebeca e Matheus, obrigado pela colaboração.

Aos servidores técnico-administrativos do Departamento de Veterinária/UFV, em especial a Rosi, Luis, Marquinhos, Cláudio Cardoso, e a Divina, que sempre estiveram dispostos a ajudar, bem-afortunado fico pelo fundamental auxílio prestado.

À CAPES, pela oportunidade de realizar o curso de mestrado
e pela bolsa de estudos...

Sobretudo, obrigado Deus! Pela fiel companhia
e por ter me concedido o imenso prazer da vivência
com pessoas tão especiais em meu entorno.

BIOGRAFIA

Saullo Vinícius Pereira Alves, filho de José Calisto Alves e Adriana Aparecida Pereira Alves, natural da cidade de Sete Lagoas, Minas Gerais, nasceu em 21 de setembro de 1993.

Iniciou a sua vida acadêmica no ensino superior quando ingressou na Universidade Federal de Viçosa em março de 2011, vindo a graduar-se como médico veterinário em janeiro de 2017. Durante esse período, nos anos de 2014 e 2015 recebeu oportunidade de realizar graduação sanduíche por meio de bolsa de estudos do Programa Ciências sem Fronteiras nos Estados Unidos, tendo estudado na University of Minnesota-Crookston e na Michigan State University, East Lansing.

Em março de 2017 ingressou no curso de Mestrado em Medicina Veterinária na área de Reprodução e Produção Animal do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, vindo a realizar defesa da Dissertação em 23 de julho de 2018.

*“The important thing is to never stop questioning.”
(Albert Einstein)*

*“Try to make sense of what you see and wonder about what makes the universe exist.
Be curious, and however difficult life may seem, there is always something you can
do, and succeed at. It matters that you do not just give up.”
(Stephen Hawking)*

*“A man who dares to waste one hour of time has not discovered the value of life.”
(Charles Darwin)*

SUMÁRIO

	Página
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tabelas.....	ix
Resumo.....	x
Abstract.....	xi
1 Introdução.....	01
2 Revisão de Literatura.....	04
2.1 <i>Bovine herpesvirus 1</i>	04
2.2 Epidemiologia da infecção pelo BoHV-1.....	08
2.3 Maturação ovocitária <i>in vitro</i>	12
2.3.1 Células do <i>cumulus</i>	14
2.3.2 Técnicas para avaliação da maturação.....	16
2.4 Fecundação e desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i>	17
3 Objetivos.....	19
3.1 Objetivos gerais.	19
3.2 Objetivos específicos.	19
4 Material e Métodos.....	20
4.1 Sinopse dos procedimentos experimentais.....	20
4.2 Locais de execução.....	21
4.3 Coleta de amostras.....	21
4.4 Processamento das amostras.....	22
4.4.1 Células e vírus	22
4.4.2 Soroneutralização.....	23
4.4.3 Aspiração dos ovócitos.....	24
4.4.4 Experimento I.....	24
4.4.5 Experimento II.....	25
4.4.6 Microscopia confocal de varredura a laser.....	26
4.5 Análises Estatísticas.....	28
5 Resultados.....	29
6 Discussão.....	34
7 Conclusão.....	37
8 Referências.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração representativa do recurso z-Stack da Microscopia confocal de varredura a laser mostrando 3 diferentes focos ópticos no eixo cartesiano z: (1) foco óptico na superfície apical do COC, (2) no interior e (3) na superfície basal do COC.	27
Figura 2 - Conjunto cromossômico apresentando configuração em metáfase II (ovócito maduro) após cultivo <i>in vitro</i> por 24 horas. Em detalhe, o cromossomo sexual indicado pela seta e o corpúsculo polar (CP) indicado pelas suas iniciais.	30
Figura 3 - Sequência de imagens z-Stack da microscopia confocal em diferentes focos (0.95µm), elucidando a presença do BoHV-1 (pontos verde-fluorescentes indicados pelas setas) no interior do ovócito desnudado e em sua zona pelúcida.	31
Figura 4 - Complexos <i>cumulus</i> -ovócito e ovócitos desnudados bovinos oriundos de animais soronegativos (a) e (d), soropositivos com titulação de 2 a 8 (b) e (e) e soropositivos com titulação ≥ 16 (c) e (f). A imagem (b) e (c) mostram a presença do BoHV-1 em COCs, caracterizada pela fluorescência verde presente nas células do <i>cumulus</i> coradas em vermelho. Barra de escala = 20µm.	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Taxa de maturação nuclear de COCs e DOs infectados experimentalmente oriundos de animais soronegativos para o BoHV-1.	29
Tabela 2 - Taxa de maturação nuclear de complexos <i>cumulus</i> ovócitos de vacas naturalmente infectadas apresentando diferentes títulos de anticorpos contra o BoHV-1.	32
Tabela 3 - Taxa de maturação nuclear de ovócitos desnudados de vacas soropositivas naturalmente infectadas apresentando diferentes títulos de anticorpos contra o BoHV-1.....	32
Tabela 4 - Imunomarcção do BoHV-1 em complexos <i>cumulus</i> -ovócito.	33

RESUMO

ALVES, Saullo Vinícius Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2018. ***Bovine herpesvirus 1 interfere na maturação in vitro de ovócitos bovinos em modelo de infecção artificial e natural.*** Orientador: Eduardo Paulino da Costa. Coorientadores: Abelardo Silva Junior, José Domingos Guimarães e Mariana Machado Neves.

O *bovine herpesvirus 1* (BoHV-1) é de fácil disseminação, difícil controle e está amplamente disseminado nos rebanhos bovinos no mundo. Essa infecção viral é responsável por prejuízos à pecuária principalmente quanto aos aspectos reprodutivos. Estudos prévios envolvendo infecção experimental com o BoHV-1 em um sistema de produção *in vitro* de embriões reportou que a presença do vírus afetou o desenvolvimento embrionário. Neste trabalho, foi avaliada a interferência do BoHV-1 sobre a maturação *in vitro* de complexos *cumulus*-ovócito (COCs) e ovócitos desnudados com células do *cumulus* em suspensão (DOs). Foram coletados sangue e os ovários de fêmeas bovinas sabidamente não vacinadas contra o BoHV-1. Após o teste de soroneutralização, os animais soropositivos foram classificados de acordo com a sua titulação de anticorpos. Os ovócitos recuperados após aspiração folicular foram divididos em COCs e DOs e avaliados através da sua capacidade de maturação nuclear associado a detecção viral pela microscopia confocal de varredura a laser. Dois experimentos foram realizados: (I) maturação após infecção *in vitro* de COCs e DOs de animais soronegativos; (II) maturação *in vitro* de COCs e DOs de animais soropositivos. No experimento I, diferença ($P < 0,01$) foi observada entre as taxas de maturação do grupo COCs controle (78,2%) e os grupos infectados dos COCs (43,6%). No experimento II verificou-se diferença ($P < 0,01$) na taxa de maturação entre os animais de titulação de anticorpos ≥ 16 (56,9%) e o grupo controle (79,4%). Os ensaios de imunofluorescência permitiram a identificação do BoHV-1 nos COCs e DOs. Diante disso, conclui-se que o BoHV-1 foi capaz de afetar o processo de maturação *in vitro* tanto nas condições de infecção *in vitro* e em condições naturais de infecção.

ABSTRACT

ALVES, Saullo Vinícius Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2018. **Bovine herpesvirus 1 can impact the bovine oocyte development during in vitro maturation.** Advisor: Eduardo Paulino da Costa. Co-advisors: Abelardo Silva Junior, José Domingos Guimarães and Mariana Machado Neves.

Bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) disseminates easily, is difficult to control, and is widely spread in cattle herds worldwide. BoHV-1 causes a broad range of losses to the cattle industry, mainly concerning reproduction. Previous studies involving experimental infection of BoHV-1 in an in vitro embryo production system have reported impairment of embryonic development by BoHV-1. In this study, we evaluated the interference of BoHV-1 in the in vitro maturation system of cumulus-oocyte complexes (COCs) and denuded oocytes (DOs) cultured with a cumulus cell suspension. Blood samples and ovaries were collected from slaughterhouse cows unvaccinated against BoHV-1. Using virus neutralization assays, the seropositive animals were classified according to their antibody titers. The oocytes were recovered by follicular aspiration and divided into two groups, COCs and DOs, which were evaluated for their nuclear maturation capacity using immunofluorescence assays by laser scanning confocal microscopy. Two experiments were carried out: (I) in vitro maturation of COCs and DOs after artificial infection of seronegative animals and (II) in vitro maturation of COCs and DOs of seropositive animals. In experiment I, a difference ($P < 0.01$) was observed between the maturation rates of the control group COCs (78.2%) and the infected COCs (43.6%). In experiment II, there was a difference ($P < 0.01$) in the maturation rate between animals with antibody titers ≥ 16 (56.9%) and the control group (79.4%). Immunofluorescence assays identified BoHV-1 in the COCs and DOs. Therefore, it was concluded that BoHV-1 affects the in vitro maturation process in both in vitro and natural infections.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil assume papel de destaque na bovinocultura quanto ao uso de biotecnologias reprodutivas, sendo responsável atualmente pela maior parcela de transferência de embriões produzidos *in vitro* a nível mundial. Nos últimos dados divulgados pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões, do ano de 2016, 275.918 embriões, ou 61,57% de todos embriões bovinos produzidos *in vitro* no mundo, foram produzidos e transferidos no país (IETS, 2018). Além disso, o país é o detentor do maior rebanho comercial de bovinos do mundo (IBGE, 2017).

Esses expressivos números são respaldados pela crescente difusão do uso das biotécnicas reprodutivas como a produção *in vitro* de embriões (PIV) e a transferência de embriões (TE). Essas biotécnicas reprodutivas, no contexto geral, têm contribuído para a redução na transmissão de patógenos. No entanto, ressalta-se que não se deve desconsiderar os riscos dessas técnicas na transmissão de agentes patogênicos (THIBIER e WRATHALL, 2012).

A infecção pelo *bovine herpesvirus 1* (BoHV-1) é de grande importância econômica, fácil disseminação e difícil controle, estando amplamente disseminada nos rebanhos bovinos de corte e de leite (NANDI et al., 2011). Os prejuízos econômicos que estão associados à infecção pelo BoHV-1 são amplos e diversos, atingindo principalmente os setores de produção e reprodução que vão desde a redução na produção de leite e repetição de estro, até abortamentos e gastos relacionados ao controle da infecção (STATHAM, 2015; SAYERS, 2017). Estima-se um gasto financeiro médio de US\$379 por vaca em decorrência dos inúmeros possíveis prejuízos causados pela infecção pelo BoHV-1 (CAN et al., 2016).

Após primo-infecção com replicação nas mucosas nasal, vaginal ou prepucial, os vírus têm a capacidade de penetrar nas terminações nervosas periféricas e migrar

via microtúbulos dos axônios para alcançar o corpo dos neurônios dos gânglios trigêmeo e sacral onde estabelecem latência, condição essa que tornam os animais portadores vitalícios e potenciais disseminadores do vírus atuando de maneira importante na manutenção de sua cadeia epidemiológica (JONES et al., 2011; FINO et al., 2012; EL MAYET et al., 2017).

A transmissão do *bovine herpesvirus 1* pode ocorrer indiretamente ou por contato direto com secreções nasais de animais infectados. Outra importante forma de transmissão é a venérea, pela monta natural e no uso das biotécnicas reprodutivas como a Inseminação Artificial, Produção *in vitro* de embriões e Transferência de Embriões, uma vez que o vírus pode estar presente nos animais doadores, em reagentes de origem animal utilizados na execução das técnicas, espermatozoides, embriões e em ovócitos (PHILPOTT, 1993; D'ANGELO, 1998; GIVENS e MARLEY, 2008; OLIVEIRA, 2014).

Os ovócitos assumem distinta classificação e capacidade para a maturação ovocitária, dentre outros, em razão da presença ou ausência das células do *cumulus* (ZHOU et al., 2016). Diferentemente do ovócito desnudado (DO), o complexo cumulus-ovócito (COC) é formado por várias camadas de células do *cumulus* que envolvem o ovócito. Essas células estabelecem íntimo contato com o ovócito por meio de junções comunicantes responsáveis pela comunicação bidirecional entre elas (KIDDER e MHAWI, 2002). Portanto, as células do *cumulus* têm fundamental importância nesse complexo processo, uma vez que são responsáveis, dentre outras, pelo transporte de nutrientes e proteção do ovócito contra ácidos graxos livres (AARDEMA et al., 2013; LOLICATO et al., 2014; AARDEMA et al., 2017; UHDE et al., 2017), além da função anabólica na produção de componentes químicos para o ovócito, como micro RNAs que atuam como reguladores de genes envolvidos

diretamente nos processos de maturação (TONG et al., 2014; GILCHRIST et al., 2016; MACAULAY et al., 2016).

De acordo com Modina et al. (2001) e Atef et al. (2005), uma ruptura prematura da comunicação bidirecional afeta o nível de competência ovocitária, o desenvolvimento folicular e a expansão das células do *cumulus* (THOMAS et al., 2004; AARDEMA et al., 2017; FU et al., 2018).

Estudos prévios já demonstraram efeitos negativos do BoHV-1 no sistema de produção *in vitro* de embriões (GUERIN et al., 1990; BIELANSKI e DUBUC, 1994; VANROOSE et al., 1999a; MAKAREVICH et al., 2007), associando-os principalmente a ações deletérias pós etapa de maturação ovocitária. No entanto, nota-se deficiência de trabalhos que demonstram efeitos negativos do BoHV-1 no processo de maturação *in vitro* de ovócitos enquanto etapa crucial na produção *in vitro* de embriões. Durante essa etapa, os ovócitos alcançam competência para suportar os subseqüentes processos de fecundação e desenvolvimento embrionário (GUERIN et al., 1990).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Bovine herpesvirus 1*

O BoHV-1 está inserido na família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e gênero *Varicellovirus*. Os vírions tem tamanho entre 120 a 300nm de diâmetro, são constituídos por um capsídeo icosaédrico, envelope glicoproteico, genoma composto de DNA linear de fita dupla e caracterizados pelo ciclo replicativo rápido com produção de progênie viral acompanhado de destruição das células infectadas após 18-20 horas. O BoHV-1 foi isolado pela primeira vez nos Estados Unidos em 1956 e desde então, vasta identificação do vírus nos rebanhos bovinos tem sido reportada por vários pesquisadores em diversos países. No Brasil, o vírus foi isolado pela primeira vez em 1978 a partir de pústulas vaginais de vacas (FRANCO e ROEHE, 2007).

O *bovine herpesvirus 1* possui um genoma de aproximadamente 137kbp, sendo subdivididos em três diferentes grupos de acordo com suas características genóticas e antigênicas: o BoHV-1.1, o BoHV-1.2a e o BoHV-1.2b. No entanto, ressalta-se que algumas peculiaridades clínicas também são encontradas com relação aos seus subtipos. Enquanto o BoHV-1.1 geralmente está associado a manifestações clínicas respiratórias da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina, popularmente conhecida como IBR, o BoHV-1.2a - subtipo mais frequentemente isolado no Brasil - tem sido constantemente relacionado também com abortamentos e acometimento dos órgãos genitais, como a Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IPV) e a Balanopostite Pustular Infecciosa (IPB). Por sua vez, o BoHV-1.2b tem sido associado com sinais respiratórios de menor gravidade e IPV/IPB, sem ainda ter sido associado a abortamentos, sendo considerado o subtipo de menor patogenicidade (MILLER et

al., 1991; SMITH et al., 1995; FRANCO e ROEHE, 2007; MUYLKENS et al., 2007).

Os membros da subfamília *Alphaherpesvirinae* podem se multiplicar por meio de dois ciclos replicativos: a infecção aguda (ciclo lítico) e a infecção latente. O ciclo lítico realizado pelo BoHV-1, por causar rompimento das células durante liberação da progênie viral – conhecido como efeito citopático, é incompatível com a sobrevivência e manutenção da integridade das células hospedeiras. Já o estabelecimento da infecção latente pelo BoHV-1, é caracterizado pela interrupção do ciclo replicativo, ou seja, a não expressão gênica logo após a penetração do genoma no núcleo celular. Esse processo é mediado por meio da supressão na expressão de genes alfa de seu genoma, uma vez que são essenciais para continuidade do ciclo, replicação do DNA viral e produção de proteínas estruturais para produção de novos vírions. Portanto, o DNA do vírus permanece no núcleo das células nervosas na sua forma episomal por toda a vida do animal. Em algumas circunstâncias, geralmente relacionadas com corticoterapia ou situações de estresse, o cortisol atua desbloqueando os genes alfa, reativando o ciclo replicativo e dando retomada a infecção produtiva (WINKLER et al., 2000; FRANCO e ROEHE, 2007).

Após replicação maciça nos sítios de replicação como nas mucosas nasal e vaginal, os vírus têm a capacidade de penetrar nas terminações nervosas periféricas e migra, via microtúbulos dos axônios para alcançar o corpo dos neurônios dos gânglios trigêmeo e/ou sacral onde estabelecem latência (JONES et al., 2011; FINO et al., 2012). Vários são os locais associados à latência do BoHV-1, principalmente, identificados via técnicas de detecção de material genético viral. Destaca-se pesquisa realizada por Henzel (2008), na qual a infecção experimental de quatro bezerras foi capaz de detectar DNA viral latente por Nested-PCR em gânglios e linfonodos.

Desse modo, a latência, por induzir nos animais a condição de portadores vitalícios e potenciais disseminadores do vírus, atua de maneira importante na cadeia epidemiológica do vírus tornando-o de fácil transmissão e difícil controle. (STRAUB, 1990; ENGELS e ACKERMANN, 1996; EL MAYET et al., 2017).

A infecção configura-se por desenvolver no animal uma ampla gama de sinais clínicos que comprometem primariamente os órgãos respiratório e reprodutivo. As manifestações clínicas da forma respiratória, conhecida como Rinotraqueíte Infecciosa Bovina, podem englobar inapetência, depressão, anorexia, dispnéia e febre. Além disso, conjuntivite, lesões erosivas na mucosa nasal e descargas nasais serosas podem resultar da infecção pelo BoHV-1. Em alguns casos, o quadro clínico do animal pode ainda evoluir a brocopneumonias associadas, muitas das vezes, ao oportunismo das infecções bacterianas secundárias (FRANCO e ROEHE, 2007).

A forma genital, por sua vez, nas fêmeas conhecida como Vulvovaginite Pustular Infecciosa manifesta-se pelo aparecimento de pequenas vesículas de 1 a 2 mm de diâmetro que evoluem para pústulas e erosões na vulva e vagina. O epitélio vulvar geralmente torna-se edemaciado, hiperêmico e com secreção, que pode tornar-se mucopurulenta devido à contaminação bacteriana secundária. Em touros, lesões similares às encontradas em vacas são encontradas no prepúcio e pênis caracterizando os quadros de Balanopostite Pustular Infecciosa (GIBBS e RWEYEMANN, 1977; WYLER et al., 1989).

Além disso, ressalta-se que os impactos negativos da infecção pelo BoHV-1 são diversos e de grande importância na bovinocultura. Um estudo envolvendo 31 rebanhos na Turquia realizado por Can et al. (2016) revelou uma diferença de produção de leite de 10% e de peso corporal de 9% quando animais soronegativos e soropositivos para o BoHV-1 foram comparados. Estimou-se ainda os gastos

financeiros que envolvem a infecção pelo *bovine herpesvirus 1*, obtendo-se os expressivos valores de U\$509 e U\$331 por animal na ocorrência de abortamento ou não, respectivamente. Levando em consideração a probabilidade da ocorrência de abortamentos, o custo médio da infecção pelo BoHV-1 por animal foi de U\$379. Em um estudo irlandês, estimou-se uma redução de 250,9 litros de leite por animal por ano de animais positivos para o BoHV-1 em comparação com vacas negativas (SAYERS, 2017).

Os prejuízos associados ao BoHV-1 envolvem perdas não somente da redução de peso e produção de leite, mas também com as desordens reprodutivas de infertilidade, gastos extras com alimentação e para controle da infecção (ATA et al., 2012; BISWAS et al., 2013; CAN et al., 2016).

2.2 Epidemiologia da infecção pelo BoHV-1

O BoHV-1 é considerado cosmopolita, ou seja, encontra-se mundialmente disseminado. A infecção pode resultar em altas taxas de morbidade, alcançando até 100%, mas com taxa de mortalidade geralmente ausente ou baixa (<5%). Além disto, de acordo com a região e principalmente o manejo reprodutivo, possui incidência bastante variada. Essa doença foi descrita pela primeira vez na Alemanha, durante o século XIX, principalmente com manifestação de vulvovaginite e balanopostite (ENGELS e ACKERMANN, 1996; FRANCO e ROEHE, 2007; GRAHAM, 2013).

Raaperi et al. (2014) apresentam dados em sua revisão de literatura de rebanhos e de animais positivos para o BoHV-1 em diversos países do mundo. Os seus dados mostram a grande diferença na incidência encontrada em cada estudo. Para rebanhos, a prevalência variou de 22 – 100%, enquanto para indivíduos, os valores giraram em torno de 12 – 77,5%.

Na maior parte dos países europeus a situação é endêmica, apresentando taxas de prevalência muito variáveis. Na Bélgica cerca de 62% dos rebanhos estão infectados e na Grã-Bretanha entre 40 a 50%. Na Irlanda, um estudo envolvendo 1,175 rebanhos bovinos de corte e leite mostrou que em 77,4% deles foi possível a identificação do BoHV-1. Na Estônia, 22% dos rebanhos são considerados infectados com o BoHV-1. Na região central do Irã, uma das áreas de maior produção leiteira do país, a soroprevalência atingiu 72% (ACKERMANN et al., 1990; RAAPERI et al., 2010; COWLEY et al., 2011; SHIRVANI et al., 2012).

Alguns estudos apresentam a pesquisa de anticorpos contra o *bovine herpesvirus 1* no leite do tanque de armazenamento como alternativa de triagem dos rebanhos trabalhados. Utilizando dessa estratégia, 80% de rebanhos leiteiros na Irlanda mostraram-se positivos para o BoHV-1 (SAYERS et al., 2015; SAYERS, 2017). Um estudo conduzido na Polônia com novilhas entre 6-12 meses de idade encontrou prevalência entre 32,2 e 36,5% com o uso de 3 diferentes métodos de detecção: Reação em Cadeia da Polimerase, Elisa BoHV-1 anticorpo e Elisa BoHV-1 antígeno. Os métodos de diagnóstico utilizados não apresentaram diferença na sensibilidade de detecção (WERNICKI et al., 2015).

Na Índia, o governo adotou medidas para identificar a presença de agentes causadores de doenças venéreas, incluso o BoHV-1. Isso foi possível a partir do rastreamento de todos touros doadores de sêmen antes de liberá-los para uso na inseminação artificial, monta natural e fecundação *in vitro* (NANDI et al., 2009). Cerca de 38,6% das amostras sorológicas de touros na Índia foram positivas (NANDI et al., 2011). Ravishankar et al. (2013) conduziram um estudo envolvendo amostras de sangue e sêmen de 65 animais, das quais 63 amostras sanguíneas (96,92%) e 40

amostras de sêmen (61,54%) foram positivas mostrando que apesar de soropositivos, nem todos os animais estavam eliminando o vírus pelo sêmen.

Na América do Norte, programas vacinais são comuns, no entanto, a infecção pelo BoHV-1 também possui caráter endêmico. No México, 564 animais oriundos de 35 rebanhos foram avaliados, obtendo-se 97% dos rebanhos e 54,4% dos animais infectados pelo BoHV-1. Já no Canadá, foram descritas taxas de prevalência de 37,8% e 59,5% de animais e de rebanhos, respectivamente (DURHAM e HASSARD, 1990; SOLIS-CALDERON et al., 2003).

Para América do Sul, no Equador Carbonero et al. (2011) apresentaram valores de 82,1% e 43,2% de prevalência para rebanhos e animais, respectivamente. Em 99% dos rebanhos e 37% dos animais de corte estudados no Uruguai detectou-se a presença do BoHV-1, enquanto na Venezuela a porcentagem de animais de corte positivos foi de 67% (OBANDO et al., 1999; GUARINO et al., 2008).

No Brasil, elevadas taxas de prevalência do BoHV-1 em rebanhos bovinos têm sido reportadas, o que revela a expressiva disseminação viral em rebanhos nacionais. Os alarmantes números apresentados em associação a inexistência de um programa de controle oficial do BoHV-1 no Brasil, evidenciam a necessidade urgente de adoção de programas de prevenção, controle e erradicação para o BoHV-1 tendo em vista o potencial desse agente em gerar significantes perdas econômicas a pecuária e ao agronegócio brasileiro.

Programas esses que associados a estratégias de imunoprofilaxia com vacinas marcadas, foram responsáveis por conduzir países como a Áustria, Dinamarca, Finlândia, Suíça, Suécia e Noruega para a condição de livres do BoHV-1 (DIAS et al., 2013; CAN et al., 2016).

Apesar de disponível comercialmente, a vacinação dos animais no Brasil não é amplamente difundida e é voluntária. Em estudo conduzido em fazendas brasileiras que realizam a vacinação para doenças reprodutivas como a IBR, Diarreia Viral Bovina (BVD) e Leptospirose, observou-se reduzidas taxas de perdas gestacionais quando comparadas àquelas que não a praticavam ou apenas imunizavam os animais contra Leptospirose. Além disso, melhores resultados quanto à taxa de prenhez foram observados em animais vacinados contra IBR e BVD (AONO et al., 2013).

Em Goiás, um estudo com 6.932 animais não vacinados, provenientes de 892 propriedades (232 municípios), foi encontrado 51,9% de soroprevalência, sendo que 98,5% das propriedades apresentaram ao menos, um animal soropositivo (BARBOSA et al., 2005). Ainda neste estado, foram testadas 343 amostras, sendo 103 de sêmen, 123 de secreção vaginal e 117 de secreção nasal. Em 18,4% das amostras foi detectado o BoHV-1, sendo 19,4% no sêmen, 23,6% na secreção vaginal e 12% na secreção nasal (SILVA, 2013). Mueller et al. (1981) encontraram 42,2% de animais reagentes no Estado de São Paulo. No Rio Grande do Sul foram descritas taxas de soropositividade de 81,7% (RAVAZZOLO et al., 1989) e 71,3 % (VIDOR et al. 1995). Lovato et al. (1995) utilizando 7.956 amostras de bovinos leiteiros provenientes de 99 municípios do Rio Grande do Sul, verificaram que 91,9% eram soropositivos. Ainda neste estado, Piovesan et al. (2013), encontraram 52,9% de soropositividade em um total de 6.092 amostras examinadas.

Em Minas Gerais, Rocha et al. (2001) observaram 58,2% de amostras soropositivas em pesquisa realizada no período de 1990 a 1999. Verificaram ainda que 93,4% dos municípios tinham animais soropositivos em seus domínios. No Paraná, um estudo envolvendo 14.803 fêmeas oriundas de 2.018 rebanhos não vacinados reportou, respectivamente, 59% e 71,3% de soropositividade para o

BoHV-1. Além disso, os pesquisadores encontraram uma maior probabilidade de rebanhos de gado de corte serem infectados em comparação com rebanhos mistos ou de gado de leite (DIAS et al., 2013).

Pesquisas de anticorpos contra o BoHV-1 em animais doadores de sêmen em centrais de inseminação de vários estados brasileiros, revelaram uma alta prevalência de 72,5% e 63,15% de animais soropositivos, podendo o sêmen estar implicado na disseminação e na epidemiologia do vírus (PITUCO, 1988; ROCHA et al., 1994). Raaperi et al. (2012) destacam que o BoHV-1 deve ser considerado como um dos fatores de risco em rebanhos que apresentam problemas de fertilidade, e que a erradicação do agente pode acarretar melhorias no desempenho reprodutivo do rebanho.

2.3 Maturação *in vitro*

Pesquisas que simulam e mimetizam a maturação *in vivo* no ambiente *in vitro* têm trazido grandes contribuições no melhor entendimento e compreensão dos processos que envolvem esse complexo evento (ALBUZ et al., 2010; GUIMARÃES et al., 2015; MATSUO et al., 2017).

A maturação ovocitária é o processo pelo qual o ovócito passa por alterações bioquímicas, estruturais e moleculares a nível nuclear e citoplasmático a fim de alcançar condições necessárias para suportar as sucessivas etapas do desenvolvimento ovocitário e embrionário. É um processo complexo que envolve, dentre outros, mudanças de configuração cromossômica, reorganização de organelas, armazenamento de mRNAs, proteínas e fatores transcricionais (FERREIRA, 2009).

Embora sejam consideradas etapas diferentes, a maturação ovocitária e citoplasmática são eventos interligados em uma perfeita harmonia envolvendo três principais agentes: o núcleo, o citoplasma e as células do *cumulus*. A maturação

ovocitária nuclear inicia-se na vida embrionária da fêmea passando pelos estádios de leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno da prófase I da meiose, havendo um bloqueio da divisão celular na fase de dictióteno ocasionado por substâncias inibitórias (OHNO e SMITH, 1964; BILODEAU-GOESEELS, 2008).

A aspiração dos ovócitos por si só pode ser considerada como estímulo suficiente para dar continuidade no processo de divisão celular, uma vez que retira o ovócito do ambiente inibitório. A adenosina 3'-5' monofosfato cíclico (cAMP) é a molécula mensageira responsável pelo rompimento da vesícula germinativa, episódio que marca o reinício da meiose I *in vivo* e *in vitro* (SU et al., 2003). A molécula sinalizadora cAMP, é um segundo mensageiro gonadotrófico que possui um papel relevante no processo de maturação ovocitária. Ela é produzida pelo ovócito, mas parte também é suprida pelas células do *cumulus* por meio das junções celulares do tipo *gap*. Altos níveis de cAMP estão relacionados a manutenção das paradas meióticas dos ovócitos (ALBUZ et al., 2010; MATSUO et al., 2017).

O processo de maturação nuclear sofre novo bloqueio na metáfase da segunda divisão meiótica (MII), o intervalo entre essas duas paradas é de aproximadamente 18-22 horas. Nova reativação da divisão meiótica ocorrerá caso haja fecundação, quando então, os ovócitos progredirão para a fase de telófase II com consequente extrusão do segundo corpúsculo polar e encerrando-se o processo de maturação (SU et al., 2003; GONÇALVES et al., 2008).

Devido a sua capacidade de causar lise nas células do *cumulus* como forma de se replicar, o BoHV-1 tem potencial de interferir nos processos celulares que envolvem a maturação ovocitária (TSUBOI et al., 1992; TSUBOI e IMADA, 1997). As células do *cumulus* tem fundamental importância nesse complexo processo de comunicação celular uma vez que são responsáveis, dentre outras, pelo transporte,

troca bidirecional de moléculas e proteção do ovócito (AARDEMA et al., 2013; LOLICATO et al., 2014; AARDEMA et al., 2017; UHDE et al., 2017).

Oliveira (2014) detectou DNA viral do BoHV-1 em amostra de complexos *cumulus*-ovócito (COCs) e fluido folicular oriundos de animais naturalmente infectados após imunossupressão. Mendes (2012) estudando a maturação *in vitro* de COCs bovinos, etapa de fundamental importância no processo de PIV de embriões, verificou que vacas infectadas naturalmente pelo vírus BoHV-1 podem apresentar comprometimento na taxa de maturação nuclear dependendo do grau de titulação de anticorpos contra o vírus.

2.3.1 Células do *cumulus*

Os gametas das fêmeas mamíferas são envoltos por diversas camadas de células da granulosa. As células da granulosa, estrutural e funcionalmente são divididas entre células da granulosa mural, localizadas na parede dos folículos e células do *cumulus* que são as que circundam o ovócito. Essas células possuem capacidade de síntese de fatores relacionados ao desenvolvimento e nutrição do ovócito. Além disso, as células do *cumulus* possuem função de proteção contra possíveis estresses causados por ácidos graxos saturados. A comunicação entre o ovócito e essas células é realizada por meio de extensões celulares citoplasmáticas que atravessam a zona pelúcida para íntimo contato com o ovócito através de junções comunicantes do tipo *gap*. Essa comunicação entre as células da granulosa e o ovócito tem impacto direto nos processos de desenvolvimento folicular, expansão das células do *cumulus* e maturação ovocitária (THOMAS et al., 2004; AARDEMA et al., 2017; FU et al., 2018).

Vale ressaltar a relevância da função anabólica das células do *cumulus* na produção de componentes químicos para o ovócito, como por exemplo, os micros

RNAs que atuam como reguladores de genes envolvidos diretamente nos processos de maturação (TONG et al., 2014; GILCHRIST et al., 2016; MACAULAY et al., 2016). Adicionalmente, fatores inibidores e indutores da meiose estão relacionados com o controle da maturação através da comunicação das células do *cumulus* com o ovócito mediada pelas junções *gap* (MAHMOUDI et al., 2005).

Inúmeros são os trabalhos que reportam a relevância desse contato e comunicação entre as células realizadas através de junções *gap*, relatando comprometimento durante as etapas do cultivo *in vitro* de ovócitos quando moduladores e inibidores da função dessas junções são utilizados (ATEF et al., 2005; SANTIQUET et al., 2012; SUN et al., 2015; ZHOU et al., 2016).

Estudos mais recentes têm sido realizados envolvendo a pesquisa de biomarcadores celulares relacionados ao desenvolvimento dos ovócitos. Para tal, as células do *cumulus* são sempre alvo das pesquisas na busca por métodos confiáveis e não invasivos que possam revelar a competência ovocitária, tendo-se em vista uma melhor acuidade na avaliação o que representaria melhorias nos sistemas de produção *in vitro* de embriões. Marcadores como as catepsinas B, S, K e Z e transcritos avaliando expressão gênica são estudados como potenciais candidatos para tais avaliações, e estão, via de regra, direta ou indiretamente relacionados com as células do *cumulus* e as junções *gap* o que ratifica a sua relevância durante o cultivo *in vitro* (BETTEGOWDA et al., 2008; KUSSANO et al., 2016; WARZYCH et al., 2016).

As junções comunicantes do tipo *gap* estão também associadas a retomada da meiose na maturação *in vitro* tendo em vista a comunicação bidirecional entre as células do *cumulus* e o ovócito (FU et al., 2018). O trabalho de revisão realizado por Russell et al. (2016) relata a relevância dessa comunicação na transferência de íons,

pequenas moléculas (nucleotídeos, aminoácidos, pequenos carboidratos) e principalmente, a adenosina 3'-5' monofosfato cíclico (cAMP) e a guanosina monofosfato cíclico (cGMP) que fundamentam o processo de retomada da Meiose I na maturação ovocitária.

2.3.2 Técnicas para avaliação da maturação

A maturação *in vitro* é o ponto de partida para inúmeras aplicações das biotécnicas reprodutivas como a fecundação *in vitro*, produção *in vitro* de embriões, produção de animais transgênicos e clones tendo efeitos diretos nessas etapas que a sucedem. A configuração cromossômica em Metáfase II, a extrusão do primeiro corpúsculo polar, a expansão das células do *cumulus* e a organização citoplasmática de organelas têm sido utilizadas por diversos pesquisadores como parâmetros na avaliação desse complexo processo que envolve o sincronismo entre a maturação nuclear e citoplasmática (KAKKASSERY et al., 2010; PALAZZI et al., 2012; GIOTTO et al., 2015; SPRICIGO et al., 2015; TAWATAO et al., 2015).

Alguns pesquisadores utilizam da técnica de avaliação da extrusão do corpúsculo polar como preditora da taxa de maturação dos ovócitos, outros contraindicam o seu uso devido a sua sensibilidade reduzida já que após a formação do corpúsculo polar (19 horas) sua visualização pode tornar-se dificultada devido a sua degeneração (HYTTEL et al., 1989; COSTA et al., 1997b).

Em consonância com essas observações, um estudo realizado por Kakkassery et al. (2010) observou taxas de extrusão do corpúsculo polar sensivelmente reduzidas se comparadas com aquelas observadas para a configuração cromossômica em Metáfase II. Para ovócitos com 5 ou mais camadas de células do *cumulus* os autores apresentaram taxas entorno de 42,1-45,5% e 78,9-81,8% para avaliação da extrusão do corpúsculo polar e da configuração cromossômica em Metáfase II,

respectivamente. Ovócitos em metáfase II sem a presença de corpúsculo polar, podem acabar sendo desconsiderados como maduros utilizando-se somente essa última técnica como método de avaliação, como observado por Akufo et al. (1988).

Respeitando, portanto, as peculiaridades de cada uma dessas técnicas de predição da taxa de maturação, a avaliação da configuração cromossômica em Metáfase II apresenta-se como a de melhor consolidação no meio científico, sendo as técnicas de expansão das células do *cumulus*, extrusão do corpúsculo polar e as para avaliação da maturação citoplasmática consideradas como de suporte.

2.4 Fecundação e desenvolvimento embrionário *in vitro*

O BoHV-1 tem sido associado à transmissão viral através de embriões produzidos *in vitro* devido a sua possível presença no ovócito, tecidos reprodutivos, sêmen, meios de cultura (soro fetal bovino, albumina sérica bovina), assim como materiais e equipamentos de coleta e cultivo de embriões (WRATHALL et al., 2006; OLIVEIRA, 2007). Várias pesquisas reportam efeitos negativos do BoHV-1 no sistema de PIV de embriões. A reduzida proporção de desenvolvimento de blastocistos viáveis foi descrita por Guérin et al. (1990), Bielanski e Dubuc (1994), Vanroose et al. (1999a) e Makarevich et al. (2007).

Makarevich et al. (2007) observou também comprometimento no desenvolvimento embrionário pré-implantação após exposição ao BoHV-1. A zona pelúcida, estrutura porosa composta por glicoproteínas que recobre os ovócitos e embriões durante parte de seu desenvolvimento, tem sido alvo de estudos implicados na proteção efetiva ou ineficaz contra a ação do BoHV-1. Segundo Guérin et al. (1997) o risco sanitário de embriões PIV pela exposição a patógenos é maior para embriões produzidos *in vitro* do que *in vivo*, uma vez que diferenças na zona pelúcida (ZP) nesses sistemas permitem mais facilmente a adsorção de patógenos.

Estudos mostram que o vírus pode ser capaz de alcançar a membrana celular do embrião na ausência da ZP ou pela passagem através da mesma (SPEAR, 2004). Segundo Miller et al. (1991), Bielanski et al. (1997) e Vanroose et al. (1998), em qualquer fase da gestação o vírus pode ser capaz de comprometer o desenvolvimento embrionário e do feto. Vanroose et al. (2000) simulando o tamanho do BoHV-1 com o uso de microesferas, afirmaram que partículas com tamanho aproximado de 180–200nm podem atravessar parte da ZP, chegando a camadas mais internas, no entanto não conseguiriam atravessá-la totalmente. Esse mesmo autor, ressalta ainda que o vírus pode aderir a zona pelúcida e infectar o embrião no momento da fecundação, momento esse considerado de instabilidade da zona pelúcida.

Na estrutura da ZP de zigotos fecundados, foi observado por Vanroose et al. (2000) a formação de escavações e fissuras com as dimensões da cabeça espermática, podendo proporcionar um ponto de entrada para o vírus no momento da fecundação. Nesses locais, o vírus estaria protegido contra eventuais medidas sanitárias, como por exemplo, lavagens com a tripsina, tratamento preconizado pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS). Outro momento no qual os embriões bovinos podem ser considerados susceptíveis a infecção pelo BoHV-1 é a partir da fase de blastocisto, quando já se inicia o processo de degeneração da zona pelúcida. Segundo Bowen (1985) e Bielanski et al. (1987), embriões sem a ZP permitiriam a replicação viral. A ação viral nessa fase simularia a infecção *in vivo* no ambiente uterino.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a capacidade de maturação ovocitária face a presença e localização de partículas virais do BoHV-1 nos complexos *cumulus*-ovócito e ovócitos desnudados.

3.2 Específicos

Detectar e localizar partículas virais em complexos *cumulus*-ovócito e ovócitos desnudados infectados naturalmente e *in vitro* por meio da microscopia confocal de varredura a laser.

Avaliar a capacidade de maturação nuclear dos complexos *cumulus*-ovócito e ovócitos desnudados infectados *in vitro* oriundos de animais soronegativos.

Estudar possível relação existente entre a taxa de maturação nuclear ovocitária e a titulação de anticorpos neutralizantes de animais soropositivos naturalmente infectados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento experimental envolveu a manipulação de gametas femininos bovinos simulando o cenário de uma importante etapa da produção *in vitro* de embriões, a maturação *in vitro* na ausência ou presença das células do *cumulus* aderidas aos ovócitos de fêmeas bovinas soronegativas e soropositivas para o BoHV-1.

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, com autorização do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa, sob protocolo número 25/2018.

4.1 Sinopse dos procedimentos experimentais

No abatedouro frigorífico foram obtidos ovários e amostras de sangue de fêmeas bovinas. Essas amostras foram devidamente identificadas e acondicionados à 37°C, até serem processados no Laboratório de Maturação Ovocitária e Fecundação *in vitro*. As amostras de sangue foram utilizadas para a realização da Soroneutralização, cujos procedimentos serão detalhados em itens posteriores. Esse primeiro procedimento visou realizar a triagem dos animais em soronegativos e soropositivos, bem como a quantificação de anticorpos neutralizantes anti-BoHV-1 em animais soropositivos. Já os ovários, foram aspirados para recuperação dos ovócitos que posteriormente, parte foram desnudados e logo em seguida maturados em estufa de CO₂ a 5% e 38,5°C por 24 horas para obter a taxa de maturação.

O experimento foi dividido em duas etapas: I - Ovócitos oriundos de fêmeas soronegativas (infecção *in vitro*) e II - Ovócitos oriundos de fêmeas soropositivas. Além do estudo do desenvolvimento ovocitário por meio da avaliação da taxa de maturação nuclear, os ovócitos foram processados para microscopia confocal de

varredura a laser na busca pela identificação e localização de partículas virais do BoHV-1.

4.2. Locais de execução

Os procedimentos laboratoriais foram realizados na Universidade Federal de Viçosa (UFV). Foram utilizadas as estruturas dos Laboratórios de Maturação Ovocitária e Fecundação *in vitro* (MOFIV) e de Virologia Animal (LVA), pertencentes ao Departamento de Veterinária (DVT) e o Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM).

4.3. Coleta das amostras

As amostras experimentais foram coletadas no Frigorífico Sabor de Minas, localizado no município de Muriaé, distante 80 quilômetros da UFV. Foram utilizadas amostras de sangue e ovários de fêmeas bovinas destinadas ao abate, provenientes de rebanhos sabidamente não vacinados contra o BoHV-1, a fim de evitar a interferência da vacinação nos resultados do teste sorológico. Logo após a insensibilização, durante a etapa de sangria foram coletadas amostras de sangue de cada animal, utilizando-se de tubos de ensaio, os quais foram identificados e acondicionados em caixa térmica. Já na etapa de evisceração, foram coletados os ovários dos respectivos animais, sendo identificados mantendo-se a ordem estabelecida na coleta de sangue e acondicionados individualmente em solução fisiológica acrescida de gentamicina a 4%. Esta solução foi mantida à temperatura de 37°C, por meio de caixa térmica, durante o transporte até o laboratório.

4.4. Processamentos das amostras

No laboratório de Maturação Ovocitária e Fecundação *in vitro*, foram realizadas as etapas iniciais para a realização da soroneutralização. As amostras sanguíneas foram colocadas em banho-maria à 37°C por 15 minutos e, em seguida, centrifugadas a 860G por cinco minutos para facilitar a separação do soro que, logo após, foi transferido para microtubos. As amostras de soro foram inativadas à 56°C por 30 minutos antes de serem remetidas ao Laboratório de Virologia Animal para realização da soroneutralização em microplacas.

4.4.1 Células e vírus

Amostras do BoHV-1 da cepa viral "Los Angeles" (LA) foram cultivadas em monocamadas de células de rim bovino Madin-Darby (MDBK). As células foram multiplicadas e mantidas a 37°C e 5% de CO₂ em estufa por um período de 60 minutos utilizando meio essencial mínimo (MEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) acrescido de estreptomicina 0,4 mg/L (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e 1,6 mg/L de penicilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e suplementada com 10% de soro bovino fetal (FBS, Gibco-BRL, Grand Island, EUA).

Em seguida três eventos de congelamento e descongelamento da garrafa de cultivo foram realizados no freezer a -20 °C. O conteúdo foi posteriormente aliquotado em criotubos e armazenados a -80 °C para verificação do título viral de acordo com Reed e Muench (1938). Após isso, procedeu-se diluições para que o vírus alcançasse a titulação utilizada de 10^{4.3} TCID₅₀/mL.

4.4.2 Soroneutralização

O teste para o diagnóstico sorológico foi realizado por meio da prova de soroneutralização em microplacas, de acordo com metodologia proposta por House e Baker (1971).

Os testes de soroneutralização (SN) foram realizados em microplacas de 96 cavidades (CORNING COSTAR®). A primeira coluna de cada microplaca foi constituída do controle de células, não recebendo soro nem suspensão viral, sendo substituído por 100µL de Meio Essencial Mínimo (MEM) livre de soro fetal bovino. Na segunda coluna foi realizado o controle de toxicidade do soro. Esta coluna recebeu a suspensão celular e soro não diluído. A diluição do soro deu-se entre as colunas 3 e 12 da microplaca utilizando-se diluições na base dois do soro, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 e 1:128. Dessa forma, cada diluição do soro ocupará uma coluna da microplaca (8 cavidades) em ordem decrescente de concentração.

Posteriormente às diluições, cada cavidade recebeu uma amostra de 50µL do vírus, contendo 100 TCID₅₀ do isolado BoHV-1 Los Angeles, com exceção das colunas 1 e 2. Após incubação da mistura soro-vírus por 12h a 37°C, em estufa de CO₂ uma suspensão de células de rim bovino MDBK (Mardin-Darby Bovine Kidney) de 50 µL na concentração de 300.000 células/mL foi adicionada e seguida de incubação em estufa de CO₂ a 37°C.

A leitura dos testes foi realizada após 72h de incubação, através do monitoramento do efeito citopático. Foram considerados os títulos de anticorpos neutralizantes as maiores diluições do soro capazes de inibir a replicação viral e consequente produção de efeito citopático. Para análise estatística, os dados foram agrupados obedecendo a seguinte classificação dos animais com base na titulação de anticorpos: animais soronegativos, título de 2 a 8 e título ≥ 16 . Cada soro foi testado

em duplicata e a medida de anticorpos neutralizantes foi calculada pela média aritmética das repetições.

4.4.3 Aspiração dos ovócitos

Os folículos ovarianos de 2 a 6mm presentes nos ovários de cada animal foram puncionados com auxílio de agulhas descartáveis de 25 x 7mm acoplados a seringas de 3mL. O líquido aspirado foi depositado em microtubos identificados para sedimentação dos complexos *cumulus*-ovócito. Após cinco minutos de sedimentação, o sobrenadante foi descartado e o restante vertido em placa de Petri contendo meio Talp-Hepes. Os complexos *cumulus*-ovócitos foram rastreados e aqueles recuperados foram transferidos para placas escavadas de 9 poços e avaliados em microscópio estereoscópio com aumento final de 50x. Então, os ovócitos foram classificados morfológicamente, de acordo com Costa et al. (1997a). A avaliação foi realizada individualmente para cada animal.

Após a classificação, foram selecionados somente os ovócitos com a presença de *cumulus* compacto e citoplasma homogêneo. A metade dos ovócitos selecionados de cada animal foi desnudado conforme procedimentos descritos por Costa et al. (1997a) e incubados com a presença de células do *cumulus* em suspensão. A outra metade não foi desnudada. Duas fases experimentais foram distintas de acordo com os resultados do teste de soroneutralização.

4.4.4 Experimento I – Ovócitos oriundos de fêmeas soronegativas (infecção *in vitro*)

Nessa fase, os COCs e os ovócitos desnudados (DOs) com células do *cumulus* em suspensão foram incubados com vírus. Foram obtidos 853 ovócitos oriundos de 59 vacas soronegativas, 531 ovócitos foram avaliados quanto a taxa de maturação nuclear e 322 para a identificação viral por meio da imunofluorescência.

Para a infecção experimental com o vírus, os ovócitos foram transferidos para microgotas de 100 μ L de meio de maturação (COSTA, 1994), contendo 10 μ L do vírus BoHV-1 no título de 10^{4.3} TCID₅₀/mL (SILVA-FRADE et al., 2010). As estruturas permaneceram incubadas com o vírus durante todo o período de maturação por 24 horas a 38,5°C em 5% de CO₂. Após isso, parte dos COCs e DOs de cada um dos quatro tratamentos (COCs BoHV-1 +, COCs BoHV-1 -, DOs BoHV-1 + e DOs BoHV-1 -) foram separados e processados para avaliação da taxa de maturação nuclear, o restante foi processado para os ensaios de imunofluorescência. O grupo controle foi formado por COCs e DOs que não expostos ao BoHV-1.

4.4.5 Experimento II – Ovócitos oriundos de fêmeas soropositivas infectadas naturalmente

Amostras foram obtidas de 78 vacas das quais 796 ovócitos foram recuperados para avaliação. Do montante, 557 ovócitos foram avaliados quanto à maturação nuclear, sendo 313 COCs e 244 DOs, o restante foi processado para imunofluorescência. Como controle, os resultados de taxa de maturação foram comparados com aqueles encontrados em COCs e DOs oriundos de animais soronegativos.

Para tal, os ovócitos foram incubados conforme descrito no experimento I. Posteriormente, os COCs e DOs foram avaliados individualmente por animal e, em seguida, os dados foram agrupados de acordo com a titulação de anticorpos: titulação <2, título de 2 a 8 e título \geq 16.

4.4.6 Microscopia Confocal de Varredura a Laser

Após maturação *in vitro*, os COCs e DOs foram processados para testes de imunofluorescência de acordo com Queiroz-Castro et al. (2018). Inicialmente, foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e ácido pícrico a 0,4% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em tampão fosfato de sódio a 0,1M e pH 7,2 por período de uma hora e armazenados em solução tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 a 4°C.

Após lavagens sucessivas para remoção do excesso do fixador, os ovócitos fixados foram transferidos para PBS contendo Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 1% por uma hora. Em seguida, os COCs e DOs foram incubados com anticorpo primário monoclonal, isotipo IgG2b, específico para a glicoproteína gC do BoHV-1 (VMRD, NW, Washington, USA) na diluição de 1:100 em PBS durante 12 horas.

Então, os ovócitos foram lavados em PBS e incubados com o anticorpo secundário anti-IgG conjugado com isotiocianato de fluoresceína – FITC (490nm – excitação; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) na diluição de 1:200 por uma noite. Após novas lavagens, os ovócitos foram incubados com o corante de ácido nucléico TO-PRO™ - 3 Iodide (642nm – excitação; Waltham, Massachusetts, USA) durante 30 minutos.

Por fim, as amostras foram montadas em lâminas contendo Mowiol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e analisadas em microscópio confocal de varredura a laser Zeiss 510 META. O controle negativo da técnica para cada tratamento foi submetido ao mesmo protocolo, porém com a omissão da incubação com o anticorpo primário monoclonal. Para imunofluorescência do FITC foi utilizado o laser Argônio (488nm - excitação), produzindo fluorescência de cor verde e para o TO-PRO™ - 3

Iodide foi utilizado o laser HeNe (633nm - excitação), resultando na coloração vermelho.

Para uma análise mais detalhada dos COCs e DOs, a ferramenta de z-Stack da microscopia confocal foi utilizada. Ela permite a confecção de imagens sequenciais com diferentes focos ópticos no sentido do eixo cartesiano z, o que possibilita a interpretação de imagens em três dimensões, como representado no esquema da Figura 1.

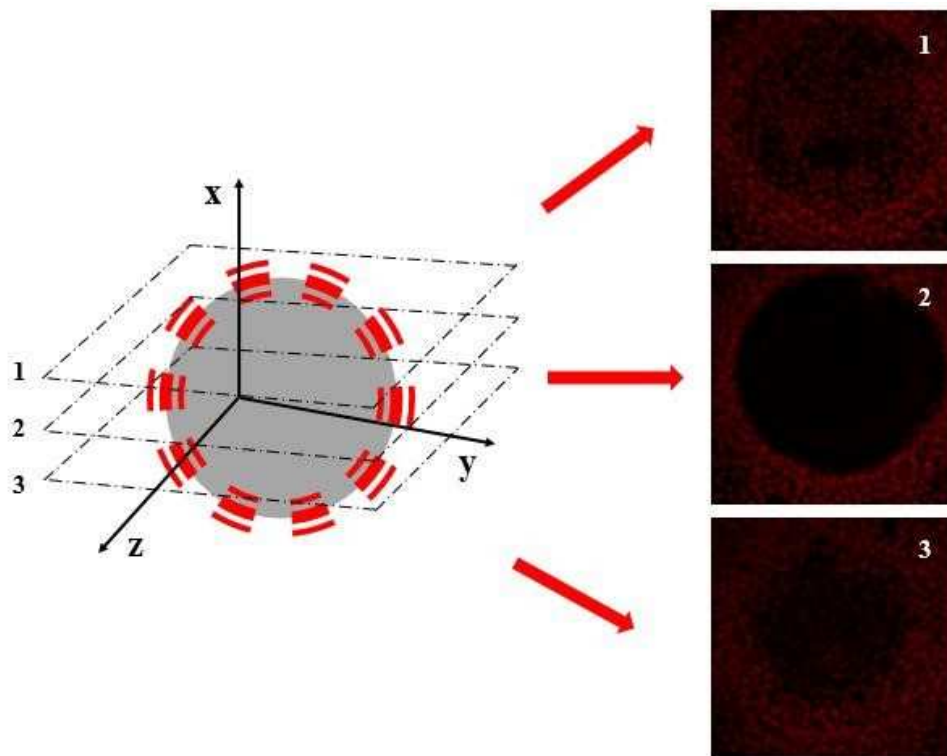


Figura 1 – Ilustração representativa do recurso z-Stack da Microscopia confocal de varredura a laser mostrando 3 diferentes focos ópticos no eixo cartesiano z: (1) foco óptico na superfície apical do COC, (2) no interior e (3) na superfície basal do COC.

4.5. Análises estatísticas

Para as duas etapas experimentais definidas nesse trabalho, a variável qualitativa dicotômica (presença ou ausência de configuração cromossômica compatível com Metáfase II) foi comparada em tabelas de contingência e analisada pelo teste de qui-quadrado, a 5% de probabilidade, conforme descrito por Sampaio (2002)

Estatística descritiva foi utilizada para apresentação e discussão dos dados referentes aos ensaios de imunofluorescência por meio da microscopia confocal de varredura a laser.

5. RESULTADOS

Experimento I

A tabela 1 apresenta o resultado das avaliações dos ovócitos que alcançaram a maturação, apresentando configuração cromossômica em Metáfase II (Figura 2). Observou-se diferença ($P < 0,01$) entre as taxas de maturação do tratamento COCs controle e os demais grupos. No entanto, taxas de maturação dos grupos DOs mostrou-se ser independente da infecção viral, não havendo diferença ($P > 0,05$) entre o grupo infectado e não infectado.

Tabela 1 – Taxa de maturação nuclear de COCs e DOs infectados experimentalmente oriundos de animais soronegativos para o BoHV-1.

TRATAMENTO	Ovócitos avaliados		Metáfase II
	N	N	%
COCs BoHV1-	165	129	78,2 ^a
COCs BoHV1+	156	68	43,6 ^b
DOs BoHV1-	115	36	31,3 ^{b,c}
DOs BoHV1+	95	21	22,1 ^c

Porcentagens sobrescritas com letras diferentes entre os tratamentos indicam diferença ($P < 0,01$) pelo teste do qui-quadrado.

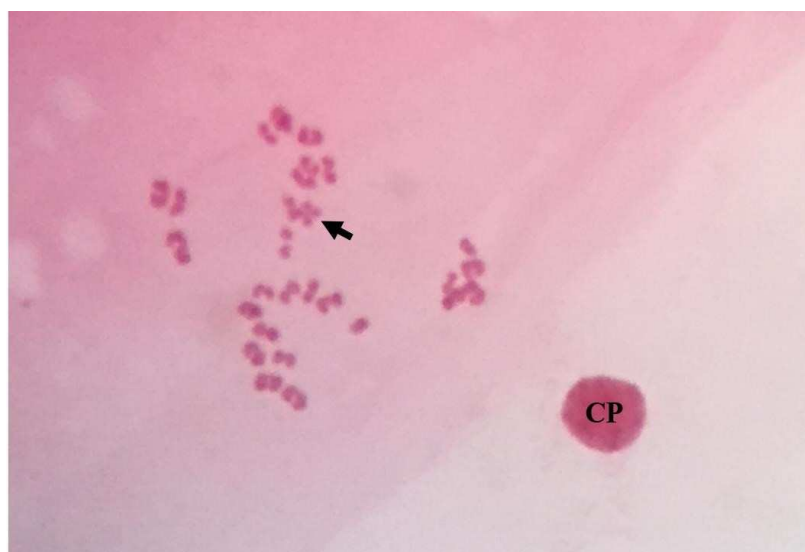


Figura 2 – Conjunto cromossômico apresentando configuração em metáfase II (ovócito maduro) após maturação *in vitro*. Em detalhe, o cromossomo sexual indicado pela seta e o corpúsculo polar (CP) indicado pelas suas iniciais.

Para os ensaios de imunofluorescência, em nenhum dos 92 COCs e 59 DOs oriundos dos tratamentos onde houve a omissão da infecção viral foi identificado a partícula viral. Já para os tratamentos onde foram realizadas a infecção experimental, em 100% dos 106 COCs e dos 65 DOs foi possível a identificação do BoHV-1 distribuído nas células do *cumulus*, na zona pelúcida e no interior dos ovócitos (Figura 3).

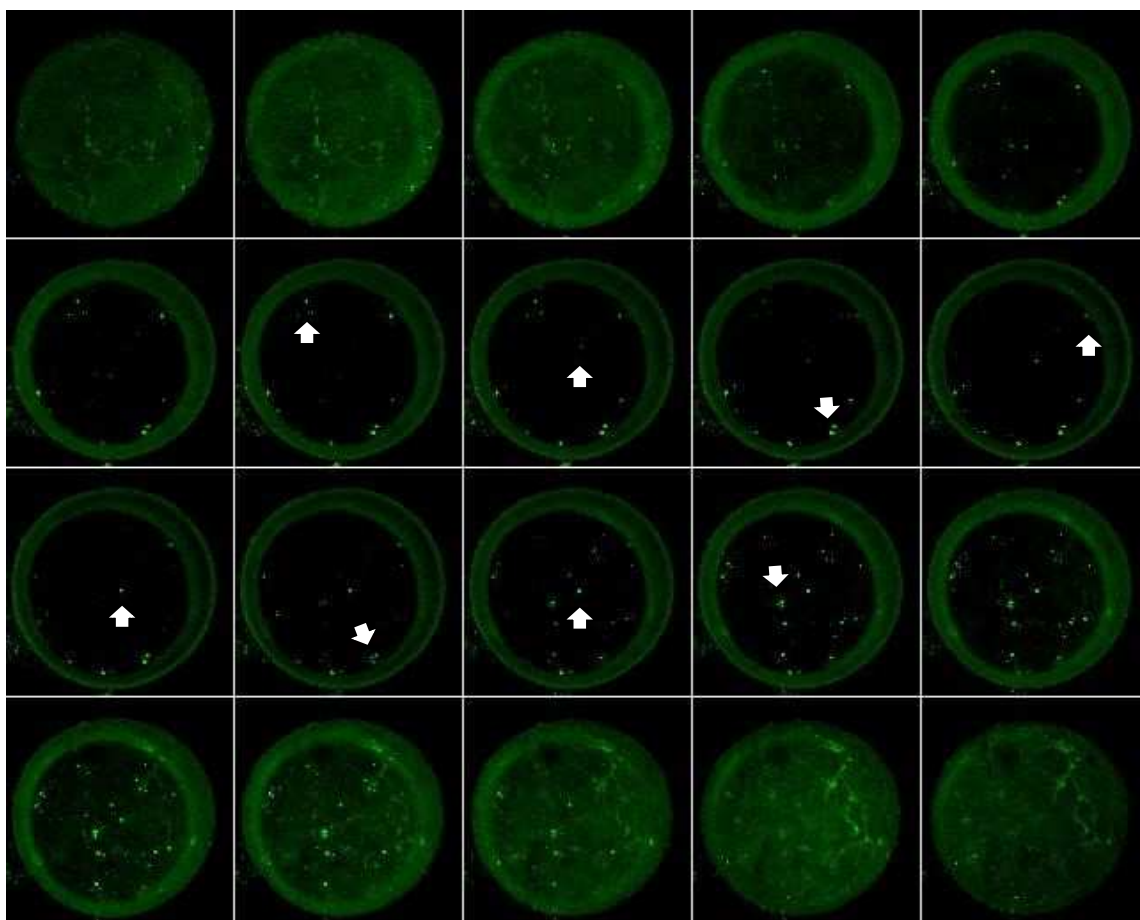


Figura 3 – Sequência de imagens z-Stack da microscopia confocal em diferentes focos ($0.95\mu\text{m}$), elucidando a presença do BoHV-1 (pontos verde-fluorescentes indicados pelas setas) no interior do ovócito desnudado e em sua zona pelúcida.

Experimento II

A porcentagem de fêmeas positivas para o BoHV-1 no teste de soroneutralização foi de 57,7% (45/78). Verificou-se diferença na taxa de maturação ($P < 0,01$) entre os animais de título ≥ 16 (56,9%) e o grupo negativo (79,4%). Não foi identificado diferença na taxa de maturação entre o grupo controle (< 2) e os animais de título de 2 a 8 (Tabela 2). Considerando os DOs de animais infectados naturalmente não houve diferença ($P > 0,05$) entre as classificações quanto ao título de anticorpos (Tabela 3).

Tabela 2 – Taxa de maturação nuclear de complexos *cumulus* ovócitos de vacas naturalmente infectadas apresentando diferentes títulos de anticorpos contra o BoHV-1.

CLASSIFICAÇÃO	Vacas	COCs avaliados	COCs em Metáfase II	
	N	N	N	%
Soronegativo (<2)	33	107	85	79,4 ^a
Título de 2 to 8	22	90	62	68,9 ^{a, b}
Título ≥16	23	116	66	56,9 ^b

Porcentagens sobrescritas com letras diferentes entre os tratamentos indicam diferença (P<0,01) pelo teste do qui-quadrado.

Tabela 3 – Taxa de maturação nuclear de ovócitos desnudados de vacas soropositivas naturalmente infectadas apresentando diferentes títulos de anticorpos contra o BoHV-1.

CLASSIFICAÇÃO	Vacas	COCs avaliados	COCs em Metáfase II	
	N	N	N	%
Soronegativo (<2)	33	96	29	30,2*
Título de 2 to 8	22	69	19	27,5*
Título ≥16	23	79	17	21,5*

* Não houve diferenças entre tratamentos (P>0,05) pelo teste do qui-quadrado

Para os ensaios de imunofluorescência, em nenhuma amostra de COCs e DOs oriundos dos animais soronegativos foi possível a identificação do BoHV-1. No entanto, observou-se diferença (P<0,05) na identificação do BoHV-1 em COCs oriundos de animais de título de 2 a 8 e título ≥ 16, como mostrado na Tabela 4. Em nenhum dos DOs foi possível a identificação do BoHV-1, independentemente se oriundos de animais de título entre 2 e 8 (n=42) ou de título ≥ 16 (n=38). As imagens obtidas então representadas na Figura 4.

Tabela 4 – Imunomarcação do BoHV-1 em complexos *cumulus*-ovócito.

CLASSIFICAÇÃO	Vacas	COCs avaliados	Identificação do BoHV-1	
	N	N	N	%
Soronegativo (<2)	33	46	-	-
Título de 2 a 8	22	41	07	17,07 ^a
Título ≥ 16	23	37	15	40,54 ^b

Porcentagens sobrescritas com letras diferentes indicam diferença ($P < 0,01$) pelo teste do qui-quadrado.

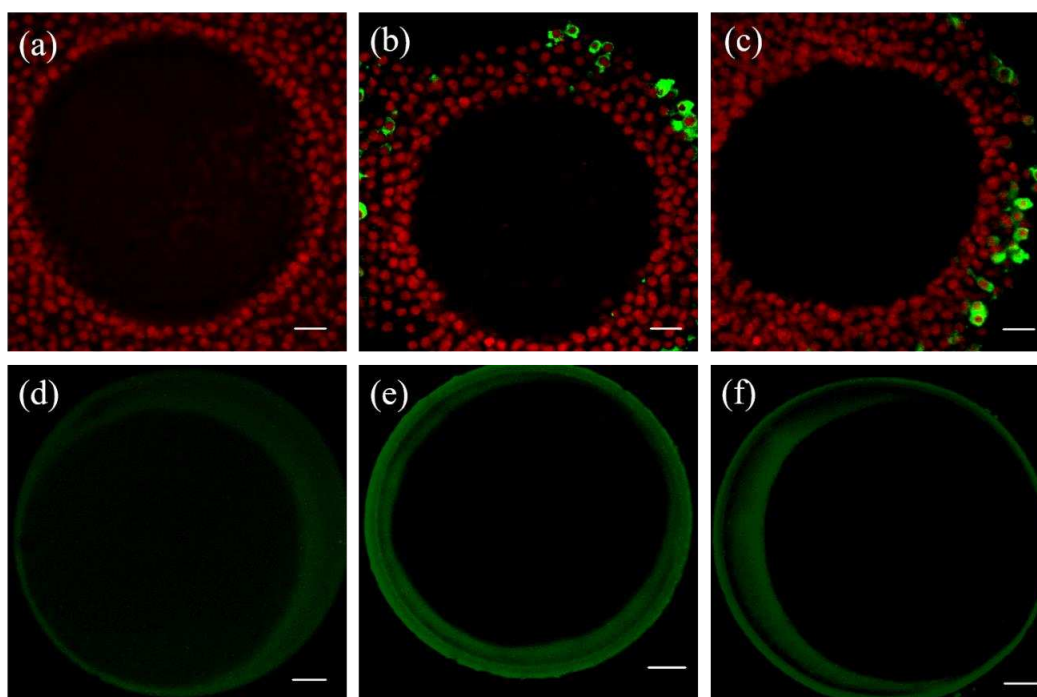


Figura 4 – Complexos *cumulus*-ovócito e ovócitos desnudados bovinos oriundos de animais soronegativos (a) e (d), soropositivos com titulação de 2 a 8 (b) e (e) e soropositivos com titulação ≥ 16 (c) e (f). A imagem (b) e (c) mostram a presença do BoHV-1 em COCs, caracterizada pela fluorescência verde presente nas células do *cumulus* coradas em vermelho. Barra de escala = 20 μ m

6. DISCUSSÃO

Nesse estudo, foi observado comprometimento na taxa de maturação nuclear de COCs e DOs nos modelos *in vitro* e *in vivo*, experimento I e II, respectivamente. Os COCs quando comparados tanto nos modelos *in vitro* quanto *in vivo*, apresentaram menores taxas de maturação em relação aos respectivos grupos controle negativos. O que demonstra interferência do BoHV-1 na eficiência reprodutiva da fêmea bovina. Adicionalmente, a imunomarcação evidenciou o BoHV-1 nas células do *cumulus* dos COCs nos dois modelos de infecção.

Um estudo recente realizado por Queiroz-Castro et al. (2018) reportou a detecção do BoHV-1 no citoplasma das células do *cumulus* de COCs provenientes de vacas naturalmente infectadas, o que está de acordo com os achados desse trabalho uma vez que, por meio da mesma técnica foi evidenciado o BoHV-1 nas células do *cumulus* de vacas soropositivas.

No modelo de infecção *in vitro*, houve redução da taxa de maturação entre os COCs expostos ao vírus em comparação com o grupo controle, evidenciando que o BoHV-1 foi capaz de comprometer a capacidade de desenvolvimento ovocitária, o que se deve a replicação viral nas células do *cumulus* acarretando lise celular conhecida como efeito citopático (TSUBOI E IMADA, 1997; VANROOSE, et al., 1999b). Desta forma, ocorre redução no número de células do *cumulus* viáveis e aptas a suportar com eficiência o processo de maturação ovocitária, esclarecendo o comprometimento na taxa de maturação nuclear dos ovócitos infectados. No entanto, esse efeito não foi observado nos DOs expostos quando comparados ao seu controle, fato esse relacionado à ausência das células do *cumulus*. Estes achados reforçam a importância da presença das células do *cumulus*, já que os COCs apresentaram melhores resultados em relação aos DOs e sobretudo, os COCs infectados se

mostraram comprometidos pela presença do BoHV-1 revelando taxas de maturação nuclear inferiores ao controle (sem a presença do BoHV-1).

A identificação do BoHV-1 em 17,07% e 40,54% de COCs oriundos de animais soropositivos de titulação entre 2 a 8 e título ≥ 16 (Figura 4), respectivamente, nos remete a uma possível maior contribuição das fêmeas que apresentam maiores títulos de anticorpos as falhas reprodutivas. A maior porcentagem de detecção no ovócito pode estar relacionada a maior carga viral neste tecido, o que conseqüentemente causa maior estimulação antigênica e maiores títulos de anticorpos. Desta forma, animais oriundos da categoria de vacas com títulos de anticorpos maiores podem justificar os problemas reprodutivos comumente associados ao BoHV1 como a repetição de cio (STATHAM, 2015; SAYERS, 2017).

A redução observada na taxa de maturação nuclear de DOs em comparação aos COCs tanto na infecção experimental quanto em animais soropositivos pode ser justificada devido ao comprometimento na comunicação bilateral entre o ovócito e as células do *cumulus*. Nesse sentido, foi observado que os DOs não diferiram ($P > 0,05$) entre o grupo infectado e o controle e nem mesmo entre os modelos de infecção artificial e natural. Esses achados reforçam que as células do *cumulus* desempenham papel fundamental no processo de competência ovocitária (DIELEMAN et al., 2002; TANGHE et al., 2002; KIMURA et al., 2007). Por meio de junções comunicantes, as células do *cumulus* transferem sinais moleculares específicos ao ovócito coordenando sua maturação (GILCHRIST et al., 2004). Os resultados encontrados no presente experimento corroboram aqueles apresentados por Raghu et al. (2002) que observou redução no desenvolvimento de competência ovocitária após remoção das células do *cumulus*. Em consonância com o presente trabalho, várias pesquisas dissertam sobre a essencialidade das junções gap para obtenção de um processo de

maturação harmônico (ATEF et al., 2005; SANTQUET et al., 2012; SUN et al., 2015; ZHOU et al., 2016).

Por meio da imunomarcção foi observado a presena do BoHV-1 nas clulas do *cumulus*, na zona pelúcida e no interior de ovócitos co-incubados com o vírus durante o período de maturação (Figura 3). Esses achados corroboram os achados de Queiroz-Castro et al. (2018) (manuscrito em submissão) os quais ressaltam que a zona pelúcida intacta de ovócitos bovinos não foi capaz de prevenir a entrada do BoHV-1 no ovócito. Desta forma, a marcação do BoHV-1 nas clulas do *cumulus* confirma a replicação do vírus nessas clulas levando ao comprometimento da maturação nuclear ovocitária observada.

A observação do BoHV-1 aderido à zona pelúcida após período de maturação, pode propiciar sua penetração no ovócito no momento da fertilização (BOWEN, 1979). Além disso, o vírus pode infectar o embrião quando o mesmo já não está mais sob a proteção da zona pelúcida, além de também poder infectar a receptora se o embrião for transferido juntamente com o BoHV-1 aderido (BIELANSKI, 2006; PONSART e POZZI, 2013). A capacidade de aderência viral do BoHV1 a zona pelúcida mesmo após lavagens com tripsina preconizadas pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) foi apresentada por vários trabalhos (TSUBOI et al., 1992; BIELANSKI et al., 1997; STRINGFELLOW e GIVENS et al., 2000; D'ANGELO et al., 2009).

Vale enfatizar que o ovócito contendo o BoHV-1 aderido à zona pelúcida também torna possível a infecção de clulas epiteliais da tuba uterina pelo vírus devido à sua natureza epiteliotrópica (BABIUK et al., 1996) resultando na lise celular dessas clulas. Embriões sem sinal de infecção nas clulas embrionárias não se desenvolveram devido a alteração no ambiente tubárico resultante da infecção das

células (VANROOSE et al., 1999b). A secreção da tuba uterina contém moléculas capazes de modular as funções e a interação dos gametas, e os fatores de crescimento presentes no ambiente tubárico estão envolvidos no desenvolvimento embrionário pré-implantação (KAWAMURA et al., 2007; SWANGCHAN-UTHAI et al., 2011; GHERSEVICH et al., 2015).

7. CONCLUSÃO

Os resultados trouxeram esclarecimentos relevantes quanto às particularidades da relação do BoHV-1 e ovócitos durante a fundamental etapa de maturação *in vitro*, o que pode influenciar tanto nas condições de produção *in vitro* de embriões bovinos quanto nas condições naturais de maturação ovocitária. A presença do BoHV-1 afetou negativamente o processo de maturação nuclear de ovócitos infectados *in vitro* e provenientes de animais naturalmente infectados. Animais de alta titulação de anticorpos contra o BoHV-1 apresentaram seus ovócitos com menor capacidade de desenvolvimento, representando comprometimento no desempenho reprodutivo desses animais.

8. REFERÊNCIAS

- AARDEMA, H.; LOLICATO, F.; VAN DE LEST, C.H.A.; BROUWERS, J.F.; VAANDRAGER, A.B.; VAN TOL, H.T.A.; ROELEN, B.A.J.; VOS, P.L.A.M.; HELMS, J.B.; GADELLA, B.M. Bovine cumulus cells protect maturing oocytes from increased fatty acid levels by massive intracellular lipid storage. **Biology of Reproduction**, v.88, p.1–15, 2013.
- AARDEMA, H.; VAN TOL, H.T.A.; WUBBOLTS, R.W.; BROUWERS, J.F.; GADELLA, B.M.; ROELEN, B.A.J. Stearoyl-CoA desaturase activity in bovine *cumulus* cells protects the oocyte against saturated fatty acid stress. **Biology of Reproduction**, v.96, p.982–992, 2017.
- ACKERMANN, M. et al. Round table on infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis virus infection diagnosis and control. **Veterinary Microbiology**, v.23, p.361-363, 1990.
- AKUFO, E.; PHELPS, D.A.; TIBBITTS, F.D.; FOOTE, W.D. Influence of follicular components on oocytes meiosis in vitro. **Theriogenology**, v.30, p.643-648, 1988.
- ALBUZ, F.K.; SASSEVILLE, M.; LANE, M.; ARMSTRONG, D.T.; THOMPSON, J.G.; GILCHRIST, R.B. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel in vitro maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. **Human reproduction**, v.25, p.2999–3011, 2010.
- AONO, F.H.; COOKE, R.F.; ALFIERI, A.A.; VASCONCELOS, J.L.M. Effects of vaccination against reproductive diseases on reproductive performance of beef cows submitted to fixed-timed AI in Brazilian cow-calf operations. **Theriogenology**, v.79, p. 242–248, 2013.
- ATA, A.; KOCAMÜFTÜOĞLU, M.; HASIRCIOĞLU, S.; KALE, M.; GÜLAY, M. Investigation of relationship between bovine herpesvirus-1 (BHV-1) infection and fertility in repeat breeding dairy cows in family-type small dairy farms. **J. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**. v.18, p.579-583, 2012.
- ATEF, A.; FRANCOIS, P.; CHRISTIAN, V.; MARC-ANDRE, S. The potential role of gap junction communication between cumulus cells and bovine oocytes during in vitro maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v.71, p.358–367, 2005.
- BABIUK, L.A.; VAN DEN HURK, S.D.L; TIKOO, S.K. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. **Vet. Microbiol.** 53:31-42, 1996.
- BARBOSA, A.C.V.C.; BRITO, W.M.E.D.; ALFAIA B.T. Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) no Estado de Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, v.35, n.6, p.1368-1373, 2005.
- BETTEGOWDA, A.; PATEL, O.V.; LEE, K.; PARK, K.; SALEM, M.; YAO, J.; IRELAND, J.J.; SMITH, G.W. Identification of Novel Bovine Cumulus Cell Molecular Markers Predictive of Oocyte Competence: Functional and Diagnostic Implications. **Biology of Reproduction**, v.79, p.301-309, 2008.
- BIELANSKI, A. The potential for animal and human germplasm contamination through assisted reproductive biotechnologies. **Trends in Reproductive Biology**, v.2, p.13-36, 2006.

- BIELANSKI, A.; DUBUC, C. In vitro fertilization and culture of ova from heifers infected with bovine herpesvirus-1 (BHV-1). **Theriogenology**, v.41, p.1211-1217, 1994.
- BIELANSKI, A.; JORDAN, L.; Lutze-Wallace, C. et al. The efficacy of trypsin for disinfection of in vitro fertilized bovine embryos exposed to bovine herpesvirus 1. **Animal Reproduction Science**, v.47, p.1-8, 1997.
- BIELANSKI, A.; LUTZE-WALLACE, C.; SAPP, T.; JORDAN, L. The efficacy of trypsin for disinfection of in vitro fertilized bovine embryos exposed to bovine herpesvirus 1. **Animal Reproduction Science**, v.47, p.1-8, 1987.
- BILODEAU-GOESEELS, S. Review: The regulation of meiotic maturation in bovine oocytes. **Canada Journal of Animal Science**, v.88, p.343-349, 2008.
- BISWAS, S.; BANDYOPADHYAY, S.; DIMRI, U.; PATRA, P.H. Bovine herpes virus-1 (BHV-1) - a re-emerging concern in livestock: a revisit to its biology, epidemiology, diagnosis and prophylaxis. **Veterinary Quarterly**, v.33, p.68-81, 2013.
- BOWEN, R.A.; ELDSSEN, R.P.; SEIDEL, G.E. Infection of early bovine embryos with Bovine Herpes virus-1. **American Journal of Veterinary Research**, v.46, p.1095-1097, 1985.
- CAN, M.F.; ATASEVEN, V.S.; YALÇIN, C. Estimation of production and reproductive performance losses in dairy cattle due to bovine herpesvirus 1 (BoHV1) infection. **Veterinary arhiv**, v.86, p.499-513, 2016.
- CARBONERO, A.; SAA, L.R.; JARA, D.V.; GARCÍA-BOCANEGRA, I.; ARENAS, A.; BORGES, C.; PEREA, A. Seroprevalence and risk factors associated to Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) infection in non-vaccinated dairy and dual-purpose cattle herds in Ecuador. **Preventive Veterinary Medicine**, v.100, p.84-88, 2011.
- COSTA, E.P. **Aspectos morfológicos (citológicos e ultraestruturais) e desenvolvimento de ovócitos de bovinos “in vitro”**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1994. 155f. Tese (Doutorado em Ciência Animal, área Reprodução Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, 1994.
- COSTA, E.P.; VALE FILHO, V.R.; NOGUEIRA, J.C.; COSTA, A.H.A.; CAMARGOS, E.R.S.; FERREIRA, A.M.; BRUSCHI, J.H. Técnicas para desnudamento rápido de ovócitos de bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, p.425-432, 1997a.
- COSTA, E.P.; VALE FILHO, V.R.; NOGUEIRA, J.C.; FERREIRA, A.M.; COSTA, A.H.A. Técnica para a avaliação do estágio de maturação “in vitro” de ovócitos bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, p.433-440, 1997b.
- COWLEY, D.J.B.; CLEGG, T.A.; DOHERTY, M.L.; MORE, S.J. Aspects of bovine herpesvirus-1 infection in dairy and beef herds in the Republic of Ireland. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.53, p.40, 2011.

- D'ANGELO, M. **Interação do Herpesvirus Bovino tipo-1 (BHV-1) com ovócitos bovinos maturados in vitro**. 52f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
- D'ANGELO, M.; VISINTIN, J.A.; RICHTZENHAIN, L.J.; GONÇALVES, R.F. Evaluation of trypsin treatment on the inactivation of bovine herpesvirus type 1 on *in vitro* produced pre-implantation embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, p.536-539, 2009.
- DIAS, J.A.; ALFIERI, A.A.; FERREIRA-NETO, J.S.; GONÇALVES, V.S.P.; MULLER, E.E. Seroprevalence and Risk Factors of Bovine Herpesvirus 1 Infection in Cattle Herds in the State of Paraná, Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.60, p.39-47, 2013.
- DIELEMAN, S.J.; HENDRIKSEN, P.J.; VIUFF, D.; THOMSEN, P.D.; HYTTEL, P.; KNIJN, H.M.; WRENZYCKI, C.; KRUIP, T.A.; NIEMANN, H.; GADELLA, B.M.; BEVERS, M.M.; VOS, P.L. Effects of *in vivo* pre-maturation and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology**, v.57, p.5–20, 2002.
- DURHAM, P.J.K.; HASSARD, L.E. Prevalence of antibody to infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza 3, bovine respiratory syncytial, and bovine viral diarrhoea viruses in cattle in Saskatchewan and Alberta. **Canadian Veterinary Journal**, v.31, p.815- 820, 1990.
- EL-MAYET, F.S.; SAWANT, L.; THUNUGUNTLA, P.; JONES, C. Combinatorial effects of the glucocorticoid receptor and Krüppel-like transcription factor 15 on bovine herpesvirus 1 transcription and productive infection. **Journal of Virology**, 91:e00904-17, 2017.
- ENGELS, M., ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminants pestivirus infections. **Veterinary Microbiology**, v.53, p.3-15, 1996.
- FERREIRA, E.M.; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R.; MEIRELLES, F.V.; FERRIANI, R.A.; NAVARRO, P.A.A.S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v.71, p.836–848, 2009.
- FINO, T.C.M.; MELO, C.B.; RAMOS, A.F.; LEITE, R.C. Infecções por herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e suas implicações na reprodução bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.36, n.2, p.122-127, 2012.
- FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. Herpesviridae In: FLORES, E.F. *Virologia Veterinária*, Ed. UFSM, cap.17, p.433-88. 2007.
- FU, Y.; JIANG, H.; LIU, J.; SUN, X.; ZHANG, Z.; LI, S.; GAO, Y.; YUAN, B.; ZHANG, J. Genome-wide analysis of circular RNAs in bovine cumulus cells treated with BMP15 and GDF9. **Nature Scientific Reports**, 8:7944, 2018.
- GHERSEVICH, S.; MASSA, E.; ZUMOFFEN, C. Oviductal secretion and gamete interaction. **Reproduction**, v.149, p.R1–R14, 2015.
- GIBBS, E.P.J.; RWEYEMANN, M.M. Bovine herpesviruses. Part I. Bovine herpesvirus 1. **Veterinary Bulletin**. v.47, n.5, 1977.
- GILCHRIST, G.C.; TSCHERNER, A.; NALPATHAMKALAM, T.; MERICO, D.; LAMARRE, J. MicroRNA Expression during Bovine Oocyte Maturation and Fertilization. **International Journal of Molecular Sciences**, v.17, p. 396, 2016.

- GILCHRIST, R.B.; RITTER, L.J.; ARMSTRONG, D.T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Animal Reproduction Science*. V.82–83, p.431–46, 2004.
- GIOTTO, A.B.; BRUM, D.S.; SANTOS, F.W.; GUIMARÃES, A.C.G.; GONÇALVES, C.G.M; PAVIN, C.U.M; FOLCHINI, N.P.; MOYSES, A.B.; MISSIO, D.; LEIVAS, F.G. Oxygen tension and oocyte density during in vitro maturation affect the in vitro fertilization of bovine oocytes. **Semina: Ciências Agrárias**, v.36, p.4277-4288, 2015.
- GIVENS, M.D.; MARLEY, M.S.D. Pathogens that cause infertility of bulls or transmission via semen. **Theriogenology**, v.70, p.504-507, 2008.
- GONGALVES, P.B.D.; FIGUEREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas a Reprodução Animal**. 2ed., São Paulo: Roca, 408p., 2008.
- GRAHAM, D.A. Bovine herpes virus-1 (BoHV-1) in cattle—a review with emphasis on reproductive impacts and the emergence of infection in Ireland and the United Kingdom. **Irish Veterinary Journal**, v.66, p.1-15, 2013.
- GUARINO, H.; NUNEZ, A.; REPISO, M.V.; GIL, A.; DARGATZ, D.A. Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhoea virus in beef cattle in Uruguay. **Preventive Veterinary Medicine**, v.85, p.34–40, 2008.
- GUERIN, B.; LE GUIENNE, B.; ALLIETTA, M.; HARLAY, T.; THIBIER, M. Effets de la contamination par le BHV-1 sur la maturation et fécondation in vitro des ovocytes des bovines. **Recueil de Médecine Veterinaire**, v.66, p.911-917, 1990.
- GUERIN, B.; NIBART, M.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P. Sanitary risks related to embryo transfer in domestic species. **Theriogenology**, v.47, p.33-42, 1997.
- GUIMARÃES, A.L.; PEREIRA, S.A.; LEME, L.O.; DODE, M.A. Evaluation of the simulated physiological oocyte maturation system for improving bovine in vitro embryo production. **Theriogenology**, v.83, p.52–57, 2015.
- HENZEL, A. **Patogenia experimental da infecção genital aguda e latente pelo herpesvírus bovino tipo 1.2 em bezerras**. 43f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, 2008.
- HOUSE JA, BAKER JA. Bovine herpesvirus IBR-IPV. The antibody virus neutralization reaction. **Cornell Vet**, v.61, p.320–335, 1971.
- HYTTEL, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.38, p.35-47, 1989.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal 2015-2016. 2017. Acessado em 18 de julho de 2017. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal>.
- International Embryo Technology Society (IETS) - 2016 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. Collated by George Perry,

- Chairperson. Acessado em: 10/06/2018. Disponível em: https://www.iets.org/pdf/comm_data/IETS_Data_Retrieval_Report_2016_v2.pdf
- JONES, C.; SILVA, L.F.; SINANI, D. Regulation of the latency-reactivation cycle by 2419 products encoded by the bovine herpesvirus 1 (BHV-1) latency-related gene. **Journal of Neurovirology**. v.17, p.535-545, 2011.
- KAKKASSERY, M.P.; VIJAYAKUMARAN, V.; SREEKUMARAN, T. Effect of cumulus oocyte complex morphology on in vitro maturation of bovine oocytes. **Journal of Veterinary and Animal Science**, v.41, p.12-17, 2010.
- KAWAMURA, K.; KAWAMURA, N.; FUKUDA, J.; KUMAGAI, J.; HSUEH, A.J.; TANAKA, T. Regulation of preimplantation embryo development by brain-derived neurotrophic factor. **Developmental Biology**, v.311, p.147-158, 2007.
- KIDDER, G.M.; MHAWI, A.A. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. **Reproduction**. v.123, p.613-20, 2002.
- KIMURA, N.; HOSHINO, Y.; TOTSUKAWA, K.; SATO, E. Cellular and molecular events during oocyte maturation in mammals: molecules of cumulus-oocyte complex matrix and signalling pathways regulating meiotic progression. **Society of Reproduction and Fertility Supplement**, v.63, p.327-342, 2007.
- KUSSANO, N.R.; LEME, L.O.; GUIMARÃES, A.L.S.; FRANCO, M.M.; DODE, M.A.N. Molecular markers for oocyte competence in bovine cumulus cells. **Therriogenology**, p.1-10, 2016.
- LOLICATO, F.; BROUWERS, J.F.; VAN DE LEST, C.H.A.; WUBBOLTS, R.; AARDEMA, H.; PRIORE, P.; ROELEN, B.A.J.; HELMS, B.; GADELLA, B.M. The Cumulus Cell Layer Protects the Bovine Maturing Oocyte Against Fatty Acid Induced Lipotoxicity. **Biology of Reproduction**, 92(1):16, p.1-16, 2014.
- LOVATO, L.T.; WEIBLEN, R.; TOBIAS, L.F.; MORAES, M.P. Herpesvírus bovino tipo 1 (HVB 1): Inquérito soro epidemiológico no rebanho leiteiro no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.25, n.3, p. 425-430, 1995.
- MACAULAY, A.D.; GILBERT, I.; SCANTLAND, S.; FOURNIER, E.; ASHKAR, F.; BASTIEN, A.; SHOJAEI SAADI, H.A.; GAGNE, D.; SIRARD, M.A.; KHANDJIAN, E.W.; RICHARD, F.J.; HYTTEL, P.; ROBERT, C. Cumulus cell transcripts transit to the bovine oocyte in preparation for maturation. **Biology of Reproduction**, 94(1):16, 2016.
- MAHMOUDI, R.; SUBHANI, A.; PASBAKSH, P.; ABOLHASANI, F.; AMIRI, I.; SALEHNIA, M.; ETESAM, F. The Effects of cumulus cells on in vitro maturation of mouse germinal vesicle stage oocytes. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, v.3, p.74-78. 2005.
- MAKAREVICH, A.V.; PIVKO, J.; KUBOVICOVA, E.; CHRENEK, M.; SLEZAKOVA, M.; LOUDA, F. Development and viability of bovine preimplantation embryos after the in vitro infection with bovine herpesvirus-1 (BHV-1): immunocytochemical and ultrastructural studies. **Zygote**, v.15, p.307-315, 2007.
- MATSUO, M.; SUMITOMO, K.; OGINO, C.; GUNJI, Y.; NISHIMURA, R.; HISHINUMA, M. Three-step in vitro maturation culture of bovine oocytes

- imitating temporal changes of estradiol-17 β and progesterone concentrations in preovulatory follicular fluid. **Archives Animal Breeding**, v.60, p.385–390, 2017.
- MENDES, V.R.A. **Detecção viral e capacidade de maturação "in vitro" de ovócitos de vacas naturalmente infectadas pelo herpesvirus bovino 1**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, 2012.
- MILLER, J.M.; VAN DER MAATEN, M.J.; WHETSTONE, C.A. Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA. **American Journal of Veterinary Research**, v.52, p.458-461, 1991.
- MODINA, S.; LUCIANO, A.M.; VASSENA, R.; BARALDI-SCESI, L.; LAURIA, A.; GANDOLFI, F. Oocyte developmental competence after in vitro maturation depends on the persistence of *cumulus*–oocyte communications which are linked to the intracellular concentration of cAMP. **Ital J Anat Embryol**. v.106, p.241–248, 2001.
- MUELLER, S. B. K. et al. Prevalência de anticorpos contra o vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina / Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IBR/IPV) em bovinos do Estado de São Paulo. **Instituto Biológico de São Paulo**, v.47, p.55- 59, 1981.
- MUYLKENS, B.; THIRY, J.; KIRTEN, P.; SCHYNTS, F.; THIRY, E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Research**, v.38, p.181–209, 2007.
- NANDI, S.; KUMAR, M.; MANOHAR, M.; CHAUHAN, R.S. Bovine herpes virus infections in cattle. **Animal Health Research Reviews**, v.10, p. 85-98, 2009.
- NANDI, S.; KUMAR, M.; YADAV, V.; CHANDER, V. Serological Evidences of Bovine Herpesvirus-1 Infection in Bovines of Organized Farms in India. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.58, p.105-109, 2011.
- OBANDO, R.C.; HIDALGO, M.; MERZA, M.; MONTTOYA, A.; KLINGEBORN, B.; MORENO-LOPEZ, J. Seroprevalence to bovine virus diarrhoea virus and other viruses of the bovine respiratory complex in Venezuela (Apure State). **Preventive Veterinary Medicine**, v.41 p.271-278, 1999.
- OHNO, S.; SMITH, J. B. Role fetal follicular cells in meiosis of mammalian oocytes. **Cytogenetics**, v.3, p.324-333, 1964.
- OLIVEIRA, A.P. **Herpesvírus Bovino em complexos cumulus-ovócitos e fluido folicular em vacas sorologicamente positivas**. 48f. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.
- OLIVEIRA, A.P. **Pesquisa do vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos em complexos cumulus-ovócito e líquido folicular**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- PALAZZI, E.G.; GONÇALVES, R.F.; HANSEN, D.; PITUCO, E.M.; FELICIO, J.D.A.; DE ALMEIDA, M.L.; ALVES, M.F.; DE CAMPOS NOGUEIRA, A.H.; STURARO, L.G.R.; D'ANGELO, M. Evaluation of pomegranate (*Punica granatum*) as replication inhibitor of bohv-1 colorado strain during in vitro maturation of infected bovine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development** v.25, p.224-224, 2012.

- PHILPOTT, M. The dangers of disease transmission by artificial insemination by Embryo Transfer. **British Veterinary Journal**, v.149, p.339-369, 1993.
- PIOVESAN, M.; FERNANDES, M.H.V.; CORRÊA, R.A.; PRADO, M.H.J.; CAMARGO, A.D.; RODRIGUES, P.R.C. anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1, vírus da diarreia viral bovina e vírus da leucose enzoótica bovina na região da campanha do estado do Rio Grande do Sul. **Science and Animal Health**, v.1, p.38-49, 2013.
- PITUCO, E. M. **Ocorrência da Rinotraqueíte Infecciosa dos Bovinos / Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IBR/IPV) em rebanhos criados no estado de São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná, Minas Gerais**. Dissertação (doutorado em patologia bovina) Faculdade de medicina veterinária e zootecnia, São Paulo, 1988.
- QUEIROZ-CASTRO, V.L.D.; COSTA, E.P.; ALVES, S.V.P.; SILVA JÚNIOR, A.; MACHADO-NEVES, M.; GUIMARÃES, J.D. Detection of bovine herpesvirus 1 in *cumulus*-oocyte complexes of cows. **Research in Veterinary Science**, v.120, p.54-56, 2018.
- RAAPERI, K., BOUGEARD, B.; ALEKSEJEV, A.; ORRO, T.; VILTROP, A. Association of herd BRSV and BHV-1 seroprevalence with respiratory disease and reproductive performance in adult dairy cattle. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.54, p.4, 2012.
- RAAPERI, K.; NURMOJA, I.; ORRO, T.; VILTROP, A. Seroepidemiology of bovine herpesvirus 1 (BHV1) infection among Estonian dairy herds and risk factors for the spread within herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v.96, p.74-81, 2010.
- RAAPERI, K.; ORRO, T.; ARVO, V. Epidemiology and control of bovine herpesvirus 1 infection in Europe. **The Veterinary Journal**, v.201, p.249-256, 2014.
- RAGHU, H.M.; NANDI, S.; REDDY, S.M. Follicle size and oocyte diameter in relation to developmental competence of buffalo oocytes in vitro. **Reproduction, Fertility and Development**, v.14 p.55-61, 2002.
- RAVAZZOLO, A. P.; PIZZOL, M. D.; MOOJEN, V. Evidência da presença de anticorpos para o vírus da Rinotraqueíte Infecciosa dos Bovinos, em alguns municípios do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivos da Faculdade Veterinária UFRGS**, v.17, p.89-95, 1989.
- RAVISHANKAR, C.; NANDI, S.; CHANDER, V.; MOHAPATRA, T.K. Concurrent testing of breeding bulls for bovine herpesvirus 1 infection (BHV-1) in India. **Veterinaria italiana**, v.49, p.145-150, 2013.
- REED, L.J.; MÜENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **American Journal of Hygiene**, v.27, p.493-497, 1938.
- ROCHA, M. A.; GOUVEIA, A. M. G.; LEITE, R. C. **Pesquisa de anticorpos anti IBR em soro de touros de uma central de inseminação**. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 1994, Olinda. Anais... Recife, PE: Sociedade Pernambucana de Medicina Veterinária, 656f, 213, 1994.

- ROCHA, M. A.; GOUVEIA, A. M. G.; LOBATO, Z. I. P. et al. Pesquisa de anticorpos para IBR em amostragem de demanda no Estado de Minas Gerais, 1990-1999. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.53, n.6, 2001.
- RUSSELL, D.L.; GILCHRIST, R.B.; BROWN, H.M.; THOMPSON, J.G. Bidirectional communication between cumulus cell and the oocyte: Old hands and new players? **Theriogenology**, v.86, p.62-68, 2016.
- SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 265p., 2002
- SANTIQUET, N.W.; DEVELLE, Y.; LAROCHE, A.; ROBERT, C.; RICHARD, F.J. Regulation of Gap-Junctional Communication Between Cumulus Cells During In Vitro Maturation in Swine, a Gap-FRAP Study. **Biology of Reproduction**, v.87, p.1–8, 2012.
- SAYERS, R.G. Associations between exposure to bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) and milk production, reproductive performance, and mortality in Irish dairy herds. **Journal of Dairy Science**. v.100, p.1340–1352, 2017.
- SAYERS, R.G.; BYRNE, N.; O'DOHERTY, E.; ARKINS, S. Prevalence of exposure to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and bovine herpesvirus-1 (BoHV-1) in Irish dairy herds. **Research in Veterinary Science**. v.100, p.21–30, 2015.
- SHIRVANI, E.; LOTFI, M.; KAMALZADEH, M.; NOAMAN, V.; BAHRIARI, M.; MOROVATI, H.; HATAMI, A. Seroepidemiological study of bovine respiratory viruses (BRSV, BoHV-1, PI-3V, BVDV, and BAV-3) in dairy cattle in central region of Iran (Esfahan province). **Tropical Animal Health and Production**, v.44, p.191–195, 2012.
- SILVA, A.M. **Deteção, isolamento e caracterização molecular de Herpesvírus bovino tipos 1 e 5 de bovinos do estado de Goiás**, Brasil. 2013, 103f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade de Goiás, Goiás, 2013.
- SILVA-FRADE, C.; MARTINS JR, A.; BORSANELLI, A.C.; CARDOSO, T.C. Effects of bovine Herpesvirus Type 5 on development of in vitro–produced bovine embryos. **Theriogenology**, v.71, p.324-31, 2010.
- SMITH, G.A.; YOUNG, P.L.; REED, K.C. Emergence of a new bovine herpesvirus 1 strain in Australian feedlots. **Archives of Virology**, v.140, p.599-603, 1995.
- SOLIS-CALDERON, J.J.; SEGURA-CORREA, V.M.; SEGURA-CORREA, J.C.; ALVARADO-ISLAS, A. Soroprevalence of and risk factors for infectious bovine rhinotracheitis in beef cattle herds of Yucatan, Mexico. **Preventive Veterinary Medicine**, v.57, p.199-208, 2003.
- SPEAR, P.G. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. **Cellular Microbiology**, v.6, p.401-10, 2004.
- SPRÍCIGO, J.F.W.; DIÓGENES, M.N.; LEME, L.O.; GUIMARÃES, A.L.; MUTERLLE, C.V.; SILVA, B.D.M.; SOLÀ-ORIOLE, D.; PIVATO, I.; SILVA, L.P.; DODE, M.A.N. Effects of different maturation systems on bovine oocyte

- quality, plasma membrane phospholipid composition and resistance to vitrification and warming. **PLoS ONE**, 10(6): e0130164, 2015.
- STATHAM, J. M. E.; L. V. RANDALL, AND S. C. ARCHER. Reduction in daily milk yield associated with subclinical bovine herpesvirus 1 infection. **Veterinary Records**. v.177, p.339, 2015.
- STRAUB, O.C. Infectious bovine rhinotracheitis virus. In: DINTER, Z. e MORUN, B. **Virus Infectious of Ruminants**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p.71-108, 1990.
- STRINGFELLOW, D. A.; GIVENS, M. D. Infectious agents in bovine embryo production: Hazards and Solutions. **Theriogenology**, v.53, p.85-94, 2000.
- SU, Y-Q.; DENEGRE, J.M.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, F.L.; O'BRIEN, M.J.; EPPIG, J.J. Oocytedependent activation of mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) in cumulus cells is required for the maturation of the mouse oocyte-cumulus cell complex. **Developmental Biology**, v.263, p.126-38, 2003.
- SUN, M-H.; ZHENG, J.; XIE, F-Y.; SHEN, W.; YIN, S.; MA, J-Y. Cumulus Cells Block Oocyte meiotic resumption via gap junctions in cumulus oocyte complexes subjected to DNA double-strand breaks. **PLoS ONE**, 10(11): e0143223, 2015.
- SWANGCHAN-UTHAI, T.; WALSH, S.W.; ALEXANDER, S.L.; CHENG, Z.; CROWE, M.A.; EVANS, A.C. et al. Comparison of mRNA for IGFs and their binding proteins in the oviduct during the peri-oestrous period between dairy heifers and lactating cows. **Reproduction**, v.142, p.457-465, 2011.
- TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; NAUWYNCK, H.; CORYN, M.; DE KRUIF, A. Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, v.61, p.414-424, 2002.
- TAWATAO, K.M.; MANAOIS, F.V.; OCAMPO, L.C.; OCAMPO, M.B. Folic acid supplementation for bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. **Journal of Agricultural Technology**, v.11, p.2401-2409, 2015.
- THIBIER, M.; WRATHALL, T. **International Trade of Livestock Germplasm**. New York: Taylor & Francis. (Encyclopedia of Biotechnology in Agriculture and Food) 4p, 2012.
- THOMAS, R.E.; ARMSTRONG, D.T.; GILCHRIST, R.B. Bovine Cumulus Cell-Oocyte Gap Junctional Communication During In Vitro Maturation in Response to Manipulation of Cell-Specific Cyclic Adenosine 39 59-Monophosphate Levels. **Biology of Reproduction**, v.70, p.548-556, 2004.
- TONG, X.H.; XU, B.; ZHANG, Y.W.; LIU, Y.S.; MA, C.H. Research resources: Comparative microRNA profiles in human corona radiata cells and cumulus oophorus cells detected by next-generation small RNA sequencing. **PLoS ONE** 2014.
- TSUBOI, T.; IMADA, T. Effect of bovine herpes virus- 1, bluetongue virus and akabane virus on the in vitro development of bovine embryos. **Veterinary Microbiology**, v.51, p.135-142, 1997.
- TSUBOI, T.; KANAZAWA, Y.; SYOJI, T.; TOKUHISA S. Growth activity of bovid herpesvirus 1 in bovine follicular oocytes with cumulus cells. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.54, p.1179-1781, 1992.

- UHDE, K.; VAN TOL, H.T.A.; STOUT, T.A.E.; ROELEN, B.A.J. MicroRNA Expression in Bovine Cumulus Cells in Relation to Oocyte Quality. **Non-Coding RNA**, 3, 12, 2017.
- VANROOSE, G.; NAUWYNCK, H.; VAN SOOM, A.; THIRY, E.; de KRUIF, A. Use of monoclonal antibodies to prevent the bovine herpesvirus-1 induced inhibition of sperm-zona binding. **Theriogenology**, v.53, p.322, 2000.
- VANROOSE, G.; NAUWYNCK, H.; VAN SOOM, A.; VAN OPDENBOSCH, E.; 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, p.255-263, 1999a.
- VANROOSE, G.; NAUWYNCK, H.; VAN SOOM, A.; VANOPDENBOSCH, E.; KRUIFL, A. Susceptibility of zona-intact and zona-free in vitro-produced bovine embryos at different stages of development to infection with bovine herpesvirus 1. **Theriogenology**. v.47, p.1389-1402, 1997.
- VANROOSE, G.; NAUWYNCK, H.; VAN SOOM, A.; VANOPDENBOSCH, E.; KRUIF, A. Replication of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhea virus in zona-free and zona-intact in vitro-produced bovine embryos and the effect on embryo quality. **Biology of Reproduction**, v.58, p.857-866, 1998.
- VANROOSE, G.; NAUWYNCK, H.; VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M.; CHARLIER, G.; VAN OOSTVELDT, P. et al. Why is the zona pellucida of in vitro produced bovine embryos an efficient barrier for viral infection? **Theriogenology**, v.51 p.276, 1999b.
- VIDOR, T.; HALFEN, D.C.; LEITE, T.E. Herpesvírus Bovino tipo 1(HVB-1). Sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos. **Ciência Rural**, v.25, n.3, p.421-424, 1995.
- WARZYCH, E.; CIESLAK, A.; WOLC, A.; LECHNIAK, D. Cathepsin mRNA level in bovine cumulus cells fails to be a good marker of oocyte quality. **Animal Science Papers and Reports**, v.34, p.339-349, 2016.
- WERNICKI, A.; URBAN-CHMIEL, R.; ROLA, J.; SOCHA, W.; STĘGIERSKA, D.; DEC, M.; PUCHALSKI, A. Prevalence of bovine herpes virus type 1 in small herds of young beef cattle in south-eastern Poland – a preliminary study. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v.59, p.467-471, 2015.
- WINKLER, M.T.; DOSTER, A.; JONES, C. Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in the tonsils of latently infected calves. **Journal of Virology**, v.74, p.5337–5346, 2000.
- WRATHALL, A.E.; SIMMONS, H.A.; VAN SOOM, A. Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilization with virusinfected semen. **Theriogenology**, v.65, p.247-274, 2006.
- WYLER, R.; ENGELS, M.; SCHWYZR, M. **Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV-1)**. In: WITTMANN, G. Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs. Boston: Kluwer Academic Publishers, p.1-72, 1989.
- ZHOU, C-J.; WU, S-N.; SHEN, J-P.; WANG, D-H.; KONG, X-W.; LU, A.; LI, Y-J.; ZHOU, H-X.; ZHAO, Y-F.; LIANG, C-G. The beneficial effects of cumulus

cells and oocyte-cumulus cell gap junctions depends on oocyte maturation and fertilization methods in mice. **Peer J**, p.1-15, 2016.