

**EMÍLIO CÉSAR MARTINS PEREIRA**

**DETECÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR DO HERPESVÍRUS BOVINO 1  
EM ESTRUTURAS OVARIANAS DE FÊMEAS BOVINAS**

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  
2011**

**EMÍLIO CÉSAR MARTINS PEREIRA**

**DETECÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR DO HERPESVÍRUS BOVINO 1  
EM ESTRUTURAS OVARIANAS DE FÊMEAS BOVINAS**

**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: 28 de fevereiro de 2011.

---

Prof. Abelardo Silva Júnior  
(Co-orientador)

---

Prof. Tarcízio Antônio Rego de Paula  
(Co-Orientador)

---

Prof. José Domingos Guimarães

---

Prof.: **Ciro Alexandre Alves Torres**

---

Prof.: **Eduardo Paulino da Costa**  
(Orientador)

“Dedico aos meus pais, José Maurício e Maria José, a qual imensurável esforço recompensaria todo orgulho e alegria deles por essa conquista”

*"Quanto mais eu treino mais sorte eu tenho"*  
*(Tiger Woods)*

*"Procure ser um homem de valor, em vez de ser um homem de sucesso"*  
*(Albert Einstein)*

*"Nós somos aquilo que fazemos repetidamente. Excelência, então, não é um modo de agir, mas um hábito."*  
*(Charles Chaplin)*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade de viver, por sempre iluminar meu caminho e me amparar nos momentos difíceis.

Aos meus pais, José Maurício e Maria José, por sempre acreditarem em mim e por me proporcionarem as melhores condições para alcançar meus objetivos. Agradeço também ao meu irmão, por toda amizade e conselhos.

À minha namorada, Jacque, que apesar da distância, esteve sempre a me confortar e ajudar, em tudo que precisei.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Veterinária, em especial a todos professores que participaram da minha formação.

Ào Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos durante parte do mestrado. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento do projeto.

Ao Professor Eduardo Paulino da Costa, pela orientação dedicada, pela amizade e pela oportunidade única de aperfeiçoamento profissional que este me proporcionou, sem a qual a realização deste trabalho não seria possível.

Ao Professor Abelardo Silva Jr pela co-orientação, ensinamentos e valiosas sugestões na elaboração deste trabalho.

A toda minha família, por sempre confiarem em mim. Em especial aos tios de Viçosa, João e Eliana, Fernando e Regina, por me ajudarem e acolherem sempre que necessitei. Agradeço meus avós, pelas orações e carinho. E ao meu primo Carlim, pelo companherismo e amizade.

Agradeço em especial ao meu grande amigo Giancarlo Magalhães, por não medir esforços para me ajudar sempre que podia, pelos conselhos, pela amizade e pelo exemplo de honestidade e simplicidade da qual nunca esquecerei. Valeu parceiro!

À minha amiga Sanely, por estar pronta pra me ajudar a qualquer hora do dia, sempre com sorriso cativante e bate papos motivadores.

As estudantes de Iniciação Científica, Marianne, Vanessa, que se esforçaram ao máximo para concretização deste trabalho. E à Vívian, primeiro estagiária e depois colega de mestrado, que me ajudou sempre quando possível.

Aos demais amigos do Laboratório de Reprodução, Gustavo Frango, Rafael Colombiano e Zé Rogério, pelo aprendizado, conselhos e pelos momentos de descontração.

À todos integrantes do Laboratório de Virologia, em especial ao Baiano e Marcos, pela paciência, amizade e auxílio nos procedimentos laboratoriais.

Aos meus amigos de República, Ray, Calouro e em especial Tuzão pela amizade construída, convivência harmoniosa, churrascos e momentos de diversão.

A Rosi e Bete, anjos da guarda dos pós graduandos, pela preocupação de sempre fazer tudo dar certo.

Aos funcionários do DVT, Divino Vêi, Cláudio, Adão, Luis Carlos, Marquim Salgado, Bel, Juliano, Sidney, Varnei, Rogerinho, Nicola pela amizade e respeito conquistado durante o período de trabalho. Ao Geraldinho cruzeirense, por ser sempre prestativo na marcação das viagens e ajuda para resolver os problemas. Ao mestre, Sr. Nenzinho, por toda alegria e exemplo de humanidade durante o saudoso período de convivência.

Aos motoristas da Garagem/UFV por proporcionarem viagens seguras e divertidas.

Aos velhos amigos que conquistei na graduação, Renan, Daniel, Rafael, Newtaum, Bonna, Fredão, Lú, Glau, que de perto ou de longe, sempre me deram força e não deixaram de estar presentes na minha história.

Aos demais amigos da graduação e pós, Rogerinho (Gordinho), Léo Sequela, Luquinha, Jonanthan, Anderson, Japa, pela amizade construída ao longo do caminho. E aos demais colegas da pós, Andrezão, Emílio Neto, Lina, João Gabriel pelos momentos de convivência.

Aos Professores, Ciro Alexandre, José Domingos, Tarcízio por aceitarem participar da banca.

Aos proprietários e funcionários do Frigorífico Sabor de Minas que sempre abriram as portas e não mediram esforços para a realização das nossas pesquisas.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADO!**

## **BIOGRAFIA**

EMÍLIO CÉSAR MARTINS PEREIRA, filho de José Maurício Pereira da Silva e Maria José Martins Pereira, nasceu na cidade Ponte Nova, Minas Gerais, em 09 de Janeiro de 1986.

Em março de 2004, ingressou na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em Medicina Veterinária em janeiro de 2009.

Em março de 2009, iniciou o curso de Mestrado no programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG, tendo defendido a dissertação em 28 de fevereiro de 2011.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Biotécnicas da Reprodução.....	4
2.2. Herpesvirus Bovino 1 (BoHV 1).....	5
2.2.1. Caracterização do vírus.....	5
2.2.2. Transmissão e Epidemiologia .....	6
2.2.3. Patogenia e sinais clínicos .....	8
2.2.3. Métodos Diagnósticos .....	9
2.2.4. Métodos de controle .....	12
2.3. Avaliação do risco de transmissão do patógenos via biotécnicas reprodutivas.....	12
2.3.1. Doadores de sêmen .....	14
2.3.2. Ovócitos e doadoras de embriões .....	15
2.3.3. Meios reagentes de origem animal.....	16
2.3.4. Células somáticas .....	17
2.3.5. Recipientes.....	17
2.4 Métodos de controle de infecção em embriões bovinos .....	17
2.4.1. Lavagem e tratamento dos embriões com tripsina e outras proteases .....	18
2.4.2. Uso de antivirais .....	19
2.4.3. Medidas alternativas de controle .....	20
2.5 Potencial de interferência do BoVH 1 em gametas e embriões bovinos ..	21
2.5.1 Contaminação em ovócitos .....	21
2.5.2 Contaminação em espermatozóides .....	22
2.5.3. Contaminação de embriões.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1. Localização e período experimental .....	26
3.2. Seleção dos animais e coleta das amostras.....	26
3.3. Manipulação dos ovários e processamento das amostras .....	27
3.4. Teste sorológico .....	27
3.4.1. Manutenção de culturas celulares .....	27
3.4.2. Multiplicação viral .....	28

3.4.3. Titulação Viral.....	28
3.4.4. Pesquisa de anticorpos neutralizantes .....	29
3.5.Extração do DNA e Análise das Amostras por Reação de Cadeia de Polimerase (PCR).....	30
3.6 Análise estatística.....	31
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	32
5. CONCLUSÕES .....	39
6. BIBLIOGRAFIA .....	40

## RESUMO

PEREIRA, Emílio César Martins. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Deteção sorológica e molecular do herpesvírus bovino 1 em estruturas reprodutivas de fêmeas bovinas.** Orientador: Eduardo Paulino da Costa. Co-orientadores: Abelardo Silva Júnior, Carlos Antônio de Carvalho Fernandes, Tarcízio Antônio Rêgo de Paula e Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a condição sorológica de fêmeas bovinas abatidas em um frigorífico quanto à presença de anticorpos contra o Bovine Herpesvirus 1 (Herpesvírus Bovino 1 - BoHV-1). Objetivou-se também avaliar a presença do DNA viral no tecido ovariano, nos ovócitos, líquido folicular e sangue destes animais por meio da Reação de Cadeia de Polimerase (PCR) e correlacioná-la com o perfil sorológico. Foram coletadas amostras de soro, sangue, tecido ovariano, líquido folicular e complexo cumulus-ovócitos de 147 animais que não tinham histórico de vacinação com o BoHV-1. Amostras tóxicas ou insuficientes foram descartadas. Os testes sorológicos foram realizados permitindo a deteção de títulos virais de anticorpos de 2 a 1024. Os testes moleculares foram precedidos da extração do DNA das amostras, de acordo com recomendações do fabricante. Sucessivamente, foram realizadas as PCRs utilizando os oligonucleotídeos previamente descritos por Takiuchi et al. (2005). Observou-se 83,6% (117/140) de soropositividade para o BoHV-1 nas amostras sorológicas. As amostras positivas, divididas em grupos, de acordo com o título sorológico, apresentaram-se 10% de Título Baixo ( $2 \leq X < 8$ ); 32,9% de Título Médio ( $8 \leq X < 64$ ); 40,7% de Título Alto ( $64 \leq X \leq 512$ ). Em relação aos testes moleculares, o DNA viral foi detectado somente nos grupos de amostras soropositivas. Dos animais soropositivos, foi evidenciado o DNA viral em 0,9%(1/115) dos ovócitos, em 4,3%(5/117) do tecido ovariano, 2,8%(3/108) do sangue e em nenhuma amostra de líquido folicular. Comparando os resultados entre os grupos de amostras, as diferenças não se mostraram significativas ( $P > 0,05$ ). Conclui-se que do rebanho analisado foi detectada alta prevalência de anticorpos contra o BoHV-1 e que os testes moleculares se mostraram eficientes na deteção do DNA nas amostras de genitais de fêmeas bovinas, sugerindo que estas estruturas poderiam ser sítios de tropismo deste vírus.

## ABSTRACT

PEREIRA, Emílio César Martins. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, february de 2011. **Serological and molecular bovine herpesvirus-1 detectation on reproductive structures of bovine females.** Adviser: Eduardo Paulino da Costa. Co-advisers: Abelardo Silva Júnior, Carlos Antônio de Carvalho Fernandes, Tarcízio Antônio Rêgo de Paula and Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo.

The aim of this study was to evaluate the serological status of slaughter-derived cows for the presence of antibodies against bovine herpesvirus 1 (BoHV-1), viral DNA in ovarian tissue, oocyte, follicular fluid and blood of these animals by polymerase chain reaction (PCR) and correlate it with the serological profile. Serum samples, blood, ovarian tissue, follicular fluid and cumulus-oocyte complex were collected from 147 animals that had no history of vaccination against BoHV-1. Toxic or insufficient samples were discarded. Serological tests allowed the detection of the antibody titers from 2 to 1024. Molecular tests were preceded by the extraction of DNA from the samples, according to manufacturer's recommendations. The PCR reaction to use the primers previously described by Takiuchi et al. (2005). A total of 83.6% (117/140) of serum-positive for BoHV-1 in serum samples were observed. The positive samples were divided into groups according to serological profile, to get 10% of Down Titer ( $2 \leq X < 8$ ), 32.9% of Moderate Titer ( $8 \leq X < 64$ ); 40.7% High Titer ( $64 \leq X \leq 512$ ). In molecular tests, viral DNA was detected only in groups of positive samples. From positive animals, viral DNA was detected in 0.9% (1/115) of oocytes, at 4.3% (5/117) of ovarian tissue, 2.8% (3/108) of blood and any of follicular fluid sample. Comparing the results among groups of samples, the differences were not significant ( $p > 0.05$ ). Thus, animals showed high prevalence of antibodies against BoHV-1 and molecular tests that have proven successful in detecting DNA in genital samples from cows, suggesting that these structures could be sites of tropism of this virus.

## 1. INTRODUÇÃO

Atuando sinergicamente ao avanço tecnológico, a produção de embriões tanto mundial quanto brasileira tem tido grande avanço nos últimos anos. O Brasil alcançou no ano de 2008, a marca de 289.952 embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*, o que representa 26,9% dos embriões produzidos em todo mundo. Destacando principalmente na produção *in vitro* (PIV) onde é responsável por 66,6% dos embriões produzidos no mundo, o Brasil tem progredido similarmente no campo científico, por meio do avanço em pesquisas que abordam aspectos da fecundação *in vitro* (FIV) (Viana *et al.*, 2010).

Apesar de milhões de embriões bovinos produzidos *in vitro* serem transferidos comercialmente sem reportar a transmissão de doenças, estes riscos devem ser considerados (Perry *et al.*, 2005). O entendimento do potencial de interferência das doenças infecciosas nas biotécnicas reprodutivas, principalmente à nível de embriões e gametas, é um dos temas que tem ganhado importância entre os pesquisadores brasileiros. Tal fato pode ser justificado pelo Brasil ser um dos líderes na exportação de embriões bovinos. Diante disto, é necessária uma adequação, a fim de atender as premissas legislativas e sanitárias estabelecidas pelas agências regulatórias dos principais países importadores.

Entre os principais agentes patogênicos que interferem nos aspectos reprodutivos de bovinos se encontra o Bovine Herpesvirus 1 (Herpesvírus bovino 1 - BoHV1). Segundo Makarevich *et al.* (2007), este agente pertence ao grupo dos mais antigos agentes virais que acometem as espécies mamíferas. O BoHV1 é um agente viral pertencente à Família *Herpesviridae*, possui envelope e genoma DNA linear de fita dupla (Fenner, 1987). Uma das principais características deste vírus é a capacidade de permanecer em latência em gânglios nervosos, até que o animal apresente uma condição de imunossupressão (Straub, 1990). O BoHV1 é o responsável pela enfermidade denominada de Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) caracterizada por formas clínicas que comprometem os órgãos respiratório e reprodutivo. A sintomatologia nos órgãos genitais está ligada à repetição de estros a intervalos regulares/irregulares, abortamentos, natimortalidade, mortalidade perinatal, redução na fertilidade e infertilidade temporária devido à infecção uterina. Esta doença é caracterizada ainda por grande disseminação e difícil

controle no rebanho. Devido aos problemas reprodutivos e por ser na maioria das vezes sub-diagnosticada, esta enfermidade pode causar consideráveis prejuízos reprodutivos nas propriedades. Sua manifestação nos órgãos reprodutivos se dá por meio de duas síndromes, a Vulvovaginite Pustular Infecciosa e a Balanopostite Infecciosa, que afetam fêmeas e machos, respectivamente.

Comparado ao transporte de animais vivos, a transferência de embriões é entendida como método muito mais seguro, eficiente e prático para o deslocamento de germoplasma (Gard *et al.*, 2007). Entretanto, os procedimentos de TE e de PIV de embriões, embora não represente uma rota natural para transmissão de doenças, podem facilitar a disseminação de alguns patógenos, os quais são capazes de serem transmitidos pelo sêmen ou embriões. Contudo, quando monitoradas corretamente, estas biotécnicas podem ser empregadas para prevenir a propagação de agentes infecciosos (Gard *et al.*, 2007). As possíveis fontes de infecção do embrião durante os procedimentos de PIV incluem os ovócitos, espermatozóides, soro e cultivo celular (Perry, 2005).

Além do conhecido potencial de carreamento do patógeno pelos embriões e possibilidade de infecção da receptora (Givens & Marley, 2008), não deve ser desprezada a interferência do patógeno nas taxas de fertilização embrionária (Tanghe *et al.*, 2005). Estudos têm demonstrado que a presença do BoHV1 pode ainda proporcionar uma redução da taxa de blastocistos nos procedimentos de PIV (Guerin *et al.*, 1990; Bielanski & Dubuc, 1994; Vanroose *et al.*, 1999; Makarevich, 2007). Este fato parece estar relacionado à interferência do vírus na ligação espermatozóide/ovócito e em outras etapas subseqüentes do processo de fertilização (Guerin *et al.*, 1990; Tanghe *et al.*, 2005).

Segundo a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), a limitação da atual conjuntura da sociedade é a inexistência de métodos não-letais para avaliar presença de patógenos em embriões, anteriormente à transferência para as receptoras (Rufino *et al.*, 2006). Atualmente, os métodos para identificação de agente infecciosos em sêmen, ovócitos e embriões se limitam a testes laboratoriais como isolamento viral (Takiuchi *et al.*, 2005; Marley *et al.*, 2008a), técnicas de imunofluorescência (Vanroose *et al.*, 1997; Makarevich *et al.*, 2007) e testes moleculares como

PCR (Edens *et al.*, 2003; Takiuchi *et al.*, 2003; Takiuchi *et al.*, 2005, Marley *et al.*, 2008a, Marley *et al.*, 2008b) e hibridização *in situ* (Silva-Frade *et al.*, 2010b). Entretanto, estes testes são considerados laboriosos e caros. Associado a isso, os métodos de controle, que incluem o tratamento com tripsina, parecem ser bastante inconclusivos e não tem a eficácia comprovada na remoção de patógenos nos embriões.

Desta forma, existe a necessidade de desenvolvimento de métodos eficazes na identificação de partículas virais em ovócitos, embriões e outras substâncias como fluído folicular, meios de cultivos e materiais utilizados, a fim de se reduzir o potencial de contaminação dos embriões nos procedimentos de PIV (Marley *et al.*, 2008b).

O presente estudo teve como objeto avaliar o perfil sorológico de fêmeas bovinas oriundas de matadouro por meio de testes de soroneutralização. Adicionalmente, objetivou-se verificar a presença do BoHV1 em estruturas ovarianas destes animais, incluindo tecido ovariano, líquido folicular, ovócitos além do sangue, pela Reação de Cadeia de Polimerase (PCR). Deste modo, buscou-se estabelecer uma correlação entre o título sorológico e a detecção do DNA viral nas amostras dos mesmos animais.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Biotécnicas da Reprodução

No contexto atual do crescimento e evolução tecnológica da pecuária nacional, as biotécnicas da reprodução têm sido estudadas a fim de se aumentar a eficiência destas. Tal fato proporcionaria um incremento genético ainda maior no rebanho em reduzido espaço de tempo, aumentando o número de descendentes e diminuindo o intervalo de gerações.

Seguindo uma ordem cronológica de desenvolvimento e não de importância, as principais biotécnicas resumem-se a Inseminação Artificial (IA), Transferência de Embriões (TE), Produção *in vitro* de embriões (PIV), Transgênia e Clonagem.

A IA é uma técnica que já vem contribuindo para o melhoramento genético do rebanho brasileiro a mais de 60 anos. Por sua simplicidade, baixo custo e maior poder de difusão, em detrimento às outras técnicas, pode-se dizer que é a biotécnica da reprodução animal mais difundida tanto no Brasil quanto no mundo. Segundo relatório anual divulgado pela Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA, 2009), foi comercializado o volume recorde de 8,204 milhões de palhetas em 2008. Esta técnica possibilita que, nas mais distantes fronteiras do país, sejam produzidos animais de excelência na produção de carne e leite, devido a facilidade do transporte do sêmen de touros geneticamente superiores mantidos nas centrais de IA. Contudo, apesar de proporcionar um ganho genético mais baixo em relação às outras biotécnicas, a IA pode promover uma maior variabilidade genética.

O desenvolvimento de protocolos de ovulação múltiplas a partir da década de 80, possibilitou a transferência de embriões coletados em doadoras de alto valor genético (Rodrigues, 2001). Este, logo se tornou um dos métodos mais econômicos e práticos para aumentar a prole de fêmeas com alto valor genético, tanto em rebanhos de bovinos de corte quanto de leite. O emprego comercial da TE aumentou consideravelmente até o ano de 2005, quando voltou a decair novamente, provavelmente por perder espaço no mercado para outra biotécnica, a PIV (Viana et al. 2010). Estima-se que no ano de 2009, foram transferidos um total de 42.397 embriões produzidos *in vivo* no Brasil. Deste total, aproximadamente 30 % foram oriundos de animais de aptidão leiteira e 70 % de animais de aptidão de corte. No mundo, a produção de

embriões *in vivo*/ano já ultrapassa o número de 1.000.000 desde 2003 (Viana et al 2010).

A produção *in vitro* de embriões (PIV) consiste em um conjunto de procedimentos que englobam a punção folicular, para a obtenção dos gametas (ovócitos), a maturação e fecundação *in vitro* (MIV e FIV, respectivamente) dos mesmos em ambiente controlado e o posterior cultivo dos embriões gerados. A PIV demonstra ser uma boa alternativa, pois, segundo Bousquet *et al.* (1999), o número de gestações obtidas de uma doadora por essa técnica, em determinado período de tempo, é muito superior ao obtido pela produção *in vivo*. Tal fato se consolidou principalmente devido a inconsistência na resposta dos protocolos de superovulação observada na TE (Bó et al. 2000).

A técnica da punção ovariana transvaginal guiada por ultrassonografia, também chamada *ovum pick-up* (OPU) foi desenvolvida na década de 80 para a obtenção de complexos *cumulus*-oócito (COC) *in vivo*, proporcionando sua obtenção com um mínimo de trauma para a doadora (Pieterse *et al.*, 1991a e b). Esta técnica substituiu abordagens mais invasivas como a cirúrgica e a laparoscopia, até então utilizadas, sendo considerada, atualmente, o procedimento de eleição para recuperação de ovócitos para a PIV de embriões. Dados atuais relatam que o número médio de COC obtidas por OPU no Brasil chega à 19,9 estruturas (Viana, et al. 2010). Este mesmo autor relata que o número embriões produzidos *in vitro* no Brasil em 2008 chegou à 220.425, representando 66% dos embriões produzidos em todo mundo.

## **2.2. Herpesvírus Bovino 1 (BoHV1)**

### **2.2.1. Caracterização do vírus**

O Herpesvírus bovino 1 pertence à Família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, Gênero *Varicellovirus*. A partícula viral tem entre 70 a 110 nm de diâmetro e é constituída por um capsídeo icosaédrico, composto por 162 capsômeros. Possui ainda envelope glicoprotéico e genoma DNA linear de fita dupla (Figura 1) e caracteriza-se pelo ciclo replicativo rápido (24-48 h), acompanhado de lise das células infectadas (Fenner, 1987).

Este vírus possui uma importante característica biológica que é estabelecer a latência viral no gânglio trigêmio e na raiz do gânglio dorso sacral dos animais infectados, sendo classificados como neurotrópicos (Chowdhury et al., 2000). A duração do estado de portador é provavelmente por toda vida do

animal. Sob condições de estresse ou de terapia com corticóide o BoHV-1 pode ser reativado, criando condições para uma infecção aguda do animal com conseqüente liberação de partículas virais infectantes (Straub, 1990).

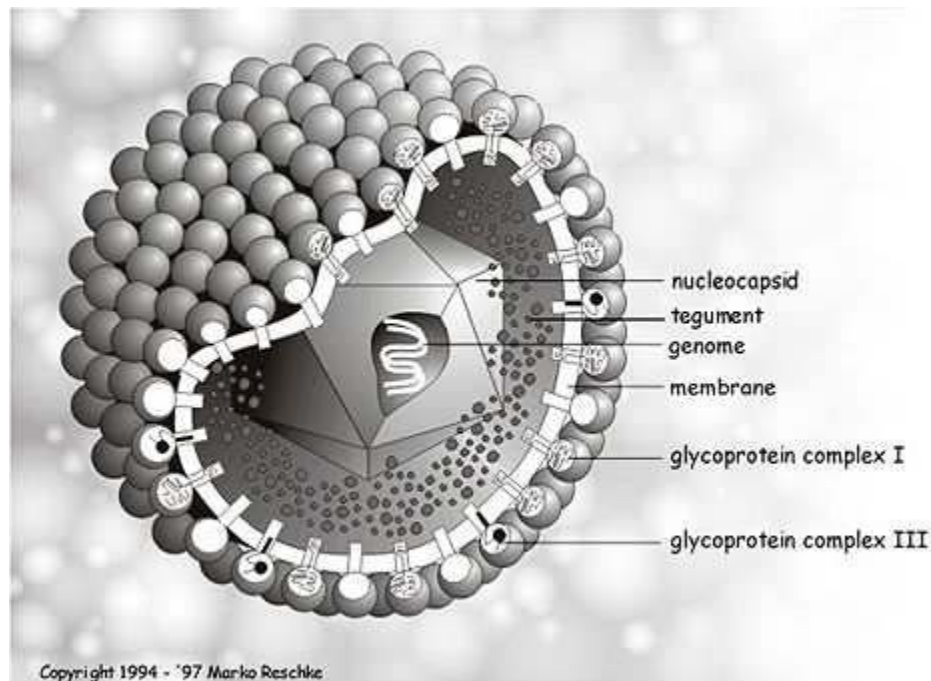


Figura 1. Esquema da partícula viral pertencente a família *Herpesviridae*  
Fonte: The Big Picture Book of Viruses

### **2.2.2. Transmissão e Epidemiologia**

A transmissão do BoHV-1 pode ocorrer por inalação de aerossóis contaminados ou por contato direto com secreções nasais, oculares e reprodutivas dos animais infectados (Anderson 2007). Ambas formas de transmissão são consideradas importantes na disseminação do vírus em rebanhos criados sob condições confinadas (Van Bonkersgoed e Babiuk, 1991). A transmissão indireta ocorre principalmente pela ingestão de água e alimentos contaminados e pelo uso, nas coletas de sêmen, de vaginas artificiais contaminadas (Engels; Ackermann, 1996). Outra forma de transmissão é a venérea, pela monta natural e/ou inseminação artificial (IA) onde, nesta última, o sêmen desempenha papel fundamental na cadeia epidemiológica (Philpott, 1993). Fetos abortados também podem ocasionalmente transmitir o vírus (Givens *et al.*, 2006).

A capacidade de estabelecer latência possibilita que animais infectados após a primo-infecção se tornem portadores inaparentes, e a partir de episódios esporádicos de re-excreção viral se tornem potenciais transmissores

do vírus (Médici *et al.*, 2000). Esta parece ser uma justificativa bem plausível para a grande disseminação do BoHV 1 nos rebanhos.

O BoHV-1 está presente em rebanhos bovinos de praticamente todo o mundo sendo responsável por causar relevantes prejuízos econômicos ligados a doença respiratória e reprodutiva (Wrathall *et al.*, 2006; Marley *et al.*, 2008b). Entretanto, a prevalência de infecções por BoHV1 nos rebanhos bovinos atinge taxas variadas em rebanhos e regiões (Straub, 2001). Baseado em estudos sorológicos, tem sido apontado alguns fatores de risco que influenciam na soropositividade de um rebanho para o BoHV1. A idade, o tamanho do rebanho e o sexo são alguns destes fatores (Solis-Calderon *et al.*, 2003; Boelaert *et al.*, 2005). Particularmente em relação ao sexo, Boelaert *et al.* (2005) apontaram que machos apresentam taxas de soropositividade maiores do que as fêmeas.

Na maioria dos países europeus, a situação é endêmica e as taxas de infecção descritas são muito variáveis. Na Croácia, foram detectados 85,8% de soropositividade para BoHV-1 em um rebanho com alta porcentagem de animais com problemas reprodutivos (Biuk-Rudan *et al.*, 1999). Na Grã-Bretanha, o percentual de rebanhos soropositivos atinge 40 a 50% enquanto na Bélgica, 62%. Por outro lado, Dinamarca e Suíça, possuem baixa frequência de animais soropositivos em consequência da implantação, no passado, de um rígido programa de erradicação com o sacrifício dos animais portadores, obtendo atualmente a condição de países livres do vírus (Ackermann *et al.*, 1990). Na América do Norte, a infecção apresenta caráter endêmico, sendo que os sinais clínicos são controlados por meio de programas de vacinação. Nos EUA, por estar disseminado em todo rebanho, o BoHV-1 é identificado como responsável na maioria dos surtos de abortamentos no país (Anderson, 2007). No Canadá, foram descritas taxas de 37,8% e 59,5% de animais e de propriedades, respectivamente, infectados pelo BoHV-1, sendo que programas imunoproliféricos são de uso rotineiro neste país (Durham & Hassard, 1990).

No Brasil, dados obtidos a partir de levantamentos sorológicos, revelam a expressiva disseminação do vírus em rebanhos de corte e leite. No estado de São Paulo foram encontradas frequências de animais soropositivos de 42,2% por Mueller *et al.* (1981) e de 68,3% por Junqueira *et al.* (2006). No Rio Grande do Sul foram descritas taxas de soropositividade de 81,7% (Ravazzolo *et al.*, 1989), 31,9 % (Vidor *et al.*, 1995), 18,8% (Lovato *et al.*, 1995) e 29,2% (Holz *et al.*, 2009). No estado de Mato Grosso do Sul foi encontrado índices de 50,9%

de soropositividade para rebanhos leiteiros (Tomich *et al.*, 2009). Em um estudo realizado em um rebanho de leite e corte, não vacinado no estado de Goiás, a frequência encontrada foi de 83% de animais soropositivos (Vieira *et al.*, 2003). Em Minas Gerais, um estudo conduzido por Rocha *et al.* (2001) demonstrou que 58,2% dos 5.511 animais testados apresentaram anticorpos contra o BoHV1. No Paraná, a detecção de anticorpos contra o BoHV1 em rebanhos leiteiros foi de 41,9% e em rebanhos de corte foi de 50,8%, perfazendo um total de 43,7% de animais soropositivos (Médici *et al.*, 2000).

Até mesmo em centrais de inseminação, os índices de soropositividade são considerados altos. Tal fato foi demonstrado por Pituco (1988) e Rocha *et al.* (1994) que encontraram uma prevalência de 72,5 e 63,15% respectivamente, em touros de centrais de inseminação de vários estados brasileiros.

### **2.2.3. Patogenia e sinais clínicos**

Uma vez transmitido ao hospedeiro, o BoHV1 pode, dependendo do estado de saúde do animal, estabelecer latência nos gânglios sensoriais do sistema nervoso ou promover a infecção ativa no animal. Sob estado de imunossupressão do animal, devido a fatores estressantes ou terapia com corticóides, o vírus pode ser reativado. A adsorção e penetração dos Herpesvírus nas células hospedeiras são mediadas por várias proteínas do envelope viral (Schwyzer & Ackermann, 1996). A fusão do envelope viral com a membrana plasmática da célula hospedeira esta ligada a um mecanismo comandado pelo nucleocapsídeo e proteínas do tegumento, obtendo acesso ao citoplasma (Fuller & Lee, 1992; Sodeik *et al.*, 1997).

A infecção caracteriza-se por diversas formas clínicas que comprometem os órgãos respiratórios e reprodutivos. Os sinais clínicos sistêmicos da doença, quando presentes, se resumem à febre, anorexia, mucosa nasal hiperêmica, tosse e conjuntivite (Givens & Marley 2008b). O efeito do BoHV-1 nos órgãos genitais está ligado a repetição de estros a intervalos regulares/irregulares, abortamentos, natimortalidade, mortalidade perinatal, redução na fertilidade e infertilidade temporária devido à infecção uterina (Rufino *et al.*, 2006). Segundo Givens e Marley (2008b) os abortamentos causados pelo BoHV1 são mais frequentemente observados do quarto ao oitavo mês de gestação. Acredita-se que os abortamentos são ocasionados a partir do carreamento do vírus por meio de leucócitos sanguíneos até as veias placentárias. A morte do feto ocorre dentro de 24 horas após a entrada do

BoHV1 nestas veias (Givens, 2006). Ainda segundo este autor, os fetos abortados são de coloração uniforme vermelho escura como resultado da inibição da hemoglobina. As lesões nestes fetos incluem focos de necrose no fígado, baço, glândulas adrenais, pulmão e rins.

Nas fêmeas, a forma genital da doença é denominada de Vulvovaginite Pustular Infecciosa. Esta se manifesta clinicamente pelo aparecimento de pequenas vesículas de 1 a 2 mm de diâmetro, as quais evoluem para pústulas e erosões localizadas na vulva e vagina. O epitélio vulvar apresenta-se edemaciado, hiperêmico e com secreção, a qual pode tornar-se mucopurulenta devido à contaminação bacteriana secundária. Este vírus pode também estar associado a uma ooforite necrotizante com inflamação localizada dentro do corpo lúteo quando a infecção acontece durante o período ovulatório (Givens, 2006). Neste caso, as lesões podem afetar a formação do corpo lúteo e consequentemente contribuir para uma queda da progesterona, resultando em falha na prenhez (Miller & Van der Maaten, 1986). Em touros, a manifestação clínica da doença é denominada de Balanopostite Pustular Infecciosa. Neste caso, o vírus pode replicar na mucosa prepucial, pênis e na uretra distal e podendo estar presente no plasma seminal e se associar aos espermatozói de touros infectados. No macho, a Balanopostite produz lesões no prepúcio e no pênis similares as que são encontradas nas fêmeas (Gibbs & Rweyemann, 1977; Wyler et al., 1989).

### **2.2.3. Métodos Diagnósticos**

Por apresentar uma diversidade de sinais clínicos, muitas vezes semelhantes a outras doenças infecciosas, a elaboração de um diagnóstico clínico conclusivo da infecção do BoHV1 é na maioria das vezes improvável. Entretanto, o estabelecimento de um diagnóstico preciso é fundamental para adoção de políticas de profilaxia e controle adequadas de acordo com a distribuição epidemiológica da doença, evitando com isso gastos desnecessários.

Baseado nos sinais clínicos decorrentes do acometimento do sistema respiratório pelo BoHV1, é necessário o diagnóstico diferencial de patógenos como o Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV), Vírus da Diarréia Viral Bovina e bactérias como a *Pasteurella* (Obando et al., 1999). Nos distúrbios reprodutivos, o diagnóstico clínico é praticamente impossível (Takiuchi et al., 2001). O abortamento e as repetições do estro, consideradas as manifestações

clínicas mais evidentes da infecção por BoHV1 devem ser diferenciadas de uma gama de enfermidades e causas não infecciosas que causam os mesmos sinais clínicos. Portanto, conclui-se que, apesar do histórico sanitário do rebanho, os índices de produtividade e os programas de vacinação terem fundamental importância na elaboração do diagnóstico, somente com auxílio das técnicas laboratoriais e moleculares, o diagnóstico do BoHV-1 é considerado conclusivo (Takiuchi *et al.*, 2003).

Os diagnósticos laboratoriais da infecção do BoHV-1 devem ser de caráter etiológico ou sorológico. Entre as principais técnicas de diagnóstico de anticorpos se encontram os testes de soroneutralização (SN) e ensaios imunoenzimáticos (ELISA). A detecção de anticorpos deve ser sensível o suficiente para evitar resultados falso-negativos nos animais, situação observada quando existe um título baixo de anticorpos para determinado vírus. O baixo título de anticorpos é registrado em infecções virais onde o agente é capaz de entrar em latência, como é o caso do BoHV1. Sobretudo nesta situação, o teste de ELISA mostrou ser mais eficiente para detectar anticorpos neutralizantes do que a soroneutralização (Kramps *et al.*, 1994). Tal fato foi comprovado por estes pesquisadores, que comprovaram que o teste de ELISA foi capaz de detectar anticorpos até mesmo em situações onde título destes se encontravam baixos, em animais experimentalmente infectados.

Entretanto, as técnicas de ELISA e soroneutralização têm a característica de serem ineficientes em rebanhos que são profilaticamente vacinados. Neste caso, os títulos sorológicos detectados na sorologia não têm sua real origem detectada. Os anticorpos podem ser tanto de uma possível infecção viral ou devido à exposição vacinal (Takiuchi *et al.*, 2001). Deste modo, se tornam necessários métodos diagnósticos complementares, como técnicas etiológicas ou moleculares. Estes testes incluem o isolamento viral em cultivo celular; técnicas de detecção de antígenos virais como a imunofluorescência e imunoperoxidase; técnicas moleculares de detecção ácidos nucleicos por hibridização *in situ* e reação de cadeia de polimerase (Wyler *et al.*, 1989).

A técnica de isolamento viral é considerada um método etiológico padrão. Entretanto, esta técnica é considerada laboriosa, de custo elevado e inviável considerando o tempo de elaboração e obtenção dos resultados. Além disso, é exigido que as amostras submetidas ao isolamento viral sejam

devidamente acondicionadas e transportadas, de modo que a infecciosidade das partículas virais seja conservada a tempo de serem detectadas pelo isolamento (Kirkbride,1992). O isolamento viral a partir do sêmen, assim como para alguns tecidos específicos, pode ser difícil de ser realizado devido ao potencial de toxicidade das amostras nas monocamadas celulares (Schultz *et al.*,1982). Similarmente a técnica anterior, a imunoperoxidase e a imunofluorescência também requerem a conservação ideal das amostras durante o transporte. Isso porque estes testes exigem fundamentalmente a integridade estrutural da partícula e das proteínas virais (Takiuchi *et al.*, 2001).

Os testes moleculares atendem as premissas de especificidade, sensibilidade e rapidez requeridas por um teste diagnóstico eficiente. Embora seja um método altamente específico, a hibridização *in situ* também pode falhar na detecção do DNA viral em casos de infecção com título viral baixo, como em situações de latência viral. (Belák & Ballagi-Pordány, 1993; Vilcek *et al.*, 1994). Entretanto, este método tem sido utilizado atualmente por pesquisadores na detecção do Herpêvirus (Cardoso *et al.*, 2010; Silva-Frade *et al.*, 2010b).

A técnica de PCR apresenta-se como alternativa rápida, sensível e específica para detecção do vírus em amostras biológicas. A detecção se dá exclusivamente pela identificação do genoma viral, não necessitando a presença de partículas virais viáveis (Hayden *et al.*, 1991; Belák & Ballagipordány, 1993). A técnica de PCR tem contribuído também para a identificação de touros de centrais e vacas doadoras de embriões positivas para o BoHV1 e portanto possíveis portadores do vírus no sêmen e nos ovócitos, respectivamente, impedindo a disseminação do vírus por estes animais. Esta técnica ainda tem a vantagem de detectar o BoHV1 precocemente no sêmen, a partir do quarto dia de infecção, antes mesmo do aparecimento de anticorpos detectáveis pela sorologia (Masri *et al.*, 1996). A PCR ainda proporciona a possibilidade de seqüenciamento genômico das amostras (Xia *et al.*, 1995). A caracterização dos tipos virais circulantes em uma região pode contribuir significativamente com estudos de caráter epidemiológico, antigênico e molecular do BoHV-1 (Takiuchi *et al.*, 2001). O teste de PCR tem sido utilizado não somente como diagnóstico, mas para muitas pesquisas desenvolvidas recentemente (Takiuchi *et al.*, 2003; Takiuchi *et al.*, 2005; Cortez *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2007; Marley *et al.*, 2008a e Marley *et al.*, 2008b).

#### **2.2.4. Métodos de controle**

Uma gama de agentes infecciosos e não infecciosos são capazes de causar redução na fertilidade do rebanho. Com a dificuldade de estabelecer um diagnóstico preciso e rápido contra BoHV1, as práticas de vacinação tem sido aos poucos implementadas na tentativa de controle da enfermidade. Entretanto, essa tendência de vacinação sem o diagnóstico preciso do patógeno reprodutivo produz um gasto excessivo e um ilusório senso de proteção dos animais (Givens *et al.*, 2006b).

As vacinas com vírus vivo modificado contendo o BoHV1 foram utilizadas pioneiramente nos EUA por volta de 1956. Entretanto, este produto foi contestado por anos com relação a sua eficácia e segurança (Zemjanis, 1974). Atualmente, as vacinas de vírus vivo modificado se mostram eficazes na proteção contra o abortamento, desde que aplicadas antes da concepção do animal. Mesmo assim, existem relatos da ocorrência de abortamentos por BoHV1 em animais previamente vacinados com vacinas certificadas (Ellsworth *et al.*, 2003). Além disso, o uso de vacinas vivas modificadas pode causar infertilidade temporária devido a uma necrose folicular em vacas soronegativas (Givens, 2006a). Uma vacina intranasal de vírus vivo foi descrita em 1975 como segura e capaz de proteger os animais em qualquer estágio reprodutivo (Zemjanis, 1974). Por fim, a vacinação utilizando o vírus BoHV1 morto e um único adjuvante também tem mostrado eficaz contra abortamentos causados por esse vírus (Givens, 2006a).

A introdução de vacinas contra o BoHV 1 no mercado brasileiro é muito recente. Somente a partir da segunda metade da década de 90, as primeiras vacinas, importadas dos Estados Unidos, começaram a ser comercializadas no Brasil. Posteriormente, algumas vacinas importadas do Uruguai e Argentina foram introduzidas no mercado brasileiro. Entretanto, apesar de inúmeras pesquisas terem sido realizadas, não existe a comprovação científica da eficiência da imunogenicidade produzida pelas vacinas disponíveis no mercado brasileiro contra BoHV 1 (Silva, 2006).

### **2.3. Avaliação do risco de transmissão do patógenos via biotécnicas reprodutivas**

O número de embriões produzidos no mundo, no ano de 2008, alcançou expressivos 1.077.203 embriões (Viana *et al.*, 2010). Entretanto, apesar dessa elevada quantidade de embriões transferidos no mundo sem reportar a

possibilidade de transmissão de doença, estes riscos devem ser considerados (Perry, 2005).

Comparado ao transporte de animais vivos, o transporte comercial de embriões e sêmen tem notada facilidade logística e controle sanitário. Tal fato tem despertado, cada vez mais, o interesse de pesquisas para o entendimento do potencial de transmissão de patógenos (Le *et al.*, 2001). Esta situação tem justificável preocupação das principais agências regulatórias principalmente por se tratar de um produto comercializado internacionalmente (Stringfellow *et al.*, 2004). Além disso, a garantia de segurança sanitária no comércio de embriões bovinos contribui para minimizar a ocorrência de surtos de doenças ou até mesmo a introdução de uma nova enfermidade no rebanho (Silva-Frade, 2010a).

Segundo a IETS, atualmente ainda não se tem conhecimento de métodos não-letais para avaliar a existência de patógenos em embriões, anteriormente à transferência para as receptoras (Rufino *et al.*, 2006). Entretanto, algumas estratégias básicas têm sido utilizadas com intuito de prevenir e/ou monitorar a transmissão de patógenos de doadoras para receptoras, que incluem: teste da doadora; processamento e/ou tratamento do embrião; teste do recipiente onde foi manipulado este embrião. Destas, o processamento e tratamento dos embriões tem sido realizados com frequência devido à facilidade, custo, eficácia e tempo de execução deste procedimento (Givens & Marley, 2008).

Como descrito, a avaliação do risco de transmissão de um patógeno via transferência de embriões não é fácil de ser determinada. Diferenças na produção de embriões *in vivo* e *in vitro* fazem com que os riscos de contaminação entre estes sejam diferentes. Segundo Bielanski (1997); Perry (2005) o risco de contaminação de um embrião de TE é muito menor que um embrião de PIV. Este fato está relacionado principalmente com dois fatores determinantes, a diferença ultra-estrutural da ZP e diferenças na produção destes embriões. A zona pelúcida de embriões produzidos *in vitro* tem diferenças significativas na estrutura físico-química, devido ao longo tempo de incubação à temperaturas em torno de 39 °C, às forças eletrostáticas e à composição do meio de cultura (Bielaski & Jordan, 1996). Portanto, espera-se maior sensibilidade destes em relação aos embriões produzidos *in vivo* (Pollard & Leibo, 1993). As diferenças na produção dos embriões estão ligadas,

sobretudo, ao uso de diferentes reagentes. Na PIV, por exemplo, são utilizados sistemas de cultivo específicos que, por conter células animais, são uma possível fonte de contaminação embrionária. Os fluidos utilizados *in vitro* também podem ser fonte de contaminação viral, estabelecendo estreita proximidade com o embrião até o momento da transferência (Stringfellow & Givens, 2000).

Portanto, o potencial de transmissão do patógeno por um embrião produzido *in vivo* está ligado à introdução do agente via doadora de embriões, doador de sêmen, reagente de origem animal (Albumina Sérica Bovina (BSA) ou Soro Fetal Bovino (SFB)) ou recipiente em contato com o embrião. Entretanto, no embrião de PIV, o potencial de transmissão de um patógeno está ligada a introdução deste via ovócitos, sêmen, reagente de origem animal e células somáticas utilizadas nos procedimentos de PIV e IVC (Cultivo *in vitro*), respectivamente. Embora a contaminação do ambiente seja improvável de acontecer se forem tomadas todas as precauções sanitárias, esta possibilidade deve ser considerada (Wrathall & Suttmoller, 1998).

Atualmente existe um código de regulamentação de saúde animal, estabelecido pela OIE (World Organisation for Animal Health) (2003) que salienta a necessidade de submeter os procedimentos de PIV a uma avaliação prévia dos riscos quantitativos de transmissão de um patógeno. Esta circunstância, fez com que Perry (2005) criasse um modelo estatístico para prever o risco de transmissão do vírus BoHV1 para embriões de FIV a partir de material coletado de frigoríficos. O software desenvolvido leva em consideração diversas premissas do procedimento de PIV dos embriões. A partir dos dados coletados o programa é capaz de prever o risco de transmissão do vírus aos embriões e a probabilidade mínima de transmissão deste patógeno ao recipiente onde é manipulado estes embriões.

### **2.3.1. Doadores de sêmen**

Nos machos, muitos patógenos têm sido descritos por afetar a fertilidade de touros, causando a doença no trato reprodutivo ou se associando ao sêmen durante a fertilização. O doador de sêmen representa uma fonte potencial de introdução do patógeno em um sistema de produção de embriões (Givens & Marley, 2008b). Além disso, a possibilidade de armazenamento e comercialização fornece uma oportunidade de disseminação de patógenos pelo

sêmen, fazendo com que pontos críticos de controle sejam estabelecidos para um maior controle.

A preocupação com tal fato, fez com que a OIE (2007) estabelecesse um padrão de controle de doenças associado com o a produção de sêmen. Estes requerimentos, assim como para ovócitos, têm o objetivo de permitir o transporte de sêmen, garantindo um negligenciável risco de transmissão do patógeno via sêmen.

Mesmo com as recomendações da OIE e CSS (Certified Semen Services –USA), o risco de transmissão de certos patógenos como o vírus da leucose enzootica bovina, o vírus da língua azul, e o herpesvírus bovinos 1 são desprezíveis quando embriões derivados *in vivo* são posteriormente lavados e tratados com tripsina de acordo com protocolos descritos mundialmente pela IETS (1998). No entanto, a avaliação dos riscos em embriões de FIV é diferente. Na ausência de medidas de biosegurança do sêmen, o vírus da língua azul, o BoHV 1 e o BVDV podem ser facilmente introduzidos e resultar na contaminação de embriões, na qual dificilmente se tornam livres de patógenos, mesmo quando são tomadas medidas preventivas de processamento descritas internacionalmente pela IETS (Wrathall *et al.*, 2006).

### **2.3.2. Ovócitos e doadoras de embriões**

Os ovócitos e as doadoras de embriões são também considerados potenciais fontes de patógenos que podem permanecer associados com embriões (Givens & Marley, 2008a). Conseqüentemente, frente à eficiência não comprovada dos protocolos de desinfecção utilizando tripsina, tem se utilizado o teste da doadora para patógenos específicos 30 dias antes da coleta dos embriões e após apropriado período de incubação.

Se considerarmos embriões de FIV, mesmo que experimentalmente, possam ser produzidos a partir de ovócitos de animais derivado de abatedouro, sem o controle sanitário conhecido, o risco potencial de transmissão de patógenos como o BoHV1 via doadora é um risco potencial que é dificilmente estimado ou reduzido (D'Angelo *et al.*, 2002). Como na maior parte dos frigoríficos mundiais, os animais são submetidos à inspeção antemortem e posmortem, as doenças nas quais geralmente apresentam sinais clínicos são difíceis de estarem presentes. Entretanto, patógenos que não produzem sinais clínicos evidentes, como o BoHV1, consistentemente podem estar associados com os complexos cumulus-ovócito e replicar no ambiente *in vitro* (Bielanski *et*

*al.*, 1993). Neste caso, a remoção das células do cumulus durante o processo de PIV pode minimizar o risco de introdução de patógenos não detectados (Perry, 2007).

Entretanto, o uso de rápidos e sensíveis testes analíticos para detectar patógenos no fluido folicular podem ser utilizados para assegurar que ovócitos infectados não sejam usados para produção de embriões (Galik *et al.*, 2002). Contudo, a eficiência destes testes não é totalmente comprovada. Outra alternativa seria a introdução de anticorpos neutralizantes no fluido folicular, com o intuito de prevenir a replicação de patógenos que seriam detectados usando estes testes. Todavia, a eficácia desta alternativa não foi totalmente confirmada (Galik *et al.*, 2002).

Porém, comercialmente, a PIV de embriões requer que o sistema e seus constituintes estejam livres de doenças específicas, garantindo uma produção embrionária satisfatória pouco variável (Silva-Frade, 2009). Neste caso, os ovócitos recuperados são na maioria das vezes de doadoras com sanidade comprovada, o que dificulta a disseminação de agentes infecciosos. O risco de transmissão de doenças deve-se, provavelmente, aos meios reagentes de origem animal e/ou células somáticas que são utilizados no processo de produção *in vitro* de embriões (Silva, 2005), além de uma possível manipulação indiscriminada dos gametas e embriões durante o procedimento.

### **2.3.3. Meios reagentes de origem animal**

Como a confecção da BSA envolve altas temperaturas (65 a 75 °C por mais de 3 horas), muitos agentes infecciosos podem ser inativados neste processo de produção (Givens & Marley *et al.*, 2008a). Entretanto, é fato que muitos agentes virais possam resistir a este processo de desinfecção. Contrariamente, o SFB não passa por nenhum processo de desinfecção e sua contaminação é comum causando sérias preocupações epidemiológicas (Erickson *et al.*, 1991; Levings & Wessman, 1991). Alguns autores observaram que o SFB é capaz de carrear fungos, bactérias e vírus ao processo de PIV de embriões (Makoschey *et al.*, 2002; Cardoso *et al.*, 2005). Perry (2007) recomenda a utilização do soro fetal somente após tratamento com calor e irradiação gama. Deste modo, espera-se que o uso do soro fetal bovino seja evitado, e se necessário, este deve ser irradiado e/ou testado para patógenos de interesse antes do uso.

#### **2.3.4. Células somáticas**

A maturação dos ovócitos ou cultura dos zigotos até o estágio de blastocisto envolve a utilização de grande variedade de células somáticas nos meios de co-cultura. Entretanto, na maioria das vezes, são utilizadas monocamada de células oriundas de ovócitos ou células do epitélio ciliado de vacas oriundas de abatedouro como suporte para desenvolvimento embrionário em co-culturas. Como estes animais não têm nenhum tipo de certificação sanitária, existe uma considerável possibilidade de que estas células sejam obtidas de animais positivos para uma determinada enfermidade. A infecção dos patógenos a essas células somáticas pode replicar durante o cultivo *in vitro*, dependendo da compatibilidade do sistema de cultura, culminando com o crescimento do patógeno (Givens *et al.*, 2002). Evitar o uso de células somáticas de doadoras que não se conhece o histórico de saúde é aconselhável. No entanto, quando se utiliza co-cultura de células de animais de abatedouro, são necessários testes no fluído folicular e nas culturas de células (Givens & Marley, 2008a).

#### **2.3.5. Recipientes**

Não somente a saúde dos animais, mas a garantia de inocuidade dos recipientes utilizados nos procedimento de PIV são essenciais para garantir a saúde embrionária. A saúde dos embriões transferidos é muito influenciada pela inocuidade dos recipientes dos embriões (Mapletoft *et al.*, 1998; Marley & Givens, 2008a). Alternativas como o uso de materiais descartáveis e tentativas de desinfecção dos recipientes usados com a tripsina são recomendáveis (Edens *et al.*, 2003). Entretanto, quando não se tem garantia do estado de saúde dos animais, são imprescindíveis o teste e isolamento dos recipientes. Atenção maior deve ser com doenças capazes de causar infecções subclínicas persistentes. Quando existir esta possibilidade, medidas de controle devem ter caráter preventivo e os recipientes de manipulação dos embriões devem ser obrigatoriamente testados para estes patógenos antes da introdução na fazenda (Givens & Marley, 2008a).

### **2.4 Métodos de controle de infecção em embriões bovinos**

Além da utilização de sucessivas lavagens com tripsina, proposto pela IETS (1998), novos tratamentos com enzimas proteolíticas e antivirais tem sido estudados como o objetivo de prevenir e minimizar a replicação viral em

gametas e embriões. O objetivo de tais estudos é validar novos tratamentos a embriões e reagentes para meios de cultura. Com isso, se reduz a necessidade de testar embriões e ovócitos das doadoras e os recipientes utilizados neste processo.

#### **2.4.1. Lavagem e tratamento dos embriões com tripsina e outras proteases**

Um método utilizado com objetivo de reduzir o risco de transmissão de doenças por meio de recipientes é manipular e lavar os embriões com tripsina de acordo com o Manual da IETS (1998) antes da transferência. Apesar de bastante estudado e proposto pela IETS, a eficácia do uso da tripsina é um tema muito controverso e inconclusivo.

Neste manual, é descrito que embriões produzidos *in vivo*, que tenham a ZP intacta, visualizada em Microscópio Estereoscópio e que sejam livres de materiais aderidos devem ser lavados no mínimo de 10 vezes em grupos de no máximo 10 embriões da mesma doadora (Stringfellow *et al.*, 1991; IETS, 1998). Este tratamento com tripsina em embriões com a ZP integra e produzidos *in vivo*, demonstrou remover eficientemente o BoHV 1 previamente a transferência (Edens *et al.*, 2003; Makaverich *et al.*, 2007). O tratamento utilizando tripsina a 0,25% (ph 7,6 -7,8) se mostrou bastante eficiente contra múltiplos vírus envelopados (Singh *et al.*, 1983; Stringfellow *et al.*, 1990).

Entretanto, a eficácia destas lavagens não se aplica aos embriões produzidos *in vitro* (Bielanski e Dubuc, 1994; Bielanski *et al.*, 1997; D'Angelo *et al.*, 2002; Edens *et al.*, 2003; D'Angelo *et al.*, 2008). Acredita-se que pelas diferenças ultra-estruturais da ZP, os embriões de FIV sejam muito mais susceptíveis a infecções virais quando comparados aos embriões produzidos *in vivo* (Bielanski *et al.*, 1997). Foi comprovada que a interação espermatozóide/ovócito é capaz de proporcionar um ponto de entrada do vírus, que neste local, encontra-se protegido contra medidas sanitárias, como o tratamento de tripsina (Kubovicova, 2008). Deste modo, alguns autores acreditam que lavagens com tripsina nos embriões de FIV similarmente aos embriões produzidos *in vivo*, não passa de um processo paliativo e pouco efetivo para controlar a infecção (Stringfellow & Givens, 2000).

Enquanto somente tripsina é recomendada como um tratamento enzimático comercial pela IETS, outras proteases são disponíveis comercialmente e tem sido submetidas a testes de eficácia (Bielanski, 2007).

Um exemplo é a hialuronidase, a qual tem se mostrado mais efetiva do que a tripsina em embriões de suínos derivados *in vitro*, para a remoção do vírus da encefalomiocardite, circovirus suíno tipo 2, parvovirus suíno, vírus da síndrome reprodutiva e respiratória (Bureau *et al.*, 2005).

Outros produtos novos, como tripsinas recombinantes que não são de origem animal, também tem sido avaliadas: A TrypZeanT (Sigma), por exemplo, produzida a partir de um gene da tripsina bovina expressa no milho, ainda necessita de maiores comprovações. No entanto, Seidel *et al.* (2007) demonstraram a possível eficácia de tal substância ao diminuir a carga viral aderida em embriões produzidos *in vivo*. Outro produto, TrypLE (Invitrogen) é uma protease similar a tripsina de um fungo recombinante. Estudos preliminares têm mostrado que a TrypLE (10x) quando utilizada por 10 minutos, remove completamente o BHV-1 de embriões bovinos *in vivo* no dia 7 com a ZP intacta (Marley *et al.*, 2006). Surpreendentemente, a eficácia desta substância contra o BoHV-1 tem sido descrita em embriões produzidos *in vitro* quando o produto é usado por 10 minutos numa diluição 1:2 (Marley *et al.*, 2007).

#### **2.4.2. Uso de antivirais**

Pensando no lado prático da questão, a adição de substâncias antivirais em sistemas de produção de embriões *in vitro* poderia se tornar uma excelente opção de controle. As substâncias antivirais agem complementando a imunidade celular e a resposta humoral de anticorpos, na tentativa de deter a multiplicação viral. Um elevado número de agentes antivirais contra BoHV-1 e BVDV tem sido avaliados recentemente em busca de um produto que seja ao mesmo tempo eficiente e atóxico aos embriões (Givens & Marley, 2008a).

Embora o cidofovir (4µg/mL) tenha sido eficiente contra BoHV-1 em cultura de tecidos e também reduzido a replicação viral e os sinais clínicos de animais experimentalmente infectados, Bila *et al.* (1993) reportou que o cidofovir foi letal a embriões de camundongos. O ácido fosfonofórmico, tem sido testado com efeito comprovado inibindo a replicação em cepas de BoHV-1. Utilizado em concentrações de 200 e 400 µg/mL este mostrou efeitos satisfatórios sobre a inibição de Unidade Formadora de Placa (UFP) do BoHV-1. No entanto, apesar de sua eficácia comprovada para eliminação viral, esta substância diminuiu o número de embriões viáveis. Este fato foi comprovado

pela diminuição do número de blastocistos e a diminuição do número de células/blastocistos dos embriões tratados (Marley *et al.*, 2006).

A lactoferrina, uma importante glicoproteína ligante ao ferro é produzida pelas células da mucosa epitelial e tem efeito demonstrado *in vitro* contra alguns agentes virais (Tanaka *et al.*, 2003; Beaumont *et al.*, 2003). Testes com esta substância adicionada aos meios de cultivo têm demonstrado efeitos satisfatórios quanto à inibição do BoHV-1. Contudo, foi constatada uma significativa diminuição na taxa de desenvolvimento de blastocistos (Givens *et al.*, 2007).

O interferon tau desempenha função de reconhecimento materno da gestação e é produzido pelo trofoderma. Utilizado com anti-viral na PIV de embriões bovinos, o interferon tau recombinante bovino parece inibir a replicação do BVDV mas não diminuiu a replicação do BoHV-1 em células MDBK (Galik *et al.*, 2006). Corroborando com essas informações, Peek *et al.* (2004) também verificou a ineficiência do interferon no controle ao BoHV-1. Deste modo, ainda não foi descrito um efetivo tratamento antiviral preventivo contra o BoHV-1 nos sistemas de cultivo de embriões.

#### **2.4.3. Medidas alternativas de controle**

Como já descrito, a comprovação da capacidade de transmissão de doenças via SFB tem se tornado um problema significativo (Erickson *et al.*, 1991). Alguns autores têm obtido alternativas para substituição desta substância. O uso de macromoléculas não protéicas, mais especificamente o álcool polivinílico (PVA), tem sido discutido com intuito de se substituir os produtos de origem animal nos sistemas de cultivo *in vitro*, diminuindo assim o risco de transmissão dos patógenos (Silva-Frade, 2009). Ainda segundo Seidel *et al.* (1990) e Nowshari e Brem (2000), o PVA é uma alternativa sintética que pode substituir o SFB nos procedimentos de PIV sem comprometimento aparentes ao desenvolvimento embrionário.

Trabalhando com o vírus BoHV 5 e comparando o efeito da substituição do SFB pelo PVA na taxa de fertilização embrionária, Silva-Frade *et al.* (2010a) relatou que o efeito negativo da infecção viral foi observado apenas em ovócitos maturados em meio contendo SFB. Todavia, ovócitos infectados maturados em meio com PVA tiveram taxa de fertilização semelhante ao grupo controle não infectado. O fato da viabilidade viral em meio com PVA ser reduzida pode ser explicada por esta substância ser constituída de moléculas

não protéicas, dificultando a adsorção viral. Além disso, o PVA pode fornecer maior estabilidade à membrana do ovócito favorecendo a fecundação (Merten *et al.*, 1999).

Além disso, tem sido estudado o efeito de análogos da BSA oriundo de espécies heterólogas na tentativa de substituição do SFB e do BSA na produção de embriões *in vitro*. Apesar de não ter apresentados resultados muitos satisfatórios, Tetzner (2007) avaliou o uso da ovalbumina (OVA) na PIV de embriões bovinos. Por ser proveniente de uma espécie heteróloga (de aves), esta alternativa tem a vantagem de representar um menor risco de transmissão de patógenos aos embriões bovinos.

## **2.5 Potencial de interferência do BoVH 1 em gametas e embriões bovinos**

Estudos recentes sobre causas de alterações reprodutivas no rebanho bovino têm focado o BoHV-1, por ser este ser considerado o agente viral mais conhecido na esfera reprodutiva (Brock, 1998). Fato que se deve principalmente pelo impacto econômico deste vírus (Wrathall *et al.*, 2006).

A infecção viral em células embrionárias é uma possibilidade muito importante a ser considerada. Uma das possíveis formas dessa infecção é por meio dos gametas, podendo comprometer o embrião, o feto ou, subseqüentemente, o animal recém-nascido. Nesse tipo de infecção, o patógeno pode estar associado ao ovócito, no momento da fecundação, ou ser carregado para o seu interior por meio da fusão com o espermatozóide contaminado. Desse modo, a infecção pode ocorrer antes ou durante a fecundação (Wrathall & Sutmöller, 1998). O BoHV1 já demonstrou a capacidade de se ligar a espermatozoides e ovócitos e ser transmitido por animais clinicamente sadios (Wrenzycky *et al.*, 2007). Entretanto, a natureza destas ligações e o potencial de interferência do vírus nestas células ainda necessitam ser profundamente entendidos.

### **2.5.1 Contaminação em ovócitos**

Em relação à contaminação dos ovócitos, um dos principais pontos de resistência a ser considerado é a Zona Pelúcida (ZP). A ZP é uma matriz extracelular única que envolve o ovócito e também o embrião em sua fase inicial, e que confere especificidade na fertilização, bloqueio à polispermia e proteção durante os estádios iniciais do desenvolvimento embrionário. Betteridge (1995) verificou que a ZP de bovinos e ovinos possui entre 10 e

15µm de espessura. A partir deste dado, conclui-se que a maioria dos patógenos é incapaz de migrar passivamente através da ZP intacta e infectar as células dos embriões coletados (Stringfellow & Givens, 2000), visto que partículas com o diâmetro de 40-100 µm permanecem retidas na ZP (Vanroose et al., 1999). No entanto, discordâncias a cerca do tamanho dos poros da ZP, tem feito com que autores revisem suas perspectivas de proteção desta membrana. Segundo Vanroose et al. (2000) e Makarevich et al. (2007) os poros externos da ZP são suficientemente grandes para permitir a transposição do vírus BoHV 1.

Guerin et al. (1990) estudaram o efeito do BoHV-1 em grupos de ovócitos que foram expostos ao vírus durante a maturação e fecundação. O vírus parece não ter efeito na maturação dos ovócitos, porém reduziu significativamente a taxa de fecundação. Estes achados foram mais tarde comprovados por Bielanski e Dubuc (1994) que demonstraram que a infecção de ovócitos com BoHV1 reduziu a taxa de formação de blastocistos. Os autores concluíram que o BoHV-1 não somente foi adsorvido ao gameta como também prejudicou sua habilidade de fecundar, possivelmente devido ao fato de alterar a penetração espermática ou afetar o mecanismo de interação intracelular de fusão.

Entretanto, apesar do efeito prejudicial comprovado, o carreamento do vírus através da zona pelúcida para o interior dos ovócitos, no momento da fecundação *in vitro*, nunca foi descrito na espécie bovina (Wrathall et al., 2006). Segundo a IETS (1998) são necessárias mais pesquisas sobre a interação de patógenos com oócitos fecundados *in vitro*.

Finalmente, enquanto está claro o papel da ZP como barreira mecânica contra a infecção viral, esta estrutura parece atuar similarmente como veículo passivo da infecção de alguns vírus, dentre eles o BoHV1 (Rufino et al., 2006). Alguns patógenos virais, entre eles o BoHV1, tem a capacidade de se aderir a ZP de embriões e ovócitos e contaminar o animal quando este, receber o embrião juntamente com o vírus aderido ou até mesmo o próprio embrião durante sua eclosão.

### **2.5.2 Contaminação em espermatozóides**

Nos machos, o vírus parece se associar ao sêmen após reativação viral, desencadeada por alguns fatores estressantes (Van Wagtendonk-de Leeuw et

*al.*, 2000). Dentre estes fatores incluem o transporte e vacinação dos animais, variações bruscas de temperatura, entre outros. O vírus replica inicialmente na mucosa do prepúcio, pênis e uretra. Posteriormente, o vírus presente nas mucosas infectadas contamina o sêmen no momento da ejaculação (Muylkens *et al.*, 2007; Wrenzycki *et al.*, 2007; Givens e Marley 2008b). Acredita-se que existe uma maior possibilidade do plasma seminal de conter o vírus comparado ao espermatozóide (Vogel *et al.*, 2004). Estudos indicam que uma vez infectados, os bovinos podem eliminar o vírus pelo sêmen durante toda sua vida (Van Oirschot, 1995). Por outro lado, existem indicadores que o sêmen de animais soropositivos para BoHV1 pode ser livre de vírus por prolongados intervalos, se os touros forem bem manejados em um ambiente de baixo estresse (Eaglesome & Garcia, 1997).

Embora o BoHV1 não afete a motilidade espermática ou a integridade acrossomal (Tanghe *et al.* 2005; Givens e Marley 2008b), tem sido descrito o efeito da enfermidade na qualidade seminal. Entretanto, este fato parece estar ligado mais ao efeito da doença generalizada no animal do que o efeito direto do vírus no espermatozóide (Van Oirschot, 1995; Vogel *et al.*, 2004). Diversos autores tem detectado a presença do BoHV-1 no sêmen bovino empregando a técnica de PCR (Silva-Frade, 2009). Surpreendentemente, autores relataram a detecção do BoHV-1 também em amostras de sêmen de touros soronegativos (Parsonson & Snowdon, 1975; Kupferschmied *et al.*, 1986).

A associação do BoHV1 com o espermatozóide representa um caminho potencial para infecção de um ovócito durante a fertilização (Tanghe *et al.*, 2005). O efeito deletério da infecção viral em espermatozóides foi comprovado quando estes foram expostos ao BoHV-1 durante a FIV. A infecção levou ao comprometimento no desenvolvimento embrionário (Makarevich *et al.*, 2007), além de reduzir a taxa de clivagem e de formação de blastocistos (Vanroose *et al.*, 1999).

### **2.5.3. Contaminação de embriões**

Como dito, a ZP tem importância fundamental na proteção dos embriões (Bowen, 1979). Apesar da demonstração que migrações passivas do vírus através da ZP são muito improváveis de acontecer, acredita-se que partículas virais aderidas poderiam dificultar o processo de penetração do espermatozóide no ovócito pela ZP (Vanroose *et al.*, 1999). Bowen (1979) sugere que o vírus aderido na ZP ou no espermatozóide poderia penetrar no

ovócito no momento da fertilização. Já Wrathall & Suttmöller (1998) sugerem ser extremamente improvável que isso ocorra, pois os canais da zona pelúcida deixados pelas expansões das células da corona radiata ou pela passagem do espermatozóide se fecham muito rapidamente. Contradições verificadas em pesquisas comprovam que este assunto ainda parece bastante obscuro.

Descartando a possibilidade de migração através da ZP dos ovócitos e embriões, sobrariam algumas possibilidades para creditar o insucesso do desenvolvimento embrionário de embriões contaminados.

Primeiramente devemos considerar a possibilidade de infecção de um embrião durante a fertilização. Alguns pesquisadores acreditam na capacidade de contaminação do embrião durante sua fusão com a célula espermática (Wrathall & Suttmöller, 1998; Vanroose *et al.*, 2000), visto que, durante este processo são formadas fissuras e escavações capazes de proporcionar a entrada do vírus. Além disso, a formação destas fissuras poderia contribuir para proteger o vírus de medidas sanitárias de controle, como tratamentos com tripsina (Kubovicova, 2008).

Outra possibilidade, proposta por Archbald *et al.* (1979) seria que a simples presença do vírus, mesmo aderido externamente a ZP do embrião, poderia contribuir para falhas no desenvolvimento embrionário. Apesar de terem trabalhado com BVDV, estes autores, observaram que mesmo a ZP se mostrando normal e íntegra, partículas virais seriam responsáveis pela criação de um ambiente desfavorável ao cultivo e desenvolvimento embrionário, contribuindo para inibição do desenvolvimento deste. Este ambiente prejudicial ao cultivo embrionário possivelmente está ligado à liberação de toxinas e metabólitos pelas partículas virais. Tal fato foi comprovado com BoHV1 mais tarde por Vanroose *et al.* (1999), que obtiveram taxas de clivagem e de formação de blastocistos significativamente reduzidas, após a exposição ao vírus durante a etapa de FIV.

Não menos importante, seria a possibilidade de interferência do vírus no processo de fusão espermatozóide/ovócito. Vários estudos têm sido conduzidos a fim de se mostrar a real interação do vírus com o processo de fertilização (Tanghe *et al.*, 2005). Trabalhos demonstram que o BoHV-1 não é somente adsorvido aos gametas, como também prejudica a fertilização *in vitro*, possivelmente devido a efeito sobre a penetração espermática ou interação com mecanismos intracelulares de fusão (Guerin *et al.*, 1990). Foi demonstrado

uma redução de até 60% no número de espermatozoides aderidos a ZP devido ao efeito da incubação prévia com o BoHV 1 (Vanroose *et al.*, 2000). Esta diminuição é influenciada principalmente pelo título viral, visto que, foi comprovada a existência de uma relação inversamente proporcional entre a ligação do espermatozoide à zona pelúcida com o título do BoHV-1 (Tanghe *et al.*, 2005; Makaverich *et al.*, 2007). De acordo com Choi *et al.* (2008) o BoHV-1 pode ser responsabilizado por modificar as propriedades elétricas da membrana plasmática por alterações nos gradientes de catiônicos ou interações com as proteínas da membrana que modulam os canais iônicos. Já Tanghe *et al.* (2005) relatam a presença do vírus na região equatorial da cabeça de espermatozoides contaminados. Isto sugere que o BoHV1, além de interferir na ligação espermatozoide/ovócito, poderá também comprometer outras etapas subseqüentes da fertilização, que incluem a ligação espermatozoide/oolema e fusão espermatozoide/ovócito. Adicionalmente, estes autores afirmam que o efeito inibitório do BoHV1 sobre a ligação espermatozoide/ovócito se dá, sobretudo, pela ocupação de receptores específicos responsáveis por promover a ligação entre os gametas masculino e feminino.

Inúmeros trabalhos mostram o efeito prejudicial da contaminação com BoHV1 sobre a taxa de fertilização e desenvolvimento embrionário. Bielanski e Dubuc (1994) relataram que a proporção de blastocistos morfologicamente normais foi reduzida quando esses foram produzidos no sistema de PIV, infectado com BoHV-1. Além disso, Makarevich *et al.* (2007) observou comprometimento no desenvolvimento embrionário pré-implantação após exposição ao BoHV-1, concluindo que a conseqüência da infecção viral na viabilidade dos embriões pode depender do título viral. O comprovado efeito do vírus sobre as células embrionárias foi demonstrado por Vanroose *et al.* (1996). Neste estudo, os embriões com zona pelúcida intacta foram protegidos contra a exposição. Contudo, os blastocistos expandidos, quando expostos ao BoHV-1, apresentaram antígenos virais em aproximadamente 13% de suas células e degeneraram.

A remoção das células do cumulus durante o processo de produção do embrião *in vitro*, que pode ser considerada uma medida de controle por evitar a introdução e amplificação de patógenos não detectados segundo Bielanski *et al.* (1993) e Perry (2007).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Localização e período experimental**

O experimento foi realizado em três fases, como a seguir: a coleta do material, os testes sorológicos e os testes biomoleculares.

A coleta do material foi realizada no Frigorífico Sabor de Minas, localizado no município de Muriaé, Minas Gerais, coordenadas 21° 08' Sul e 42° 22' Oeste. Os testes sorológicos foram realizados no Laboratório de Virologia Animal. No Laboratório de Biologia Molecular (Biomol), foram realizados todos os testes moleculares. O acondicionamento e processamento do material coletado no frigorífico, antes de ser testado, foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal (LRA). Estes três laboratórios estão localizados no Departamento de Veterinária (DVT) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

O experimento teve início no mês de abril do ano de 2010, quando as amostras a serem testadas começaram a ser coletadas e o trabalho se estendeu até o mês de janeiro de 2011. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Departamento de Medicina Veterinária, tendo o registro confirmado na data de 29 de março de 2009.

#### **3.2. Seleção dos animais e coleta das amostras**

Anteriormente à coleta das amostras, foram rastreadas todas as propriedades onde não se praticava a vacinação do rebanho contra o BoHV1. Todas as amostras coletadas foram oriundas de animais destas propriedades. Os animais aparentemente não apresentavam sinais clínicos para a doença. As amostras coletadas de sangue e ovários foram coletadas durante a sangria e a evisceração dos animais, respectivamente. As amostras sanguíneas foram coletadas com tubos à vácuo com e sem anticoagulante, e dos mesmos animais foram coletados os ovários, armazenados em recipientes plásticos estéreis individuais. Ao fim da coleta, os ovários e o sangue com anticoagulante foram acondicionados em uma caixa térmica à temperatura de aproximadamente 4 °C e transportados até o laboratório por um período máximo de duas horas, a exceção do sangue sem anticoagulante que era transportado à temperatura ambiente.

### **3.3. Manipulação dos ovários e processamento das amostras**

No LRA, os ovários de cada animal foram puncionados com agulhas descartáveis de 25 x 7 gauge. Primeiramente, o fluido folicular do folículo dominante foi aspirado, quando presente, para obtenção da alíquota do líquido folicular. Este líquido, contendo também células, foi centrifugado à 600 G por 20 minutos para a separação completa do líquido folicular. As alíquotas de ovócitos foram provenientes da aspiração de todos os outros folículos do ovário. Estes ovócitos, após a aspiração, foram lavados por três passagens sucessivas em microgotas de água ultrapura autoclavada e posteriormente congelados na água em microtubos estéreis. Após a aspiração, para obtenção das amostras de tecido ovariano, foram utilizadas lâminas de bisturi para realização de cortes transversais no ovário que se aprofundavam, na maioria das vezes, até a região vascular. As amostras sanguíneas sem anticoagulante foram mantidas em banho-maria à 37 °C por 15 minutos e posteriormente centrifugadas à 860 G por cinco minutos para facilitar a separação do soro que, posteriormente, foi transferido para microtubos.

Após o processamento, os fragmentos de tecido ovariano, o líquido folicular, os complexos *cumulus*-ovócitos e as amostra de sangue de cada animal foram identificadas e acondicionadas à -20 °C até serem encaminhadas para análise no Biomol, onde foram realizadas a detecção do DNA viral pela PCR. As amostras de soro foram inativadas à 56 °C por 30 minutos antes de serem congeladas e remetidas ao Laboratório de Virologia Animal – DVT, para realização da sorologia em microplacas.

### **3.4. Teste sorológico**

#### **3.4.1. Manutenção de culturas celulares**

Foi utilizada a linhagem celular Madin & Darby Bovine Kidney (MDBK) para a reação de soroneutralização e para a multiplicação das estirpes virais em garrafas de poliestireno descartáveis para cultivo celular TPP®, com área de 75 cm<sup>2</sup>. As culturas de células foram cultivadas em monocamadas. Como meio de manutenção, utilizou-se o “Minimum Essential Medium” Cultilab®, filtrado em filtro Millipore de 0,22 µm, pH 7, com adição de antibiótico, acrescido de 0,2% de bicarbonato de sódio e de 5% de soro fetal bovino (SFB) Cultilab® livre de *Pestivirus* e de anticorpos contra o BVDV. As garrafas com

culturas celulares foram mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> a temperatura de 37 °C por um período de 72 horas.

#### **3.4.2. Multiplicação viral**

A amostra do BoHV-1 cepa "Los Angeles" (BoHV1-LA) foi multiplicada em células MDBK cultivadas em monocamada, como descrito no item 3.4.1.

Para a multiplicação do vírus padrão, foi inoculado 200µL da suspensão do BoHV-1 nas garrafas com monocamada de células, formada após 24 horas a partir do sub-cultivo inicial, logo após a remoção do meio de manutenção. O sistema foi incubado em estufa de CO<sub>2</sub> à temperatura de 37 °C por um período de 60 minutos, para a adsorção do vírus às células.

Transcorrido esse tempo, foram adicionados 5mL do meio de manutenção. Novamente a garrafa foi submetida à incubação em estufa à temperatura de 37 °C até que as células em confluência apresentassem aproximadamente 80% de efeito citopático (ECP).

Assim que a monocamada apresentou o ECP desejável, o inóculo foi submetido a três eventos de congelamento e descongelamento compreendidos na retirada e colocação da garrafa de cultivo no freezer a -20 °C. Em seguida o conteúdo foi aliquoteado em criotubos e armazenados a -80°C.

#### **3.4.3. Titulação Viral**

Uma das alíquotas (item 3.4.2) foi descongelada e submetida à titulação viral. A metodologia utilizada foi a preconizada pelo "Manual of Diagnostic Tests and Vaccines of Terrestrial Animals" (OIE, 2005) denominada de "Tissue Culture Infective Dose" (TCID<sub>50</sub>).

Para a titulação viral foi utilizada placas de microtitulação descartáveis de 96 cavidades. A alíquota de vírus descongelada foi diluída em meio de manutenção, em escala logarítmica seriada de base 10 (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-8</sup>), mantendo sempre os microtubos em banho de gelo para evitar a queda do título viral. Em cada uma das oito primeiras colunas da placa de microtitulação foi colocada a respectiva diluição (a primeira coluna recebeu a diluição 10<sup>-1</sup> e assim por diante, até que a oitava coluna recebeu a diluição 10<sup>-8</sup>).

Posteriormente, foi acrescentado em cada poço da placa, 50µL de suspensão de células MDBK. As colunas de número nove e 10 foram os controles celulares e receberam 50µL de meio e a suspensão celular na mesma quantidade do restante da placa. Terminado esse procedimento, a

placa foi incubada em estufa à temperatura de 37 °C em atmosfera controlada com 5% de CO<sub>2</sub>. Decorridas 72 horas, a placa foi observada em microscópio invertido para pesquisa dos efeitos citopáticos característicos do vírus nas oito diferentes diluições. O título viral foi calculado segundo o método de Reed & Muench (1938).

#### **3.4.4. Pesquisa de anticorpos neutralizantes**

O diagnóstico sorológico das amostras foi realizado por meio das provas de soroneutralização em microplacas de acordo com a metodologia proposta por "Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines" (OIE, 2008) e o protocolo seguido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Governo Brasileiro.

Os testes de soroneutralização (SN) foram realizados em microplacas de 96 cavidades (CORNING COSTAR®). Entretanto, a fim de pesquisar uma maior faixa de variação sorológica, optou-se por fazer a diluição seriada nas linhas e não nas colunas, como é utilizado convencionalmente. Desta forma, em cada placa confeccionada, foi possível avaliar oito amostras de soro. Contudo, como foi realizada duplicata de cada amostra, foram testadas somente quatro amostras por placa.

Seguindo a metodologia preconizada, na primeira linha foram adicionados 100µL de meio MEM, nas demais linhas foram acrescentados 50µL do mesmo meio. Em seguida, foram adicionados 50µL da amostra sorológica na primeira e segunda linha. A diluição do soro se deu entre as linhas 2 e 12 da microplaca e foram utilizadas diluições na base 2 crescentes do soro, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024. Dessa forma, cada diluição do soro ocupou uma linha da microplaca (12 cavidades) em ordem decrescente de concentração. Posteriormente às diluições, cada cavidade recebeu uma dose constante de vírus, contendo 100 TCID<sub>50</sub>/50µL do isolado BoHV1 LA, com exceção à linha 1. Após incubação da mistura sorovírus por 1h a 37°C, em estufa com atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub>, uma suspensão de células MDBK de 50µL na concentração de 300.000 células/mL foi adicionada, seguida novamente de incubação em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. A leitura dos testes se procedeu após 72h de incubação, por meio do monitoramento do efeito citopático. Foram utilizados em cada prova o controle do vírus, um controle de amostra e o controle de células MDBK. A

interpretação do teste considerou positiva a amostra de soro que neutralizou o vírus a partir da diluição 1:2. Foram considerados como títulos de anticorpos neutralizantes, o inverso das maiores diluições do soro capazes de inibir a replicação viral e conseqüente produção de efeito citopático. Cada soro foi testado em duplicata e a medida de anticorpos neutralizantes foi calculada pela média aritmética das repetições.

### **3.5.Extração do DNA e Análise das Amostras por Reação de Cadeia de Polimerase (PCR)**

As amostras de sangue com anticoagulante, tecido ovariano, líquido folicular e ovócitos, que foram analisadas por PCR, foram previamente submetidas ao processo de extração de DNA total, de acordo com as recomendações do fabricante do Kit de extração SV Wizard Genomic (PROMEGA).

A reação de PCR e sequência de oligonucleotídeos utilizada foi realizada de acordo com o descrito por Takiuchi et al. (2005). Os oligonucleotídeos utilizados foram o P<sub>3</sub> (senso): 5' GCTGTGGGAAGCGGTACG 3' (nt 351-368) e P<sub>4</sub> (anti-senso): 5' GTCGACTATGGCCTTGTGTGC 3' (NT 817-796), designado para amplificar um fragmento de 468 pares de base. A reação de PCR foi constituída por uma solução contendo 2,5µL de DNA a ser testado e 22,5 µL de mix-PCR contendo: 10pmol de cada primer, 1,5mM dNTP (Promega®), 1,5 unidades de Taq DNA Polimerase Recombinante (phONEUTRIA®), Tampão PCR 1x (100 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl e 1% Triton X-100), 1,5mM MgCl<sub>2</sub> e água ultrapura autoclavada para completar o volume final de 25µL. Após a confecção, a solução foi transferida para o termociclador (MJC, Inc. PTC-100). O ciclo desta reação foi constituído de uma parada de quatro minutos à 94 °C, seguido por 40 ciclos de um minuto à 94 °C, 1 minuto à 60 °C e um minuto à 72 °C. A etapa final de extensão foi de sete minutos à 72 °C. As amostras amplificadas foram armazenadas à -4°C ou analisadas imediatamente.

Para observação dos resultados das ampliações, aproximadamente 5µL das reações de amplificação foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1%, diluído em tampão TBE 0,5X (TRIS 1M pH 8,3 50mM, Ácido bórico 45mM, EDTA 0,5M pH8,0 0,5mM) sob uma voltagem constante de 90V por aproximadamente 45 minutos. O gel foi posteriormente visualizado sob a

luz Ultravioleta (UV) e registrados fotograficamente. Para a comparação dos fragmentos amplificados foram utilizados marcadores padrões de 100 pb (Marcador DNA Leader).

### **3.6 Análise estatística**

As variáveis qualitativas foram comparadas em tabelas de contingência e analisadas pelo teste de qui-quadrado a 5% de probabilidade (Sampaio, 2002).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a realização dos testes sorológicos, observou-se que sete amostras de soro apresentaram-se insuficientes ou tóxicas ao cultivo celular, por isso foram descartadas. Um total de 140 amostras foram avaliadas por soroneutralização. Os resultados referentes aos testes sorológicos encontram-se expostos na Tabela 1 e Figura 2.

Tabela 1 – Detecção de anticorpos para BoHV-1 em amostras sorológicas dos animais de frigorífico (N=140)

<b>Classificação Sorológica</b>	<b>Titulação</b>	<b>N</b>	<b>Porcentagem (%)</b>
Negativo	Negativo (Título < 2)	23	16,4
Positivo	Título Baixo ( $2 \leq X < 8$ )	14	10,0
Positivo	Título Médio ( $8 \leq X < 64$ )	46	32,9
Positivo	Título Alto ( $64 \leq X \leq 512$ )	57	40,7
<b>TOTAL</b>		<b>140</b>	<b>100,0</b>

Os títulos de anticorpos anti-BoHV1 foram divididos em 4 grupos. Negativos (título < 2); Título baixo ( $2 \leq$  título < 8); Título médio ( $8 \leq$  título < 64) e Título alto ( $64 \leq$  título  $\leq$  512).

O índice de 83,6% de animais soropositivos verificado no presente trabalho se aproxima muito dos 81,7% observado por Ravazzolo et al. (1989) e dos 83% registrados por Vieira et al. (2003). Entretanto, muitas vezes os trabalhos descrevem avaliações sorológicas realizadas em rebanhos que já apresentam problemas reprodutivos (Vidor *et al.*, 1995; Médici *et al.*, 2000; Vieira *et al.*, 2003). Nesta situação, a amostragem considerada viciada pode acabar mascarando uma situação real, diferente de quando os testes são realizados de forma aleatória, como no presente trabalho. A alta frequência de animais positivos no presente estudo pode demonstrar uma alta disseminação do vírus na região pesquisada. Este fato é justificável fundamentalmente pela dificuldade de controle e a facilidade de disseminação da doença, principalmente se considerarmos a transmissão a partir da re-excreção viral de animais com infecção latente (Médici *et al.*, 2000).

Nota-se que os animais soropositivos foram divididos em subgrupos de acordo com o título sorológico. Esta divisão de acordo com intensidade do título sorológico, apesar de não ser descrita na literatura, facilita a avaliação da condição infectante do vírus no animal. Animais que apresentam títulos

sorológicos altos, provavelmente encontram-se com alta carga viral circulante e manifestando a forma ativa da doença, justificando o elevado título de anticorpos circulantes. Contrariamente, um animal com título sorológico baixo possivelmente apresenta uma baixa carga viral circulante ou estado de latência da partícula viral, logo, a resposta imune não é muito significativa. A latência de animais infectados foi caracterizada por baixos níveis de anticorpos circulantes após a infecção com cepas de BoHV-1 por Gibbs e Rweyemamu (1977) e Straub (1990) ou após a vacinação (Pastoret et al. 1982). Estes baixos níveis de anticorpos muitas vezes não são nem mesmo detectáveis por meio da técnica de soroneutralização (Takiuchi *et al.*, 2001).

A distribuição do número de animais soropositivos de acordo com título sorológico de anticorpos para o BoHV-1 está sumariada na Figura 2. É possível observar que os animais foram regularmente distribuídos nos diferentes títulos sorológicos. Entretanto, o maior número de animais foi observado com os títulos 32 e 64.

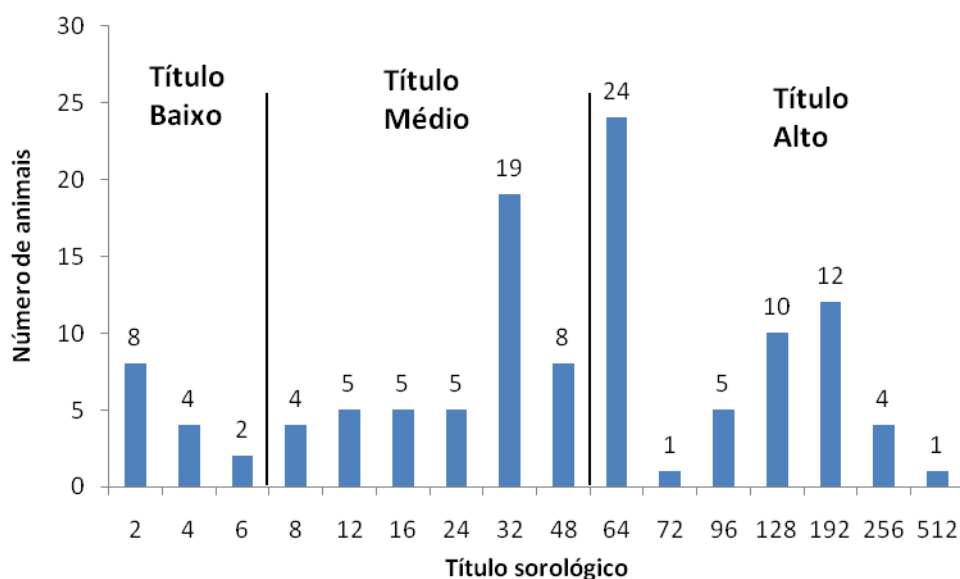


Figura 2. Distribuição dos animais de acordo com os títulos sorológicos de anticorpos anti-BoHV1 entre os soropositivos.

A avaliação por meio da Reação de Cadeia de Polimerase (PCR) se deu em amostras de tecido ovariano, sangue, líquido folicular e ovócitos. Entretanto, o número de amostras avaliadas para cada grupo foi diferente, dependendo da dificuldade específica de coleta de cada tipo de amostra. A redução do número de amostras de ovócitos e líquido folicular é justificada pela

impossibilidade de coleta destas amostras em alguns ovários de animais que possivelmente se encontravam em situação de anestro. Estes ovários apresentavam-se pequenos, duros e lisos, sem presença de folículos. A redução das amostras de sangue foi devido à quebra dos tubos no transporte pós-coleta.

Os resultados observados na PCR estão sumariados na Tabela 2.

Tabela 2 – Detecção de DNA viral em estruturas ovarianas e sangue por meio da PCR nos animais de frigorífico

<b>Tratamento</b>	<b>PCR positivo dos animais soropositivos</b>	<b>PCR positivo dos animais soronegativos</b>	<b>Total de animais avaliados</b>
Ovócitos	1/115 (0,9%)	0/29 (0,0%)	144
Líquido folicular	0/114 (0,0%)	0/29 (0,0%)	143
Tecido ovariano	5/117 (4,3%)	0/30 (0,0%)	147
Sangue	3/108 (2,8%)	0/27 (0,0%)	135

As diferenças não foram significativas ( $P > 0,05$ ) pelo teste do qui-quadrado.

Como esperado, nenhuma amostra de animais sorologicamente negativos apresentou DNA do vírus BoHV-1. Portanto, o DNA viral foi detectado somente nos grupos de amostras soropositivas. Foi evidenciado o DNA viral em todos os grupos amostrais, exceto no líquido folicular. Comparando os resultados entre os grupos de amostras, as diferenças não se mostraram significativas ( $P > 0,05$ ). A detecção do DNA do BoHV-1 pela PCR no sangue e tecido ovariano pode ser visualizada nas figuras 3 e 4, respectivamente.

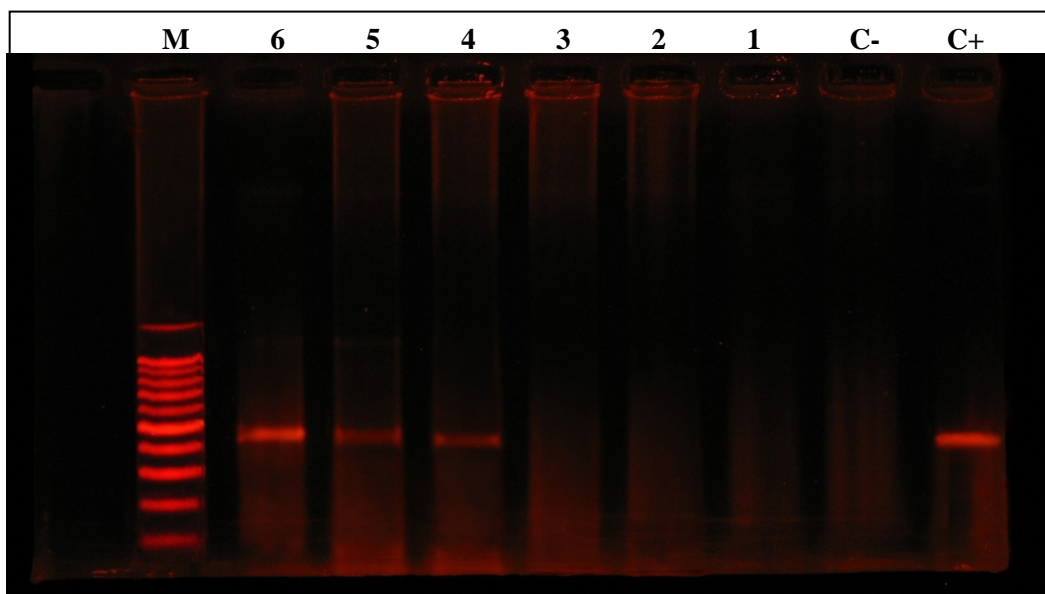


Figura 3. Análise em gel de agarose 1% dos produtos da PCR demonstrando a detecção do agente viral no sangue. [C+: Controle Positivo; C-: Controle Negativo; M: Marcador de DNA Ladder 100 pb; Amostras 1, 2, 3 (Amostras Negativas); Amostras 4, 5 e 6: visualização do fragmento do genoma viral amplificado por PCR (Amostras Positivas)].

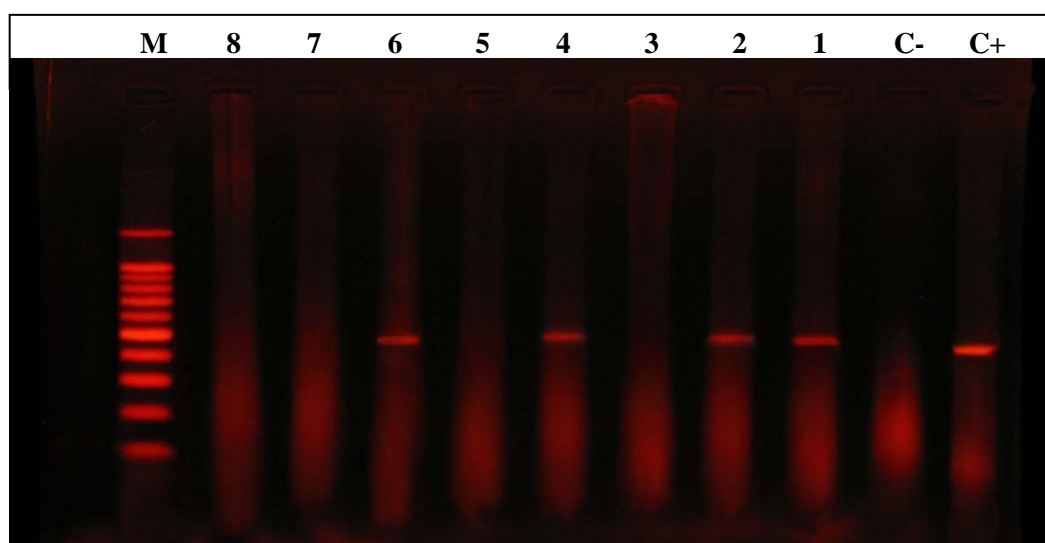


Figura 4. Análise em gel de agarose 1% dos produtos da PCR demonstrando a detecção do agente viral no tecido ovariano. [C+: Controle Positivo; C-: Controle Negativo; M: Marcador de DNA Ladder 100 pb; Amostras 3, 5, 7, 8 (Amostras Negativas); Amostras 1,2,4,6: visualização do fragmento do genoma viral amplificado por PCR (Amostras Positivas)].

Comparando a positividade da PCR para o BoHV-1, nas diferentes estruturas ovarianas e sangue, com o título de anticorpos dos animais, obteve-se os seguintes resultados: as cinco amostras de tecido ovariano positivas na PCR foram oriundas de animais com os títulos virais 2 (3 amostras), 4 (uma amostra) e 8 (uma amostra), pertencentes ao grupo de títulos baixo. A variabilidade dos resultados não permite estabelecer uma correlação precisa

entre o título sorológico e a detecção do DNA viral pela PCR no tecido ovariano, demonstrando que o aumento do título sorológico não está ligado necessariamente ao aumento da presença do DNA neste tecido. Em relação às amostras de sangue, das três positivas na PCR, uma amostra se enquadra no grupo de título médio (título 16), as outras duas se enquadram no grupo de título alto (título 128 e 192). Tal fato demonstra que a detecção do DNA viral no sangue está associada concentrações mais elevadas de anticorpos no soro do animal. Já a amostra de ovócito positiva para BoHV-1 no teste de PCR foi procedente de um animal com título sorológico considerado médio (título 64). Por ter sido detectada apenas uma amostra, não nos permite fazer comparações em relação ao título sorológico.

Os testes moleculares, especialmente a técnica da PCR, são considerados técnicas sensíveis, rápidas e práticas. A técnica de PCR é capaz de detectar amostras de sêmen positivo com uma frequência cinco vezes maior que o isolamento viral em cultura de células (Xia *et al.*, 1995). Já foram descritos testes de PCR em amostras de ovócitos (Bielanski *et al.*, 1997), líquido folicular (Marley *et al.*, 2008b; D'Angelo *et al.*, 2009), sangue (Fuchs *et al.*, 1999) e tecido ovariano (Van Engelenburg *et al.*, 1995; Mweene *et al.*, 1996) de bovinos, buscando-se detectar o BoHV1. Entretanto, na maioria das vezes estes testes são realizados com animais experimentalmente infectados ou amostras infectadas *in vitro*. Deste modo, tem-se a certeza que a carga viral nas amostras analisadas será elevado e mais facilmente detectado por testes diagnósticos.

Atualmente, alguns testes tem se mostrado mais sensíveis, precisos e práticos que o PCR convencional na detecção de partículas virais, dentre eles se pode destacar o *nested* PCR (Takiuchi *et al.*, 2005), real-time PCR (Wang *et al.*, 2008; Marley *et al.*, 2008b). Apesar de não ter sido identificado a presença do DNA viral no líquido folicular, esta prática tem sido estudada com intuito de implementá-la como método de avaliação do risco de transmissão de doenças a partir de ovários de matadouro (Avery *et al.*, 1993). Adicionalmente, a identificação do DNA viral no fluido folicular pode indicar que o grupo de ovócitos coletados deste animal foi obtido a partir de um ambiente folicular contaminado (Marley *et al.*, 2008b).

No presente trabalho, a baixa frequência de DNA viral nos ovócitos e líquido folicular concorda com o estudo de Penido (2007), onde foi constatado

que animais sorologicamente positivos para BoHV-1 produziram complexos cumulus-oócito negativos. Deste modo, o autor concluiu que risco de transmissão do BoHV-1 por meio de complexo cumulus-ovócito e líquidos foliculares provenientes de animais soropositivos e sem sintomatologia clínica da doença pode ser considerado irrelevante. Entretanto, a detecção do DNA viral em uma amostra de cumulus-ovócito em nossa pesquisa, nos permite contestar esta afirmação. Deste modo, podemos afirmar que a possibilidade da transmissão do patógeno através complexo cumulus-ovócito deve ser considerada.

Nas avaliações pela técnica de PCR, extrema precaução deve ser tomada com resultados falsos positivos e falsos negativos (Rocha *et al.*, 1998; Tiwari *et al.*, 2000; Schynts *et al.*, 2001). Alguns estudos demonstram que um resultado negativo para determinado agente não significa necessariamente que a dose mínima exigida para a transmissão deste não esteja presente. Contudo, o agente pode estar presente em concentrações tão baixas que este pode ser removido totalmente por meio das medidas de controle ou se apresentar abaixo do limiar infectante (Bielanski, 1998).

O mecanismo de latência viral do BoHV1 pode ocorrer após a primo infecção com uma amostra de campo ou uma vacina. Durante a infecção clínica ou subclínica, o BoHV-1 dissemina ao longo dos nervos até o gânglio trigêmio, onde o DNA viral permanece em latência. Entretanto, o vírus pode ocasionalmente ser distribuído pelo corpo, acarretando uma infecção intranasal e estabelecendo latência em um gânglio mais distante (Winkler *et al.*, 2000). A reativação viral pode ser motivada por inúmeros fatores como estresse (Nandi *et al.*, 2009). A sorologia não tem se mostrado eficaz na detecção de animais com infecção latente (Gibbs & Rweyemamu, 1977; Straub, 1990). O melhor método descrito para detecção de latência em animais infetados é a hipersensibilidade tardia, principalmente em bezerros com anticorpos maternos (Nandi *et al.*, 2009). O DNA viral pode ainda ser evidenciado por hibridização *in situ* no núcleo de gânglios sensoriais locais (Ackermann & Wyler, 1984). O vírus do BoHV-1 foi detectado em locais adicionais de latência como em linfonodos e mucosa nasal pela PCR (Van Engelenburg *et al.*, 1995).

Portanto, um motivo para explicar a baixa frequência de detecção do DNA viral nos animais avaliados no presente trabalho, comparado a sorologia, poderia ser devido ao mecanismo de latência do vírus BoHV-1 ou a

sensibilidade da PCR. Corroborando com tal fato, Cortez et al. (2006) detectaram em macerados de pulmão e cérebro, DNA do BoHV-1 em apenas 2,4% das amostras analisadas. Mweene et al. (1996) foram capazes de identificar os sítios de latência do vírus em animais experimentalmente infectados, sendo o DNA isolado e amplificado a partir do gânglio trigêmio, ovário, pulmão, mucosas nasal e traqueal, baço, nódulos linfáticos pré-escapular e pré-crural e de leucócitos. Contudo, não existe nenhum relato de detecção do DNA viral em estruturas ovarianas em animais naturalmente infectados que aparentemente estariam em estado latente de infecção. Diante disto, sugere-se que alguns dos animais soropositivos analisados poderiam estar em um estado de infecção latente.

São muito remotas as possibilidades de terem ocorrido falhas durante o transporte das amostras do frigorífico para o laboratório (como variações de temperaturas), e assim interferirem nos resultados. Esta afirmação pode ser justificada pelo fato de que o vírus é inativado à 56 °C somente após 21 minutos; 37 °C dentro de 10 dias e à 22 °C em 30 dias. A temperatura ambiente estima-se que o vírus possa sobreviver por mais de 30 dias (Gibbs e Rweyemamu, 1977).

Portanto, foi detectada a presença do vírus BoHV-1 nas estruturas ovarianas de vacas. A presença do BoHV1 reafirma a hipótese de infecção deste vírus nos órgãos genitais femininos, mais especificamente nos ovários. Este fato pode confirmar a possibilidade de interferência deste vírus na reprodução animal, levando a problemas reprodutivos. Contrariamente, Muylkens et al. (2007) reportaram a falta de bases moleculares que suportam o tropismo do BoHV-1 por células do epitélio genital de fêmeas bovinas. Entretanto, esta hipótese pode ter sido fundamentada pelo fato deste vírus possuir um mecanismo de latência viral e por vezes não ser capaz de ser detectado em testes moleculares. Adicionalmente, a detecção do DNA viral em estruturas ovarianas de fêmeas bovinas, ratificada neste trabalho, contribui para validação da técnica de PCR utilizada.

## 5. CONCLUSÕES

- Os testes sorológicos revelaram alta frequência de anticorpos contra o BoHV-1 nas amostras de soro dos animais, demonstrando que a infecção por este agente encontra-se altamente disseminada no rebanho analisado.
- Adicionalmente, os testes moleculares demonstraram a presença do DNA do BoHV-1 nas amostras de tecido ovariano, ovócitos e sangue analisadas pela técnica da PCR.

## 6. BIBLIOGRAFIA

ACKERMANN, M. et al. Round table on infectious bovine rhinotracheitis /infectious pustular vulvovaginitis virus infection diagnosis and control. **Vet. Microbiol.**, v.23, p.361- 363, 1990.

ACKERMANN, M.; WYLER, R. The DNA of an IPV strain of bovine herpesvirus 1 in sacral ganglia during latency after intravaginal infection. **Vet. Microbiol.**, v.9, p.53-63, 1984.

ANDERSON, M.L. Infectious causes of bovine abortion during mid- to late gestation. **Theriogenology** 68, p.474–486, 2007.

ARCHBALD, L.F.; FULTON, R.W.; SEGER, C.L.; ALBAGDADI, F.; GODKE, R. Effect of the bovine viral diarrhea (BVD) virus on preimplantation bovine embryos: a preliminary study. **Theriogenology**, v.11, p.81-88, 1979.

Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA). RELATÓRIO ESTATÍSTICO DE PRODUÇÃO, IMPORTAÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DE SÊMEN. Acesso em 18/10/2010. Site: [www.asbia.org.br](http://www.asbia.org.br).

AVERY, B.; GREVE, T.; RONSHOLT, L.; BOTNER, A. Virus screening of a bovine in vitro embryo production system. **Vet Res**; 132: 660. 1993.

BEAUMONT, S.L.; MAGGS, D.J.; CLARKE, H.E. Effects of bovine lactoferrin on in vitro replication of feline herpesvirus. **Vet Ophthalmol**; 6: p.245–50. 2003.

BÉLAK, S.; BALLAGI-PORDÁNY, A. Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. **Vet. Res. Comm.**, v.17, p.55-72, 1993.

BETTERIDGE, K.J. Phylogeny, ontogeny and embryo transfer. **Theriogenology**, v. 44, p.1061-1098, 1995.

BIELANSKI, A.; LOEWEN, K.S.; DEL CAMPO, M.R.; SIRARD, M.A.; WILLADSEN, S. Isolation of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) and bovine viral diarrhea virus (BVDV) in association with the *in vitro* production of bovine embryos. **Theriogenology**. V.40, p.531–8, 1993.

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

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. **Anim Reprod Sci** ;v.47:p.1–8, 1997.

BIELANSKI A, SAPP T, LUTZEWALLACE C. Association of bovine embryos produced by *in vitro* fertilization with a noncytopathic strain of bovine viral diarrhea virus type II. **Theriogenology** v.49:p.1231–8, 1998.

BIELANSKI, A. Disinfection procedures for controlling microorganisms in the semen and embryos of humans and farm animals. **Theriogenology** v68:p.1–22, 2007.

BILA, V.; OTOVA, B.; JELINEK, R.; SLADKA, M.; MEJSNAROVA, B.; HOLY, A. et al. Antimitotic and teratogenic effects of acyclic nucleotide analogues 1-(S)-

(3-hydroxy-2-phosphonomethoxyethyl) cytosine (HPMPC) and 9-(2-phosphonomethoxyethyl) adenine (PMEA). **Folia Biol**;v.39:p.150–61, 1993.

BIUK-RUDAN, N.; CVELNIC, S.; MADIC, J.; RUDAN, D. Prevalence of antibodies to ibv and bvd viruses in dairy cows with reproductive disorders. **Theriogenology** v.51:p.875-881, 1999.

BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; MAPLETOFT, R.J. Dinámica Folicular Ovariana en el Bovino. In: Simpósio sobre controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes, 2000, São Paulo: Departamento de reprodução animal: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, **Anais**, p. 12 –34, 2000.

BOELAERT, F.; SPEYBROECK, N.; KRUIF, A. DE; AERTS, M.; BURZYKOWSKI, T.; MOLENBERGHS, G.; BERKVENS, D.L. Risk factors for bovine herpesvirus-1 seropositivity, **Prev. Vet. Med.** V.69:p.285–295, 2005.

BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; MORIN, N.; BRISSON, C.; CRBONNEAU, G.C.; DUROCHER, J. In Vitro Production in Cow: An Effective Alternative to the Conventional Embryo Production Approach. **Theriogenology**, v. 51, p. 59-70, 1999.

BOWEN, R.A. Viral infections of mammalian preimplantation embryos. **Theriogenology** ,vol.11, p.5-15, 1979.

BROCK, K.V. Quality control for materials of animal origin used in embryo production and transfer. In: Stringfellow D.A., Seidel S.M. (eds.), *Manual of the International Embryo Transfer Society*, IETS, **Savoy**, IL, p.151-163, 1998.

BUREAU, M.; DEA, S.; SIRARD, M.A. Evaluation of virus decontamination techniques for porcine embryos produced in vitro. **Theriogenology** 2005;63:2343–55.

CARDOSO, T.C.; TEIXEIRA, M.C.B.; FACHIN, N.; CAMARGO, T.L.; GOMES, D.E.; JUNIOR, A.C.O.; ANSELMO, B. Evaluation of serum and animal-free media for the production of infectious bronchitis virus (M41) strain in a continuous cell line. **ALTEX**;v.3: p.152–6, 2005.

CARDOSO, T.C.; GOMES, D.E.; FERRARI, H.F. et al. A novel in situ polymerase chain reaction hybridisation assay for the direct detection of bovine herpesvirus type 5 in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Journal of Virological Methods**;v.163, p.509-512, 2010.

CHOI, B.; FERMIN, C.D.; COMARDELLE, A.M.; HAISLIP, A.M.; VOSS, T.G.; GARRY, R.F. Alterations in intracellular potassium concentration by HIV-1 and SIV. **Nef. Virol. J.** ,v.19, n.5, p.60, 2008.

CHOWDHURY, S.I.; LEE, B.J.; OZKUL, A. WEISS, M.L. Bovine herpesvirus 5 glycoprotein E is important for neuroinvasiveness and neurovirulence in the olfactory pathway of rabbit. **Journal of Virology**, v.74, p.2094-2106, 2000.

CORTEZ, A. et al . Detecção de ácidos nucléicos de *Brucella* spp., *Leptospira* spp., herpesvirus bovino e vírus da diarréia viral bovina, em fetos bovinos abortados e em animais mortos no perinatal. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 58, n. 6, 2006.

D'ANGELO, M.; PIATTI, R.M.; RICHTZENHAIN, L.J.; VISINTIN, J.A.; TOMITA, S.Y. Evaluation of trypsin treatment on the inactivation of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) in experimentally infected bovine embryos originated from *in vitro* fertilization. **Theriogenology**, v.57, p.569, 2002 (abstract).

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. **Reprod. Domest. Anim**, v.44, p.536-9, 2008.

D'ANGELO, M.; VISINTIN, J.A.; RICHTZENHAIN, L.J.; GONÇALVES, R.F. Evaluation of trypsin treatment on the inactivation of bovine herpesvirus type 1 in vitro produced preimplantation embryos. **Rep. Dom. Anim**, v.44, p.536-539, 2009.

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. **Can. Vet. J.**, v.31, p.815-820, 1990.

EAGLESOME, M.D.; GARCIA, M.M. Disease risks to animal health from artificial insemination with bovine semen. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz**, v.16, p.215-25, 1997.

EDENS, M.S.D.; GALIK, P.K.; RIDDELL, K.P.; GIVENS, M.D.; STRINGFELLOW, D.A.; LOSKUTOFF, N.M. Bovine herpesvirus-1 associated with single, trypsin-treated embryos was not infective for uterine tubal cells. **Theriogenology** v.60, p.1495–1504, 2003.

ELLSWORTH, M.A.; BROWN, M.J.; FERGEN, B.J.; FICKEN, M.D.; TUCKER, C.M.; BIERMAN, P.; TERHUNE, T.N. Safety of a modified-live combination vaccine against respiratory and reproductive diseases in pregnant cows. **Vet Ther** ;v.4:p.120–7, 2003.

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

ERICKSON, G.A.; BOLIN, S.R.; LANDGRAF, J.G. Viral contamination of fetal bovine serum used for tissue culture: risks and concerns. **Dev Biol Stand**;v.75:p.173–5, 1991.

FENNER, F. **Veterinary Virology**. 1st ed. Londres: Academic Press,445p. 1987.

FUCHS, M.; HÜBERT, P.; DETTERER, J.; RZIHA; HJ. Detection of Bovine Herpesvirus Type 1 in Blood from Naturally Infected Cattle by Using a Sensitive PCR That Discriminates between Wild-Type Virus and Virus Lacking Glycoprotein E **J. Clin. Microbiol.**, v.37: p.2498 – 2507, Aug 1999.

FULLER, A. O.; LEE, W. C. Herpes simplex virus type 1 entry through a cascade of virus-cell interactions requires different roles of gD and gH in penetration. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 8, p. 845-853, 1992.

GALIK, P.K.; GIVENS, M.D.; STRINGFELLOW, D.A.; CRICHTON, E.G.; BISHOP, M.D.; EILERTSEN, K.J. Bovine viral diarrhea virus (BVDV) and anti-BVDV antibodies in pooled samples of follicular fluid. **Theriogenology**; v.57:p.1219–27, 2002.

GALIK, P.K.; WALDROP, J.G.; MARLEY, M.S.D.; STRINGFELLOW, D.A. Effects of interferon-tau on replication of bovine viral diarrhea virus and bovine herpes virus-1. **Reprod Fertil Dev**;v.18:p.213 [abstract]. 2006.

GARD, J.A.; GIVENS, M.D.; STRINGFELLOW, D.A. Bovine viral diarrhea virus (BVDV): Epidemiologic concerns relative to semen and embryos. **Theriogenology**, v.68, p.434-442, 2007.

GIBBS, E.P.J.; RWEYEMANN, M.M. Bovine herpesviruses. Part I. Bovine herpesvirus 1. **Vet. Bull.**, v.47, n.5, 1977.

GIVENS, M.D.; RIDDELL, K.P.; GALIK, P.K.; STRINGFELLOW, D.A.; BROCK, K.V.; LOSKUTOFF, N.M. Diagnostic dilemma encountered when detecting bovine viral diarrhea virus in IVF embryo production. **Theriogenology**;v.58:p.1399–407, 2002.

GIVENS, M. D.; A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle. **Theriogenology** v.66, p.648–654, 2006a.

GIVENS, M.D.; STRINGFELLOW, D.A.; RIDDELL, K.P.; GALIK, P.K.; CARSON, R.L.; RIDDELL, M.G. et al. Normal calves produced after transfer of in vitro fertilized embryos cultured with an antiviral compound. **Theriogenology**;v.65:p.344–55, 2006b.

GIVENS, M.D.; MARLEY, M.S.D.; GALIK, P.K.; RIDDELL, K.P.; STRINGFELLOW, D.A. Lactoferrin inhibits bovine herpesvirus-1 in cell culture and allows normal development of in vitro-produced embryos (abstract). **Reprod Fertil Dev**;v.18:p.213, 2007.

GIVENS, M.D.; MARLEY, S.D. Approaches to biosecurity in bovine embryo transfer programs. **Theriogenology** v.69, p.129-136, 2008a.

GIVENS, M. D.; MARLEY M.S.D. Pathogens that cause infertility of bulls or transmission via semen .**Theriogenology** v.70 p.504–507, 2008b.

GUERIN, B.; Le GUIENNE, B.; ALLEITTA, M.; HARLAY, T.; THIBIER, M. Effets de la contamination par le BHV-1 sur la maturation et fécondation in vitro des ovocytes des bovines. **Rec. Med. Vet**, v.66, p.911-917, 1990.

HAYDEN, J.D. et al. The promises and pitfalls of PCR. **Reviews in Medical Microbiology**, v.22, p.129-137, 1991.

HOLZ, C.L., CIBULSKI, S.P., TEIXEIRA, T.F., et al. Seroprevalence of bovine herpesvirus types 1 and/or 5 in the state of Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras.** 29, 767–773, 2009.

International Embryo Transfer Society (IETS). In: STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M.; editors. **Manual of the international embryo transfer society: a procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology, emphasizing sanitary procedures.** 3rd ed., Savoy, I.L.: IETS, 1998.

JUNQUEIRA, J.R.C. et al. Avaliação do desempenho reprodutivo de um rebanho bovino de corte naturalmente infectado com BoHV-1, BVDV e *Leptospira hardjo*. **Semina Ciências Agrárias**, v.27, n.3, p.471-480, 2006.

KIRKBRIDE, C.A. Etiologic agents in a 10 year study of bovine abortions and stillbirths. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.4, n.2, p.160-175, 1992.

KRAMPS, J.A. et al. A simple, specific, and highly sensitive blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine herpesvirus 1. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, n.9, p.2175-2181, 1994.

KUBOVICOVA , E.; MAKAREVICH , A.V.; PIVKO , J.; CHRENEK , P.; GRAFENAU, P.; L'. RIHA , L.; SIROTKIN , A.V.; LOUDA, F. Alteration in ultrastructural morphology of bovine embryos following subzonal microinjection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV). **Zygote**, v.16, p. 187-193, 2008.

KUPFERSCHMIED, H.U.; KIHM, U.; BACHMANN, P.; MULLER, K.H.; ACKERMANN, M. Transmission of IBR/IPV virus in bovine semen: a case report. **Theriogenology**, v.25, p.439-443, 1986.

LE, T.B.; PONSART, C.; MARQUANT-LE, G.B; GUERIN, B. Risks of transmissible diseases in relation to embryo transfer. **Reprod Nutr Dev**; v.41:p.439–50, 2001.

LEVINGS, R.L.; WESSMAN, S.J. Bovine viral diarrhoea virus contamination of nutrient serum, cell cultures and viral vaccines. **Dev Biol Stand**;v.75:p.177–81, 1991.

LOVATO, L. T.; WEIBLEIN, R.; TOBIAS, F. L.; 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**, Santa Maria, v. 25, n. 3, p. 425-430, 1995.

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.

MAKOSCHEY, B.; PATEL, J.R; VAN GELDER, P.T.J.A. Serum-free produced bovine herpesvirus type-1 and bovine parainfluenza type-3 virus vaccines are efficacious and safe. **Cytotechnology**; v.39:p.139– 45, 2002.

MAPLETOFT, R.J.; STOOKEY, J.M. In: Stringfellow, D.A.; Seidel, S.M.; editors. General sanitary procedures and welfare considerations associated with in vivo production of embryos. Savoy, IL: Manual of the International Embryo Transfer Society, **IETS**; p. 55–66, 1998.

MARLEY, M.S.D.; GIVENS, M.D.; STRINGFELLOW, D.A.; GALIK, P.K.; RIDDELL, K.P. Effect of phosphonoformic acid in the development of bovine embryos in vitro. **Vet Ther**;v.7: p.156–66, 2006.

MARLEY, M.S.D.; GIVENS, M.D.; GALIK, P.K.; RIDDELL, K.P.; LOONEY, C.R.; STRINGFELLOW, D.A. Efficacy of a recombinant trypsin product against bovine herpesvirus 1 associated with in vivo- and in vitro-derived bovine embryos. **Theriogenology** v.69: p746–757, 2008a.

MARLEY, M.S.D.; GIVENS, M.D.; GALIK, P.K.; RIDDELL, K.P.; STRINGFELLOW, D.A. Development of a duplex quantitative polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhea virus in bovine follicular fluid **Theriogenology** v.70: p.153–160, 2008b.

MASRI, S.A. et al. Rapid detection of bovine herpesvirus 1 in the semen of infected bulls by a nested polymerase chain reaction assay. **Can. J. Vet. Res.**, v.60, p.100-107, 1996.

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

MERTEN, O.W.; KALLEL, H.; MANUGUERRA, J.C.; TARDY-PANET, M.; CRAINIC, R.; DELPEYROUX, F.; VAN DER WERF S, PERRIN P. The new medium MDSS2N, free of any animal protein supports cell growth and production of various viruses. **Citotechnology**, v.30, p.191-201, 1999.

MILLER, J.M.; VAN DER MAATEN, MJ. Experimentally induced infectious bovine rhinotracheitis virus infection during early pregnancy: effect on the bovine corpus luteum and conceptus. **Am J Vet Res**;v.47:p.223–8, 1986.

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, n.2, p.55- 59, 1981.

MUYLKENS, B.; THIRY, J.; KIRTEN, P.; SCHYNTS, F.; THIRY, E. Bovine herpesvirus 1 infection bovine rhinotracheitis. **Vet. Res**, v.38, p.181–209, 2007.

MWEENE, A.S.; OKAZAKI, K.; KIDA, H. Detection of viral genome in non-neural tissues of cattle experimentally infected with bovine herpesvirus 1. **Jpn. J. Vet. Res.**, v.44, n.3, p.165-174, 1996.

NANDI, S.; MANOJ KUMAR, M. MANOHAR AND R. S. CHAUHAN. Bovine herpes virus infections in cattle. **Animal Health Research Reviews**, 10, p. 85-98, 2009.

NOWSHARI, M.A.; BREM, G. The protective action of polyvinil alcohol during rapid freezing of mouse embryos. **Theriogenology**, v.53, n.5, p.1157-1166, 2000.

OBANDO, C. et al. Serological and molecular diagnosis of bovine viral diarrhoea virus and evidence of other viral infections in dairy calves with respiratory disease in Venezuela. **Acta Vet. Scan.**, v.40, n.3, p.253-262, 1999.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). Terrestrial Animal Health Code. World Organisation for Animal Health. 2003, 2005 e 2008 site: <http://www.oie.int>.

PARSONSON, I.M.; SNOWDON, W.A. The effect of natural and artificial breeding using bulls infected with, or semen contaminated with, infectious bovine rhinotracheitis virus. **Australian Veterinary Journal**, v.51, p.365-369, 1975.

PASTORET, P.P.; THIRY, E.; BROCHIER, B.; DERBOVEN, G. Bovid Herpesvirus 1 infection of cattle: pathogenesis, latency, consequences of latency. **Ann Rech Vet**; v.13:p. 221-235, 1982.

PEEK, S.F.; BONDS, M.D.; GANGEMI, D.G.; CHESTER, B.T.;SCHULTZ, R.D. Evaluation of cytotoxicity and antiviral activity of recombinant human interferon alfa-2a and recombinant human interferon alfa-B/D hybrid against bovine viral diarrhea virus, infectious bovine rhinotracheitis virus, and vesicular stomatitis virus in vitro. **Am J Vet Res**;v.65:p.871–4, 2004.

OLIVEIRA, A. P. **Pesquisa do vírus da rinotraquíte infecciosa dos bovinos em complexos Cumulus-oócito e líquido folicular**. 2007. 26f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2007.

PERRY, G.H. Analyzing Disease Transmission Risks From Abattoir-Derived *in vitro*-produced bovine embryos (Abstract). **Reproduction, Fertility and Development**, v.17 p.244. 2005.

PHILPOTT, M. The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. **Br. Vet. J.**, v.149, p.339-69, 1993.

PIETERSE, M. C.; VOS, P.L.A.M.; KRUIP, T.A.M.; WURTH, Y.A.; BENEDEN, Th.H.; WILLEMSE, A.H.; TAVERNE, M.A.M. Transvaginal ultrasound guided

follicular aspiration of bovine oocytes. **Theriogenology**, vol.35, 19-24, 1991a.

PIETERSE, M. C.; VOS, P.L.A.M.; KRUIP, T.A.M.; WURTH, Y.A.; BENEDEN, Th.H.; WILLEMSE, A.H.; TAVERNE, M.A.M. Characteristics of bovine estrous cycles during repeat transvaginal ultrasound guided puncturing of follicles for ovum pick-up. . **Theriogenology**, vol.35, 401-413, 1991 b.

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, SP, 1988.

POLARD, J., LEIBO, S. Comparative cryobiology of *in vitro* and *in vivo* derived bovine embryos. **Theriogenology**, vol. 39, p.287, 1993.

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. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.17, p.89-95, 1989.

REED, L.J.; MÜENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **The Am. J. Hygien.**, vol.27, n.3, 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.; BARBOSA E.F.; GUIMARAES S.E.F, DIAS N.E.; GOMCIA A.M.G. A high sensitivity-nested PCR assay for BHV-1 detection in semen of naturally infected bulls. **Veterinary Microbiology** v.63: p.1–11. 1998.

ROCHA, M.A.. GOUVEIA, A.M.G., LOBATO, Z.I.P., LEITE, R.C. Pesquisa de anticorpos para IBR em amostragem de demanda no Estado de Minas Gerais, 1990-1999. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.53 n.6 Belo Horizonte dez. 2001.

RODRIGUES, J. L. Transferencia de Embriões Bovinos - Historico e Perspectivas Atuais. **Revista Brasileira De Reprodução Animal**, v. 25, n. 2, p. 102-107, 2001.

RUFINO, F.A.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A. Impacto do Herpesvírus bovino 1 e do Vírus da Diarréia Viral Bovina na transferência de embriões. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, n. 1, p. 78-84, 2006.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002, 265p.

SCHYNTS F., VANDERPLASSCHEN A., HANON E., RIJSEWIJK F.A., VAN OIRSCHOT J.T.; THIRY E. Use of PCR and immuno- fluorescence to detect bovine herpesvirus 1 recombinants. **Journal of Virological Methods** v.92: p.99–104. 2001.

SCHULTZ, R.D. et al. A method to test large numbers of bovine semen samples for viral contamination and results of a study using this method. **Theriogenology**, v.17, p.115- 123, 1982.

SCHWYZER, M.; ACKERMANN, M. Molecular Virology of ruminant herpesviruses. **Vet. Microbiol.**, v.53, p.17-29, 1996.

SEIDEL, G.E Jr; ELSDEN, R.P.; BRINK, Z. Cryopreservation of bovine embryos in media with chemically defined macromolecules. **Theriogenology**, v.33, p.322 (abstract), 1990.

SEIDEL, JR G.E.; TURK, M.L.; GORDY, P.W.; BOWEN, R.A. Recombinant bovine trypsin made in maize inactivates bovine herpesvirus-1 adsorbed to the bovine zona pellucida. **Reprod Fertil Dev**; v.19:p.236 [abstract]. 2007.

SILVA, D.S. **Cultivo de embriões bovinos produzidos in vitro em álcool polivinílico (PVA)**. 2005. 13f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia da Reprodução) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2005.

SILVA, L.F. **Imunogenicidade de Vacinas Inativadas contra o Herpesvirus Bovino Tipo 1 (BoHV-1) e Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) em Bovinos e Cobaio**s. 2006. 63f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2006.

SILVA, M. S. e et al . Identificação e diferenciação de herpesvírus bovino tipos 1 e 5 isolados de amostras clínicas no Centro-Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (1987-2006). **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 10, 2007.

SILVA-FRADE, C. **Avaliação de gametas e embriões bovinos produzidos in vitro após exposição experimental ao BoHV-5**. 2009. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araçatuba, 2009.

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.73:p324–331, 2010a.

SILVA-FRADE, C.; GAMEIRO, R.; MARTINS JR, A.; CARDOSO, T.C.  
Apoptotic and developmental effects of bovine *Herpesvirus* type-5 infection on *in vitro*-produced bovine embryos. **Theriogenology** v.74, p.1296–1303, 2010b.

SINGH, E.L., HARE, W.C.D.; THOMAS, F.C.; EAGLESOME, M.D.; BIELANSKI, A.  
Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. IV. Non-transmission of infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis virus following trypsin treatment of exposed embryos. **Theriogenology**;v.20:p.169–76, 1983.

SODEIK, B.; EBERSOLD, M. W.; HELENIUS, A. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. **J. Cell Biol.**, v. 136, p.1007-1021, 1997.

SOLIS-CALDERON, J.J.; SEGURA-CORREA, V.M.; SEGURA-CORREA, J.C. et al. Seroprevalence of and risk factors for infectious bovine rhinotracheitis in beef cattle herds of Yucatan, México. **Prev. Vet. Med.**, v.57, p.199-208, 2003.

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.

STRAUB O.C. Advances in BHV1 (IBR) research. **Dtsch Tierarztl Wochenschr.**108 (10):419-22, 2001.

STRINGFELLOW, D.A.; LAUERMAN, L.H.; NASTI, K.B.; GALIK, P.K. Trypsin treatment of bovine embryos after in vitro exposure to infectious bovine rhinotracheitis virus or bovine herpesvirus-4. **Theriogenology**;v.34:p.427–34. 1990.

STRINGFELLOW, D.A.; RIDDELL, K.P.; ZUROVAC, O. The potential of embryo transfer for infectious disease control in livestock. **New Zealand Vet J** ;v.39:p.8–17, 1991.

STRINGFELLOW, D.A., GIVENS, M.D. Infectious agents in bovine embryo production: Hazards and Solutions. **Theriogenology**, vol. 53, 85-94, 2000.

STRINGFELLOW, D.A.; GIVENS, M.D.; WALDROP, J.G. Biosecurity issues associated with current and emerging embryo technologies. **Reprod Fertil Dev**; v.16:p.93–102, 2004.

TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Herpesvírus bovino tipo 1: tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. Semina: **Ciências Agrárias**, v.22, p.203- 209, 2001.

TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Otimização da reação em cadeia pela polimerase (*seminested* PCR) para a detecção do herpesvírus bovino tipo 1 em fragmentos de órgãos fetais e em sêmen de bovinos naturalmente infectados. **Semina: Ciências Agrárias**, v.24, P.43-56, 2003.

TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Bovine herpesvirus type 1 abortions detected by a semi nested-PCR in Brazilian cattle herds. **Research in Veterinary Science**, v.79, n.1, p.85-88, 2005.

TANAKA, T.; NAKATANI, S.; XUAN, X.; KUMURA, H.; IGARASHI, I.; SHIMAZAKI, K. Antiviral activity of lactoferrin against canine herpesvirus. **Antiviral Res**;v.60:p.193–9, 2003.

TANGHE, S.; VANROOSE, G.; VAN SOOM, A.; DUCHATEAU, L.; YSEBAERT, M.T.; KERKHOF, P. et al. Inhibition of bovine sperm-zona binding by bovine herpesvirus-1. **Soc Reprod Fertil**; v.130:p.251–9, 2005.

TETZNER, T. A. D. **Efeitos da substituição do soro fetal bovino (SFB) e da albumina sérica bovina (BSA) pela ovalbumina (OVA) na produção *in vitro* de embriões bovinos** , 2007 92 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2007.

The Big Picture Book of Viruses: Herpesviridae Disponível em: [http://www.virology.net/Big\\_Virology](http://www.virology.net/Big_Virology). Acesso 10.10.2010.

TIWARI A.K.; KATARIA R.S.; BUTCHAIHAH G.; PRASAD N. A simple method for detection of BHV-1 from infected MDBK cells by polymerase chain reaction. **Indian Veterinary Journal** 77: p.98–102, 2000.

TOMICH, R.G.P. et al . Reproductive diseases serosurvey in dairy cattle from rural settlements of Corumbá city, Mato Grosso do Sul state, Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 61, n. 4, 2009.

VAN DONKERSGOED, J.; BABIUK, L. A. Diagnosing and managing the respiratory form of infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Medicine**, v. 86, n. 1, p. 86-94, 1991.

VAN ENGELENBURG F.A., KAASHOEK M.J., VAN OIRSCHOT J.T., RIJSEWIJK F.A., A glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1

infects the same limited number of tissues in calves as wild-type virus, but for a shorter period, **J. Gen. Virol.** v.76: p.2387–2392,1995.

VAN OIRSCHOT, J.T.; RIJSEWIJK, F.A.M.; STRAVER, P.J.; RUULS, R.C.; QUAK, J.; DAVIDSE, A. et al. Virulence and genotype of a bovine herpesvirus 1 isolate from semen of a subclinically infected bull. **Vet Rec**;v.137:p.235–9, 1995.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M.; MULLAART, E.; DE ROSS, A.P.; MERTON, J.S.; DEN DAAS, J.H.; KEMP, B.; DE RUIGH, L. Effects of different reproduction techniques: AI, MOET, or IVP, on health and welfare of bovine offspring. **Theriogenology**, v.53, p.575–597, 2000.

VANROOSE, G.; NAUWYNCK, H.; VAN SOOM, A.; VANOPDENBOSCH, E.; de KRUIF, A. Comparison of the susceptibility of in vitro produced hatched blastocysts for an infection with bovine herpesvirus-1 and herpesvirus-4. In: **Proceedings of the 12th Reunion of European Embryo Transfer Association** (abstract 206), 1996.

VANROOSE, G.; NAUWYNCK, H.; VAN SOOM, A.; VANOPDENBOSCH, E. & DE KRUIF, 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.; de KRUIF, A. Effect of bovine herpesvirus-1 or bovine viral diarrhea virus on development of in vitro-produced bovine embryos. **Mol. Reprod. Dev**, v.54, p.255-63, 1999.

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 (abstract). **Theriogenology**, v.53, p.322, 2000.

VIANA, J.H.M.; SIQUEIRA L.G.B.; PALHÃO, M.P.; CAMARGO, L.S.A. Use of *in vitro* Fertilization Technique in the Last Decade and its Effect on Brazilian Embryo Industry and Animal Production. **Acta Scientiae Veterinariae**, 38, p661-674, 2010.

VIDOR, T. HALFEN, D.C., LEITE, T.E. Herpesvírus Bovino tipo 1(HVB-1). Sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos. **Ciêc. Rural.**, vol.25, n.3, p.421-424, 1995.

VIEIRA, S., BRITO, W., SOUZA, W., ALFAIA, B., LINHARES, D.. Anticorpos para o Herpesvírus Bovino 1 (BHV-1) em bovinos do estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v.4, n.2, p. 131-137, 2003.

VILCEK, S. et al. Rapid detection of bovine herpesvirus 1(BHV 1) using the polymerase chain reaction. **Vet. Microbiol.**,v.42, p.53-64, 1994.

VOGEL, F.S.F.; LIMA, M.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R., WINKELMANN, E.R.; MAYER, S.V., MAZZUTTI, K.C. & ARENHART, S. Replicação e excreção viral durante a infecção aguda e após a reativação da latência induzida por dexametasona em bezerros inoculados com os herpesvírus bovinos tipo 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5). **Ciência Rural, Santa Maria**, v.34: p.1619-1621, 2004.

WANG, J., O'KEEFE, J., et al. An international inter-laboratory ring trial to evaluate a real-time PCR assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in extended bovine semen. **Veterinary Microbiology** v126(1-3):11-19,2008.

WINKLER, M.T.; DOSTER, A.; JONES C. Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in the tonsils of latently infected calves, **J. Virol.** v.74:p.5337–5346, 2000.

WRATHALL, A.E.; SUTMOLLER, P. IN: STRINGFELLOW DA, SEIDEL SM, editors. Potential of embryo transfer to control transmission of disease. Savoy, IL: **Manual of the International Embryo Transfer Society**, IETS; p. 17–44, 1998.

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.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; NIEMANN, H. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. **Theriogenology**, v.68, n.1, p.77-83, 2007.

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.

XIA, J.Q. et al. Detection of bovine herpesvirus 1 in the semen of experimentally infected bulls by dot-blot hybridisation, polymerase chain reaction and virus isolation. **Res. Vet. Sci.**, v.59, p.183-185, 1995.

ZEMJANIS, R. Vaccination for reproductive efficiency in cattle. **J Am Vet Med Assoc**;v.165:p.689–92, 1974.