

VÍVIAN RACHEL DE ARAÚJO MENDES

**DETECÇÃO VIRAL E CAPACIDADE DE MATURAÇÃO "IN
VITRO" DE OVÓCITOS DE VACAS NATURALMENTE
INFECTADAS PELO HERPESVIRUS BOVINO 1**

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
2012**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M538d
2012

Mendes, Vivian Rachel de Araújo, 1986-
Detecção viral e capacidade de maturação *in vitro* de
ovócitos de vacas naturalmente infectadas pelo Herpesvirus
bovino1 / Vivian Rachel de Araújo Mendes. – Viçosa, MG,
2012.

x, 91f. : il. (algumas col.) ; 29 cm.

Orientador: Eduardo Paulino da Costa.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Bovino - Reprodução. 2. Herpesvirus - Identificação.
3. Óvulos - Maturação. 4. Reação em cadeia de polimerase.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 636.208969518

VÍVIAN RACHEL DE ARAÚJO MENDES

**DETECÇÃO VIRAL E CAPACIDADE DE MATURAÇÃO "IN
VITRO" DE OVÓCITOS DE VACAS NATURALMENTE
INFECTADAS PELO HERPESVIRUS BOVINO 1**

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: 01 de junho de 2012.

Prof. Abelardo Silva Júnior
(Coorientador)

Prof. José Domingos Guimarães
(Coorientador)

Prof. Marcelo Rezende Luz

Prof.: Eduardo Paulino da Costa
(Orientador)

“Dedico todo meu trabalho aos meus
pais e minhas irmãs, que são razão da
minha vida”

AGRADECIMENTOS

À Deus, em primeiro lugar, por estar sempre ao meu lado e me dar forças para enfrentar os desafios do dia-a-dia.

Um agradecimento mais que especial aos meus amados pais, Fernando e Celinha, que me passaram o maior conhecimento que adquiri em toda a minha vida, o AMOR. Que sempre me deram apoio incondicional, e correções sempre que necessário.

As minhas irmãs lindas, Patrícia e Tamiris, que são minhas amigas, com quem pude desabafar minhas angústias, pedir conselhos e sempre escutar uma palavra de apoio, incentivo. Vocês fazem muita falta...amo vocês.

A toda minha família, avós, tios, primos, pelo amor, carinho e compreensão. Estive ausente em momentos de união, confraternização, dificuldade, mas nunca estive ausente em suas lembranças. Especialmente a vovó Terezinha que se lembrava de mim quando fazia as comidas que eu gosto, quando ouvia as músicas que a gente dançava juntas ou mesmo os momentos de simples companhia.

Ao Professor Eduardo Paulino da Costa, que além de orientador é um pai para mim. Que proporcionou a oportunidade de estar aqui desde a minha vinda para o estágio em 2009, que acreditou no meu trabalho e no meu empenho, além de todo o conhecimento que adquiri durante todo tempo.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Veterinária, pelo acolhimento.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro que viabilizou a execução do projeto.

Aos Professores Abelardo Silva Jr, e José Domingos Guimarães, pela coorientação, ensinamentos e colaboração no experimento.

Ao Professor Marcelo Rezende Luz, por quem eu tenho grande admiração, pela disposição em aceitar nosso convite.

A minha grande amiga Ana Clara, que me faz uma enorme falta, por todo companheirismo, apoio, exemplo de vida e de garra. Por toda a paciência em escutar os problemas, sempre com uma palavra amiga para confortar os momentos difíceis. Por todos os momentos de descontração, os almoços de domingo, as comidinhas toda semana, juntamente com minhas amigas

queridas Giselle e Luciana, obrigada meninas, por todas as noites divertidas, e dias também, as risadas, os conselhos e a colaboração no experimento

Aos meus colegas de trabalho e amigos Emílio, Jhonata, Sanely, Giselle, Hanna, Faider por toda a colaboração na rotina do meu experimento, pelo incentivo, apoio nos momentos difíceis e pela amizade que cultivamos durante esse tempo. E a todos os amigos que conheci em Viçosa, Breno, Julio, Jura, Gian, Carlão, que de alguma forma me ajudaram.

Ao Pedro e Letícia, alunos da iniciação científica que me ajudaram imensamente durante o experimento. A Talita e a todos os estagiários do Laboratório de Reprodução Animal, pela colaboração durante a execução do experimento.

A todos os meus amigos que a distância nunca foi um problema, Jessica, Dinamara, Rafaela, Bianca, Felipe, Diego e muito especialmente a minha grande amiga Kilzanara, agora médica particular, amiga obrigada por todas as consultas fora de hora, os conselhos e ensinamentos, você é muito especial.

A Aurea pela oportunidade e confiança em meu trabalho.

Aos funcionários da UFV, Divino, Geraldinho, Joãozinho, Lourival e Neco, pela cooperação e os serviços prestados. E também a Rosi e a Bete, que sempre estão dispostas a ajudar e esclarecer nossas dúvidas.

Ao Cristiano Lana, José Renato e Ari pela colaboração, boa vontade e confiança.

“Ao dedicar sua vida a algum objetivo, não se poupe. A nossa força vital é como a água de uma fonte inesgotável: quanto mais a extraímos, com mais abundância ela passa a fluir. Isso porque a nossa vida está ligada à Grande Vida do Universo. A nossa vida - força vital - não é algo limitado que quanto mais se usa, mais diminui. Se sua força vital se esgota quando usada, é porque você não está conseguindo alcançar aquele estado de total concentração mental naquilo que realiza. Esforce-se para conseguir tal concentração mental. A partir desse procedimento, começará a surgir a força infinita”
(MASAHARU TANIGUCHI; A verdade da Vida; SEICHO-NO-IE)

SUMÁRIO

RESUMO	xiii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1. Herpesvirus bovino 1 (BoHV 1)	13
2.2. Detecção molecular do BoHV1	20
2.3. Produção in vitro de embriões	21
2.4. Aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU)	24
2.5. Maturação ovocitária	29
2.5.1. Maturação in vitro (MIV)	34
2.6. Transmissão do BoHV1 por meio da PIV	37
2.6.1. Doadoras e receptoras	39
2.6.2. Materiais e equipamentos	39
2.6.3. Meios de cultura	39
2.6.4. Sêmen e FIV	40
2.6.5. Ovócitos, Fluidos e MIV	42
2.6.6. <i>Gap junctions</i>	43
2.6.7. Embriões	44
2.6.8. Zona Pelúcida	44
2.7. Procedimento para remoção ou inativação do BoHV1	46
2.7.1. Tratamento com tripsina	46
2.8. Referências	47
3. CAPÍTULO 1	61
4. CAPÍTULO 2	73
5. CONCLUSÕES	91

RESUMO

MENDES, Vivian Rachel de Araújo. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Junho de 2012. **Detecção viral e capacidade de maturação “in vitro” de ovócitos de vacas naturalmente infectadas pelo Herpesvirus bovino 1.** Orientador: Eduardo Paulino da Costa. Coorientadores: Abelardo Silva Júnior e José Domingos Guimarães.

O objetivo do presente estudo foi verificar a presença do DNA do herpesvirus bovino 1 (BoHV1) em Complexos *Cumulus Oóforus* (COCs) e no sangue, além de avaliar a capacidade de desenvolvimento de ovócitos oriundos de vacas infectadas naturalmente. Os COCs foram obtidos de 15 doadoras por meio de aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU). A extração do DNA foi realizada em um *pool* de COCs de todas as aspirações de uma mesma doadora e no sangue total, para a realização das reações de *Nested-PCR*. Os tratamentos foram definidos a partir do título de anticorpos detectados pela soroneutralização em microplacas, sendo estabelecidos quatro grupos: animais negativos (título menor do que 2); título baixo (2 a 8); título médio (16 a 32) e título alto (64 a 512). Foram selecionados para o cultivo *in vitro* somente os COCs com camada compacta de células do *cumulus*, zona pelúcida íntegra e citoplasma homogêneo. Após 24 horas de cultivo, os ovócitos foram fixados e corados para avaliação da maturação nuclear. O estágio do ciclo celular meiótico foi avaliado, por meio de um microscópio óptico com aumento de 1000X em imersão. Foi considerado maduro o ovócito que atingiu o estágio de metáfase II. O DNA do BoHV1 foi identificado no *pool* de COCs de três doadoras soropositivas, não sendo detectado em nenhuma das amostras soronegativas. Entretanto, não foi encontrado DNA viral em amostras sanguíneas, mesmo nas oriundas de animais soropositivos. Não houve diferença ($P>0,05$) na taxa de maturação nuclear ovocitária do grupo controle negativo (76,7%), quando comparada com a observada em animais com baixa titulação de anticorpos contra o BoHV1 (62,2%). Entretanto, verificou-se menor taxa de maturação nuclear ($P<0,05$) em ovócitos oriundos de vacas com titulação média (48,4%) e alta (50,9%), quando comparadas com o controle negativo. Os resultados obtidos permitem concluir que vacas infectadas naturalmente pelo BoHV1 podem apresentar o DNA viral em

estruturas ovarianas e ainda ter comprometimento na taxa de maturação nuclear ovocitária.

ABSTRACT

MENDES, Vivian Rachel de Araújo. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2012. **Viral Detection and *in vitro* maturation ability of oocytes from cows naturally infected by bovine Herpesvirus 1.** Adviser: Eduardo Paulino da Costa. Co-advisers: Abelardo Silva Júnior and José Domingos Guimarães.

This study was carried out to verify the presence of DNA of the bovine herpesvirus 1 (BoHV1) in Cumulus Oophorus Complexes (COCs) and in blood, as well as to evaluate the development ability of the oocytes from the naturally infected cows. COCs were obtained from 15 donors through follicular aspiration guided by ultrasound (OPU). The DNA extraction was accomplished in a *pool* of COCs of all aspirations from a same donor and in the total blood, in order to accomplish the *Nested-PCR* reactions. The treatments were defined from the titre of the antibodies detected by serum-neutralization in microplates, and four groups were established: negative animals (titre lower than 2); low titre (2 to 8); medium titre (16 to 32) and high titre (64 to 512). Only the COCs provided with compact layer of *cumulus* cells, an integral pellucid zone and homogenous cytoplasm were selected for *in vitro* culture. After 24 hours under culture, the oocytes were fixed and stained for evaluation of the nuclear maturation. The stage of the meiotic cellular cycle was evaluated through an optical microscope with increase of 1000X in immersion. The oocyte reaching the metaphase stage II was considered as ripe. The DNA of BoHV1 was identified in the *pool* of COCs from three serum-positive donors, as being not detected in any serum-positive sample. However, the viral DNA was not found in sanguine samples, even in those from the serum-positive animals. No differences ($P>0.05$) occurred in the nucleus maturation rate of the negative control group (76.7%), when compared with that one observed in animals with low titration of antibodies against BoHV1 (62.2%). However, lower nucleus maturation rate ($P<0.05$) were verified in oocytes from the cows with average (48.4%) and high titration (50.9%), when compared with negative control. The obtained results allow to conclude that cows naturally infected by BoHV1 can present either viral DNA in ovarian structures and endangerment of the maturation rate of the oocyte nucleus.

1. INTRODUÇÃO

A influência do Herpesvírus bovino 1 (BoHV1) na PIV de embriões bovinos é um tema recorrente de pesquisas em diversos países. A interação do vírus em gametas e embriões infectados naturalmente ou experimentalmente é prejudicial aos mesmos e gera falhas durante o processo, que reduzem os resultados obtidos em cultivo (GUERIN et al., 1990; BIELANSKI e DUBUC, 1994; VANROOSE et al., 1999).

A crescente produção mundial de embriões PIV, remete a questão de comercialização e veiculação de agentes infecciosos, inclusive o BoHV1, entre os rebanhos mundiais. Na tentativa de minimizar os efeitos de patógenos sobre os gametas e embriões, a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões – IETS (1998) implementou protocolos sanitários que são exigidos para o comércio de material de multiplicação animal. Entretanto, não existe um consenso sobre a eficácia do uso da tripsina e a prevenção da infectividade de embriões após a transferência (STRINGFELLOW e GIVENS, 2000; JOOSTE, 2005).

O BoHV1 é considerado um dos agentes patogênicos mais comuns relacionado sistema de PIV e estruturas reprodutivas, podendo ser encontrado no ovócito (GUERIN et al., 1990; BIELANSKI et al., 1993), líquido folicular (FERREIRA et al., 2005; MARLEY et al., 2008), células epiteliais da tuba uterina (FERREIRA et al., 2005), espermatozóides (VAN OIRSCHOT et al., 1995; TANGHE et al., 2005), embrião (GUERIN et al., 1990; BIELANSKI e DUBUC, 1994; VANROOSE et al., 1999; MAKAREVICH, 2007), além dos

meios utilizados no sistema de produção *in vitro* de embriões (PIV) (STRINGFELLOW e GIVENS, 2000).

Após a entrada no organismo, o vírus estabelece latência nos gânglios trigêmio e sacral, e são reativados somente em momentos de imunossupressão do animal como o estresse ou o tratamento com corticóides (ACKERMANN et al., 1982; STRAUB, 1990). Assim, o animal se mantém portador do vírus de forma subclínica, sendo este, um potencial transmissor da doença no rebanho. Frequentemente, em rebanhos contaminados, é observada a ocorrência de abortamentos entre o quarto ao oitavo mês de gestação (GIVENS e MARLEY, 2008) e repetição de estros em intervalos regulares ou irregulares, natimortalidade, mortalidade perinatal, redução na fertilidade e infertilidade temporária, devido à infecção uterina (RUFINO et al., 2006).

Tendo em vista a influência deste vírus na reprodução de bovinos, o objetivo do presente experimento foi identificar o DNA viral em Complexos *Cumulus Oóforus* (COCs) e avaliar a capacidade de desenvolvimento (maturação nuclear) de ovócitos oriundos de vacas contaminadas naturalmente pelo BoHV1.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Herpesvirus bovino 1 (BoHV 1)

A Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), uma das doenças virais de maior importância na bovinocultura, é causada pelo Herpesvirus bovino 1 (BoHV1). Em todo o mundo, são contabilizadas perdas significativas na produtividade da pecuária de corte e leite, gerando um prejuízo econômico considerável, devido aos problemas respiratórios e reprodutivos (KIRKBRIDE, 1985; WRATHALL et al., 2006; MARLEY et al., 2008).

O BoHV1 pertence à Família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*. São vírus que possuem genoma DNA linear de fita dupla, envelope glicoproteico composto de onze glicoproteínas, capsídeo icosaédrico com 70 a 110 nm de diâmetro e 162 capsômeros (FENNER, 1987).

A transmissão de forma direta acontece por meio de aerossóis, secreções nasais, oculares e genitais dos animais infectados. A forma indireta ocorre pela ingestão de alimentos e água contaminados, uso de ordenha mecânica e vaginas artificiais contaminadas (ENGELS e ACKERMANN, 1996).

Existe ainda a transmissão via venérea, pela monta natural e/ou inseminação artificial (IA) (PHILPOTT, 1993). Além disto, existe também a transmissão pela transferência de embrião, onde é preciso que o agente infeccioso esteja presente no embrião, associado à zona pelúcida ou presente nos líquidos os quais o mesmo é transferido (D'ANGELO, 2009). Portanto, o sistema de PIV pode ser um processo disseminador da doença, devido a contaminação dos gametas, dos meios de cultura ou das doadoras e

receptoras (HARE, 1990). Fetos abortados também podem ocasionalmente transmitir o vírus (GIVENS, 2006).

Os primeiros sinais clínicos são observados após a penetração do vírus nas mucosas nasofaríngea ou genitais, devido à replicação nas células epiteliais e lise das mesmas. Após a replicação viral, o vírus invade terminações nervosas de neurônios sensoriais, onde estabelecerá latência (ROCK et al., 1992).

A latência é uma importante característica biológica dos vírus da subfamília *Alphaherpesvirinae*, onde não há expressão de antígenos virais e interrupção da replicação, mantendo o genoma viral sob forma episomal. (PASTORET et al., 1982; ROCK et al., 1992). Os gânglios trigêmio e sacral são os locais de predileção para manutenção do estado latente, dependendo do local de replicação primária do vírus. Desta forma, o animal se torna um portador inaparente e disseminador da infecção no rebanho (MÉDICI et al., 2000). A disseminação ocorre em momentos esporádicos de imunossupressão, quando o vírus pode ser reativado e transportado via nervosa a partir dos gânglios periféricos. Assim, ele retorna ao foco primário da infecção, resultando na reexcreção viral e liberação de partículas virais infectantes (ACKERMANN et al., 1982; STRAUB, 1990). O vírus pode se propagar a partir do local primário para os órgãos genitais via sanguínea, de forma livre ou dentro dos leucócitos (SPEAR, 2004).

A forma respiratória da doença, também denominada IBR, pode se manifestar com febre, depressão, anorexia, dispnéia e taquipnéia. Além destas alterações, ocorre também perda de peso, queda brusca na produção de leite, conjuntivite, lesões erosivas na mucosa nasal, tosse e descargas nasais

serosas. Estas descargas nasais podem tornar-se mucopurulentas com a progressão da enfermidade, levando à broncopneumonia, principalmente associada a infecções bacterianas secundárias (WYLER et al., 1989).

A Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IPV) se desenvolve após a infecção dos órgãos genitais da fêmea durante a monta ou IA, manifestando clinicamente pelo aparecimento de pequenas vesículas de 1 a 2 mm de diâmetro. Estas vesículas evoluem para pústulas e erosões localizadas na vulva e vagina. O epitélio vulvar torna-se edemaciado, hiperêmico e com presença de secreção (STRAUB, 1990). A ocorrência desta forma de doença está ligada à repetição de estros em intervalos regulares ou irregulares, abortamentos, natimortalidade, mortalidade perinatal, redução na fertilidade e infertilidade temporária, devido à infecção uterina (RUFINO et al., 2006).

Os abortamentos podem ocorrer em até 60% das vacas infectadas (GIVENS, 2006), e são mais frequentemente observados do quarto ao oitavo mês de gestação (GIVENS e MARLEY, 2008). Esta condição ocorre após um período de incubação de três a seis semanas, no qual o vírus é carregado pelos leucócitos sanguíneos até as veias placentárias. Segundo Givens (2006), ocorre a morte do feto dentro de 24 horas após a entrada do BoHV1 nestas veias. O feto geralmente apresenta coloração uniforme vermelho escura devido a embebição por hemoglobina. As lesões geralmente relatadas incluem focos de necrose no fígado, baço, glândulas adrenais, pulmão e rins.

As lesões podem ser encontradas no útero, ovários e tubas uterinas, associadas à endometrites, ooforites necrotizantes, inflamação no corpo lúteo com conseqüente diminuição da produção de progesterona. Estas condições resultam em falha na prenhez, além de infertilidade, reabsorção embrionária e

nascimento de bezerros fracos (MILLER e VAN DER MAATEN, 1986; VANROOSE et al., 1999; GIVENS, 2006).

A manifestação clínica da doença em touros é denominada de Balanopostite Pustular (IPB), apresentando lesões no prepúcio e pênis semelhantes às encontradas em fêmeas. Touros positivos aparentemente não têm redução da fertilidade. Entretanto, recusam a monta na fase aguda da doença devido a sensibilidade, exteriorizam frequentemente o pênis e apresentam secreção prepucial (STRAUB, 1990). O vírus replica na mucosa prepucial, pênis e na uretra distal, podendo estar presente também no plasma seminal e se associar aos espermatozóides no momento da ejaculação (GIBBS e RWEYEMANN, 1977; WYLER et. al., 1989; GIVENS e MARLEY, 2008). Van Der ENGELBURG et al. (1993) verificaram DNA do BoHV1 no fluido seminal de mais de 90% de touros soropositivos. Apesar disto, não detectaram o vírus nos espermatozóides. O vírus não é excretado de forma uniforme ou contínua por machos soropositivos, sendo 10^2 CID₅₀ a dose infecciosa mínima necessária para contaminar uma fêmea (FLORES, 2005).

A criopreservação do sêmen tem favorecido a disseminação do BoHV1, uma vez que as condições de armazenamento são ideais para sua preservação. A infectividade do BoHV1 no sêmen pode se manter por até sete dias em temperatura de 4°C e por cinco dias em temperatura ambiente (DREW et al. 1987). CHAPMAN et al. (1979) verificaram que não ocorre perda no título do BoHV1 em sêmen bovino armazenado por mais de um ano em nitrogênio líquido. Além do problema de transmissão pelo sêmen, a presença do vírus no ejaculado pode comprometer a capacitação *in vitro* dos espermatozóides

devido a sua aderência nas células espermáticas (efeito indireto do BoHV-1) (BIELASNKI et al., 1993).

Apesar da distribuição mundial do BoHV1, alguns países como a Dinamarca e Finlândia conseguiram erradicar a doença, por meio de um rígido programa de identificação e sacrifício dos animais portadores. Outros países como a Alemanha e Suíça controlam a infecção por meio da vacinação compulsória, identificação e eliminação gradual (FLORES, 2005). Contudo, a situação é endêmica e as taxas de infecção descritas são muito variáveis na maioria dos países europeus e América do Norte.

O primeiro isolamento do BoHV1 no Brasil foi em 1978, de um caso de vulvovaginite no estado da Bahia (ALICE, 1978). Vários estudos indicam que o vírus encontra-se disseminado nos rebanhos brasileiros, apresentando altas taxas de prevalência. No estado de São Paulo foi registrada uma frequência de 68,3% animais soropositivos (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 verificado índice de 50,9% de soropositividade para rebanhos leiteiros (TOMICH et al., 2009).

Em Minas Gerais, um estudo conduzido por ROCHA et al. (2001), demonstrou que 58,2% de 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). Em outro levantamento realizado no estado de Paraná, foram registrados 64,4% das propriedades com animais soropositivos (DIAS et al., 2008). No

Maranhão 67,5% (SOUZA et al., 2009) e 69,2% foram reagentes para o BoHV-1 (LOPES et al., 2011). Levantamentos realizados no estado de Goiás apresentaram um percentual de 83% (VIEIRA et al., 2003) e 84,5% de animais soropositivos (AFFONSO et al., 2010).

Alguns fatores podem influenciar na susceptibilidade de um rebanho ao BoHV1, como a idade (LOPES et al., 2011), tamanho do rebanho, sistemas de exploração, comércio de animais (DIAS et al., 2008) e sexo.

A maneira mais eficiente de diagnosticar a infecção pelo BoHV-1 são os testes laboratoriais, podendo este ser etiológico ou sorológico. Entretanto, os testes sorológicos são incapazes de diferenciar os títulos provenientes da exposição ao vírus vacinal daqueles oriundos da exposição natural ao vírus de campo. Assim, o diagnóstico da infecção pelo BoHV-1 somente é conclusivo mediante a elaboração de metodologias que possibilitem o diagnóstico etiológico (TAKIUCHI et al., 2001).

A soroneutralização (SN) e os ensaios imunoenzimáticos (ELISA), são as técnicas sorológicas mais utilizadas na detecção de anticorpos específicos. Kramps et al. (1994) demonstraram que o teste de ELISA, foi mais sensível que a técnica de soroneutralização, devido a menor sensibilidade da SN em detectar anticorpos em alguns animais que apresentem a infecção viral em estado de latência prolongada ou naqueles recentemente infectados.

O diagnóstico etiológico pode ser realizado por técnicas que identifiquem a partícula viral (isolamento do vírus em cultivo celular e microscopia eletrônica), os antígenos virais (técnicas de imunofluorescência ou imunoperoxidase), ou o genoma viral (hibridização e reação em cadeia pela polimerase - PCR) (WYLER et al., 1989).

O controle e/ou erradicação da enfermidade no rebanho pode incluir ou não a vacinação do rebanho, além de outras atitudes dentro de uma propriedade. A eliminação dos animais soropositivos é uma alternativa coerente quando se obtém baixa prevalência. Contudo, é uma medida onerosa quando a soropositividade é elevada em um rebanho (ACKERMANN et al., 1990). A prova sorológica é uma ferramenta que pode ser utilizada no comércio de animais e na certificação de uma propriedade livre do agente infeccioso, podendo ser testados previamente os animais a serem adquiridos. Os reprodutores utilizados em monta natural devem ser soronegativos. Adicionalmente, certificar o uso de sêmen livre de BoHV1 em propriedades onde se utiliza IA (STRAUB, 1990; PHILPOT, 1993; FAVA, 1998).

A utilização de vacinas com vírus vivo modificado antes do período reprodutivo pode proteger contra abortamentos. Todavia, pode causar uma infertilidade temporária devido à necrose folicular em vacas soronegativas e abortamento quando administrada em vacas gestantes. As vacinas intranasais podem ser administradas com segurança aos animais em qualquer fase de reprodução (GIVENS, 2006).

No Brasil, o controle da doença é realizado voluntariamente, sem qualquer exigência dos órgãos competentes. A vacinação não é uma prática difundida, sendo sua eficiência contestável (PITUCO et al., 1999). Apesar de minimizar as manifestações clínicas da doença, elas não impedem o mecanismo de latência e não eliminam o vírus já instalado. Destarte, é possível a reativação e eliminação do vírus por um animal infectado, mesmo depois de vacinado. As vacinas que se encontram disponíveis para comércio brasileiro não permitem a distinção entre animais vacinados dos infectados com vírus de

campo, dificultando a erradicação do BoHV1 em uma propriedade (LEMAIRE et al., 1994).

2.2. Detecção molecular do BoHV1

Um dos recursos mais utilizados da biologia molecular associada a reprodução animal é a técnica de reação em cadeia polimerase (PCR). Uma doença pode ser diagnosticada em um rebanho por meio da amplificação de uma sequência conhecida do material genético (DNA) do agente infeccioso em questão. A técnica consiste em um conjunto de eventos que separa (desnaturação), copia (anelamento) e refaz (extensão) a fita de DNA, utilizando oligonucleotídeos da região de interesse como iniciadores para cópia. Assim, uma nova fita é formada, por meio de uma enzima polimerase, a partir da fita molde (original). Este procedimento compreende uma série de ciclos, em determinadas temperaturas, que são repetidos em escala geométrica. (WISCHRAL e GOMES FILHO, 2009).

A PCR é uma técnica molecular que possibilita a identificação do genoma viral em amostras biológicas de forma rápida, sensível e específica. O método permite a detecção de partículas virais não viáveis, em estado de latência, ou que tenham sido inativadas (TAKIUCHI et al., 2003; TAKIUCHI et al., 2005). Esta detecção pode ocorrer até mesmo antes do aparecimento de anticorpos detectáveis pela sorologia, a partir do quarto dia de infecção (MASRI et al., 1996).

A técnica de PCR possibilita a amplificação de segmentos do genoma a partir de diferentes tipos de materiais biológicos, como fragmentos de tecidos, feto abortado, sistema nervoso central, secreções e sêmen (TAKIUCHI et al.,

2003; TAKIUCHI et al., 2005). Além disso, é uma ferramenta indispensável para a avaliação da sanidade dos embriões produzidos por biotécnicas da reprodução. Esta avaliação é possível, pois permite a detecção de baixa concentração viral em embriões, fluidos uterinos e líquidos de lavagem, os quais nem sempre são detectados por outros métodos de diagnóstico (TAKIUCHI et al., 2005).

O BoHV1 deve ser monitorado em touros de centrais de inseminação artificial pela técnica de PCR, uma vez que o vírus é eliminado de forma intermitente no fluido seminal de bovinos soropositivos. Esse procedimento permite o controle da qualidade do sêmen e minimiza os riscos de transmissão da doença em centrais de coleta de sêmen (MASRI et al., 1996; ROCHA et al., 1998).

2.3. Produção *in vitro* de embriões

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma importante biotécnica da reprodução, que proporciona um incremento significativo na produtividade. Em média, é possível produzir 50 a 100 embriões por doadora em um ano (VARAGO et al., 2008), número este que supera os resultados obtidos naturalmente ou por meio de outras biotécnicas como a inseminação artificial e transferência de embriões (BOUSQUET et al., 1999).

As etapas envolvidas na PIV compreendem a coleta de ovócitos, maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV), bem como o cultivo embrionário *in vitro* (CIV) até os estádios de mórula e blastocisto, quando os embriões poderão ser transferidos ou criopreservados (VARAGO et al., 2008).

Algumas técnicas foram desenvolvidas para a coleta de ovócitos de uma doadora *in vivo*, como a laparoscopia. Entretanto, a aspiração folicular guiada por ultrasson (*ovum pick up* - OPU) tem sido a melhor opção para a recuperação de ovócitos na espécie bovina (PIETERSE et al., 1991).

A associação da PIV com a OPU permite maximizar a produção de descendentes de doadoras com alto potencial genético. Assim, o uso destas técnicas torna a produção de embriões menos dependente do “status” reprodutivo do animal, permite a obtenção de um menor intervalo de gerações e maximização no uso do sêmen. Adicionalmente, facilita a comercialização de ovócitos e de embriões. Neste contexto, trata-se de uma alternativa mais segura quanto à transmissão de patógenos, quando comparada com a comercialização de animais *in vivo* (WAGTENDONK-de LEEUW, 2006).

Apesar dos grandes avanços obtidos nos últimos anos, a técnica de PIV apresenta limitações, como o custo mais elevado do embrião (quando comparado com a transferência de embriões), a baixa taxa de blastocistos produzidos e a dificuldade na criopreservação dos embriões. Além destes aspectos, ovócitos obtidos de bezerras possuem menor viabilidade em relação aos de vacas e novilhas (WAGTENDONK de LEEW et al., 2006). Outra condição limitante seria a distância entre o laboratório e as propriedades onde os ovócitos são coletados e os embriões transferidos (GONÇALVES et al., 2007).

A taxa de blastocistos produzidos *in vitro* ainda é muito inferior quando comparado aos resultados obtidos *in vivo*. Apenas 35-40% dos ovócitos bovinos desenvolvem-se até o estágio de blastocisto (SIRARD et al., 2006; PONTES et al., 2011) e, dentre estes, somente 30% chegam a termo após

transferência para receptoras (PONTES et al., 2011). Para cada oito a 10 ovócitos coletados pela OPU há uma produção média de dois embriões transferidos em bovinos de raças européias (GALLI et al., 2001). Alguns estudos relatam que somente em torno de um terço dos ovócitos selecionados morfológicamente antes de serem submetidos a MIV, resultam em embriões viáveis (LONERGAN et al., 1994, HENDRIKSEN et al., 2000).

Esses resultados se devem a diversos fatores que interferem na qualidade e competência ovocitária, já que os meios de cultivo *in vitro* não apresentam condições similares às observadas *in vivo*. A remoção do ovócito do ambiente folicular faz com que haja perda da interação morfológica, hormonal e molecular entre ovócito e células foliculares (GOTTARDI e MINGOTI, 2009). No intuito de minimizar os danos durante o cultivo do ovócito, é fundamental simular um micro ambiente folicular e tubárico adequados. Esta condição é necessária para que a maturação citoplasmática e nuclear ocorram sincronicamente, tornando o ovócito competente para ser fecundado e, em decorrência, prosseguir o desenvolvimento para estádios embrionários mais avançados (SILVA et al., 2009).

O cultivo de embriões *in vitro* utilizando soro foi associado à “síndrome do bezerro grande”, a qual determina o nascimento de bezerros mais pesados, período gestacional prolongado, distocias, anormalidades congênitas, maior incidência de reabsorção, abortamentos e natimortalidade (HASLER, 2000). Uma redução na ocorrência desta anormalidade pode ser obtida utilizando-se *Synthetic Oviductal Fluid* (SOF) no sistema de cultivo, o que dispensa a adição de soro ao meio (WAGTENDONK-DE LEEUW, 2006).

2.4. Aspiração folicular guiada por ultrasson (OPU)

A OPU foi desenvolvida na década de 80 e consiste em uma biotecnologia da reprodução assistida. Ela permite a obtenção de ovócitos por meio da aspiração *in vivo* dos folículos ovarianos antrais (guiada por ultrassonografia), a fim de serem destinados à produção *in vitro* de embriões (PIETERSE et al., 1991; VIANA et al., 2001; BOLS et al., 2004).

A técnica foi desenvolvida para bovinos com o objetivo de multiplicar animais de alto valor genético, principalmente vacas que apresentavam problemas adquiridos em relação à fertilidade ou que não respondiam aos tratamentos superovulatórios convencionais (LONERGAN et. al., 1994). Além disso, é possível seu uso em doadoras em diferentes idades (desde bezerras pré-púberes a vacas velhas) e em doadoras secas ou lactantes. Também é possível o uso de animais gestantes, enquanto os ovários forem acessíveis para a aspiração e em doadoras com 20 a 30 dias pós-parto (GALLI et al., 2001).

A OPU é hoje o procedimento de eleição na obtenção de ovócitos para PIV em grandes animais, pois se mostrou um método simples, não invasivo, de possível repetibilidade, além de permitir a redução do intervalo de gerações, e assim, acelerar o processo de melhoramento genético quando utilizado criteriosamente em animais de alto valor zootécnico (GALLI et al., 2001).

As taxas de recuperação de ovócitos por meio da OPU são muito variadas. Assim, foram encontradas uma recuperação em torno de 2 a 3 (PIETERSE, et al., 1988), 8,0 (KRUIP et al., 1994), 4,7 (BOUSQUET, et al., 1999), 25 (THIBIER, 2004), 16,3 (RUBIN et al., 2005) e 30 ovócitos (PONTES et al., 2011).

Alguns fatores relacionados ao animal podem interferir na eficiência da OPU/PIV, como a idade, raça, condição corporal, fase reprodutiva e utilização de tratamentos hormonais. Existem também alguns fatores inerentes à própria técnica, como o tipo e frequência do transdutor, a agulha de punção, a pressão de vácuo, a frequência de aspiração e a experiência do aspirador (BOUSQUET et al., 1999; BOLS et al., 2004; SENEDA et al., 2005).

A aspiração de folículos em novilhas pré-púberes pela técnica OPU ainda não está completamente definida. Adicionalmente, foi relatada reduzida competência dos ovócitos aspirados para atingir o estágio de blastocisto (RIZOS et al., 2005). Entretanto, esta competência pode ser incrementada com prévio tratamento gonadotrófico (GALLI et al., 2001). Em relação aos animais senis, observam-se baixas taxas de recuperação de ovócitos, reduzido número de camadas de células do *cumulus* e baixo percentual de desenvolvimento até blastocisto (GALLI et al., 2001).

Existem evidências da interferência da raça na eficiência da aspiração folicular e na produção de blastocistos. Contudo, não existe consenso sobre quais raças teriam desempenho superior. A maior influência estaria ligada à individualidade de cada animal, mesmo dentre animais de uma mesma raça (WAGTENDONK-de LEEUW, 2006). Em raças européias as médias obtidas variam em torno de 1,9 a 9,9 ovócitos recuperados por sessão (BOUSQUET et al., 1999). Entretanto, a taxa de recuperação de ovócitos em animais da raça Nelore tem sido mais elevada, variando de 10,2 a 58,9 (PONTES et al., 2011).

A condição corporal é também outro fator que afeta a capacidade de obtenção de ovócitos de boa qualidade. Assim, vacas de baixa condição

corporal, subnutridas ou obesas apresentam baixa qualidade ovocitária e baixos índices de desenvolvimento até blastocistos (LOPEZ RUIZ et al., 1996).

A OPU pode ser realizada independentemente da fase do ciclo estral e não necessita de protocolos de superovulação (VIANA et. al., 2001). Todavia, a aplicação de gonadotrofinas exógenas e o conhecimento sobre a dinâmica folicular ovariana são ferramentas que podem auxiliar no sucesso da OPU (CHAUBAL et al., 2006). Neste contexto, diferentes hormônios são usados em protocolos pré-estimulatórios, como o GnRH (BORDIGNON et al., 1997), o FSH (SENEDA et al., 2005; CHAUBAL et al., 2006; DE ROOVER et al., 2008), sendo o FSH o mais utilizado e com melhores resultados obtidos (SENEDA et al., 2005).

Segundo Chaubal et al. (2006) e De Roover et al. (2008), a aplicação de FSH 48 horas antes da OPU aumenta o tamanho e o número de folículos aspirados, o número e qualidade dos COCs recuperados e dos blastocistos produzidos, quando comparada com a OPU realizada sem protocolo hormonal prévio. Também Lonergan et al. (1994), Čech et al. (2002) verificaram que a proporção de folículos de tamanho médio (5-9 mm) disponíveis para aspiração é mais elevada em animais estimulados com FSH antes da OPU. Apesar destas vantagens, a competência dos ovócitos pode ser reduzida pelo efeito do FSH, o qual induz uma assincronia entre a maturação do ovócito e o ambiente folicular (de LOOS et al., 1991) ou entre a maturação nuclear e citoplasmática (BOUSQUET et al., 1999).

Quando a OPU é realizada independente da fase do ciclo estral, mais de 85% dos folículos ovarianos aspirados são atrésicos (SIRARD et al., 1999). Além disto, a competência destes ovócitos é menor em relação ao que seria

oriundo da ovulação de um folículo saudável e fecundado *in vivo*. Isto ocorre porque os ovócitos aspirados para a produção *in vitro* seriam obtidos de folículos em diferentes estádios de desenvolvimento e expostos a diferentes concentrações de estradiol, progesterona, LH e FSH (WIT et al., 2000).

Um incremento na PIV pode ser obtido se a OPU for realizada entre os dias dois a cinco do ciclo estral ou dois a cinco dias após a divergência folicular, tendo em vista que o folículo dominante exerce um efeito deletério sobre os demais (GALLI et al., 2001; HENDRIKSEN et al., 2004). Neste contexto, a remoção do folículo dominante determina a formação de uma nova onda folicular, a qual beneficia os ovócitos de folículos subordinados, permitindo que estes permaneçam no ambiente folicular por mais tempo antes da OPU, adquirindo assim a competência para o desenvolvimento embrionário (SIRARD et al., 1999; MERTON et al., 2003; CHAUBAL et al., 2006).

Existem evidências da influência do tamanho folicular na qualidade ovocitária e posterior capacidade do desenvolvimento embrionário após a fecundação (BOLS et al., 1995). Este potencial é atribuído aos fatores de crescimento presentes nesta categoria, os quais contribuem no incremento das taxas de maturação nuclear e citoplasmática (LONERGAN et al., 1994). Por outro lado, folículos menores de dois mm não são competentes para PIV, pois ainda não completaram a fase de desenvolvimento e síntese de RNA (HENDRIKSEN et al., 2004).

Os transdutores convexos ou setoriais são utilizados na maioria dos trabalhos realizados com OPU. Os transdutores lineares são menos indicados devido a restrição de espaço entre o transdutor e a agulha, o que limita a punção de todas as regiões do ovário (BOLS et al., 2004). Quanto a frequência

do transdutor, pode ser de 3.5 MHz, 5.0 MHz, 6.5 MHz ou 7.5 MHz (SENEDA et al., 2001).

As agulhas hipodérmicas descartáveis são hoje as mais utilizadas, elas causam menos danos ao tecido ovariano e podem ser facilmente substituídas, evitando assim o risco de transmissão de patógenos entre doadoras (BOLS et al., 1995). As agulhas de maior calibre proporcionam maiores taxas de recuperação de ovócitos, independente da pressão de vácuo (BOLS et al., 1995). Entretanto, as agulhas de menor calibre são menos danosas ao tecido ovariano, por apresentarem menor área de corte, apesar das maiores perdas de ovócitos ou das células do *cumulus* (BOLS et al., 1995). Outro aspecto que influencia na eficiência da aspiração é o bisel das agulhas. Assim, as agulhas de bisel longo permitem uma penetração rápida e precisa no interior do folículo, dificultando o extravasamento do conteúdo folicular (MANIK, SINGLA e PALTA, 2003).

A pressão do vácuo também é um fator que pode influenciar na qualidade dos ovócitos recuperados. Assim, pressões elevadas podem levar a perda das células do *cumulus* e até mesmo ao desnudamento do ovócito (BOLS et al., 1995; GALLI et al., 2001). Para se obter uma pressão ideal, recomenda-se mensurar o volume de água obtido por minuto, o que pode variar entre 4,4 a 40,0 mL (SENEDA et.al., 2001), sendo o volume entre 13 e 15 mL o mais descrito na literatura.

A coleta de ovócitos pode ser realizada duas vezes por semana por um longo período de tempo, sem causar prejuízos a fertilidade das doadoras (SIRARD et al., 1999). Esta periodicidade aumenta consideravelmente o número de folículos disponíveis por punção (7,0 versus 16,2), de ovócitos

recuperados (5,2 versus 12,2), e de embriões produzidos (MERTON et al., 2003). Além disso, OPU duas vezes por semana não permite o desenvolvimento de um folículo dominante, o qual afetaria negativamente na qualidade dos ovócitos em crescimento (GALLI et al., 2001).

A repetibilidade das sessões, além do tipo e calibre da agulha, pode acarretar lesões no epitélio ovariano e alterações nos órgãos genitais, as quais podem ou não levar ao comprometimento da fertilidade. Os ovários podem sofrer espessamento do epitélio, o que dificulta a visualização dos folículos, além de aderências, que afetam a mobilidade dos mesmos. Também é observada a presença de fibrose, dependendo do número de folículos puncionados, a qual leva a alterações de consistência ovariana (VIANA et al., 2003).

A experiência do aspirador pode ter efeito significativo na quantidade e qualidade dos ovócitos recuperados (MERTON et al., 2003). Outros aspectos que também influenciam na qualidade ovocitária são as condições em que os ovócitos são transportados ao laboratório, que inclui o meio utilizado, a temperatura e o tempo desde a recuperação dos ovócitos até o seu cultivo (WARD et al., 2000).

2.5. Maturação ovocitária

Aos 110 dias de gestação, os ovários de um feto bovino fêmea possui aproximadamente 2.700.000 ovócitos, sendo este número reduzido a 70.000 ao nascimento (HAFEZ e HAFEZ, 2004). Entretanto, somente pequena parte deles se desenvolvem a folículos antrais e ovulam ao longo da vida reprodutiva da vaca (SATO et al., 1990).

A maturação envolve modificações nucleares, citoplasmáticas e moleculares que interagem entre si, e garantem a plena capacitação do ovócito (SIRARD et al., 2006). A maturação inadequada, seja do núcleo ou do citoplasma, inviabiliza a fecundação e aumenta a ocorrência de poliespermia, partenogênese e bloqueio do desenvolvimento embrionário (XU e BRACKET, 1988). A maturação citoplasmática ocorre concomitante a nuclear e envolve eventos complexos, como a modulação da síntese de proteínas, redistribuição das organelas intracelulares, compactação do nucléolo, aumento da quantidade de lipídios, além da diminuição ou perda da atividade transcricional (GONÇALVES et al., 2008).

O processo de maturação ovocitária nuclear inicia ainda na vida embrionária, por volta dos 80 dias de gestação (BILODEAU-GOEESELS, 2008), passando pelos estádios de leptóteno, zigóteno e paquíteno, dipóteno da prófase I da meiose, com o primeiro bloqueio da divisão celular na fase de dictióteno (OHNO & SMITH, 1964), nesse momento, o núcleo apresenta cromatina condensada e transcionalmente ativa, denominado vesícula germinativa (VG).

O bloqueio das divisões meióticas na fase de prófase I é mediado por substâncias inibitórias. Embora muitas delas ainda não sejam conhecidas, deve-se considerar que o desenvolvimento do ovócito dentro do folículo é controlado por vários fatores endócrinos e locais, como hormônios, fatores de crescimento e peptídeos (TOSTI, 2006). Após a aspiração dos folículos, os ovócitos são retirados deste complexo inibitório, adquirindo então a capacidade de reassumir a meiose, a partir do estágio estacionário de dictióteno (OHNO & SMITH, 1964).

A cAMP (Adenosina 3'-5' monofosfato cíclico) é um segundo mensageiro celular produzido endogenamente pelo ovócito ou é transferido a eles pelas *gap junctions*. Ela está relacionada ao bloqueio prolongado dos ovócitos em prófase I ou com a retomada da meiose, de acordo com a oscilação da sua concentração intraovocitária e sua relação com as PKAs (proteínas Kinases). Deste modo, na ausência de cAMP as PKAs se mantêm inativas. Entretanto, na sua presença, ocorre a sua ligação com as PKAs, promovendo a fosforilação e a desfosforilação de proteínas específicas envolvidas nestes processos celulares (DEKEL, 2005).

Existem dois tipos de PKAs: PKAI e PKAII. A PKAI é produzida no ovócito e está relacionada à manutenção do bloqueio meiótico, enquanto que a PKAII é produzida nas células do *cumulus*, participando da expansão destas células e também do reinício da meiose (DOWNS e DUNN, 1995). Outras moléculas importantes que participam da reativação da meiose são o MPF (Fator promotor da maturação) e a MAPK (Proteína quinase ativada por mitógenos), sendo que a ativação destas moléculas também estão relacionadas à concentração de cAMP e PKA.

Em síntese, no processo de retomada da meiose I *in vivo*, ocorre aumento da concentração do cAMP intraovocitário por estímulo gonadotrófico, ocorrendo, conseqüentemente, a ativação da PKAII. Isto irá resultar na expressão de substâncias indutoras da quebra da vesícula germinativa (SU et al., 2003). Contudo, altas concentrações intraovocitárias de cAMP também inibem a ativação do MPF (JOSEFSBERG et al., 2003). Posteriormente, com a ovulação, ocorre interrupção da transferência de cAMP e de moléculas inibidoras da retomada da meiose. Tendo em vista que a meia vida da cAMP é

muito curta (TSAFRIRI et al., 1996), rapidamente ocorre redução da sua concentração intraovocitária, causando a inativação da PKAI e ativação do MPF (DEKEL, 1996).

Portanto, com a oscilação na concentração de cAMP, ocorrerá o rompimento da vesícula germinativa, que é o evento que marca a retomada da meiose I *in vivo* e *in vitro*. Porém, é importante ressaltar que há diferenças nos processos de maturação *in vitro* ou *in vivo*. Assim, *in vivo* ocorre a ação gonadotrófica sobre as células da granulosa e indução da expressão de fatores indutores da maturação nuclear, sendo que *in vitro*, a retomada da meiose ocorre de forma “espontânea” após a remoção do ovócito do ambiente folicular (BYSKOV et al., 1997; DEKEL, 2005).

O rompimento da vesícula germinativa ocorre entre oito a 12 horas (GONÇALVES et al., 2008), progredindo para a fase de diacinese, momento em que se observa dissolução da membrana nuclear, migração do núcleo para a periferia e condensação da cromatina (HAFEZ e HAFEZ, 2004). Após reiniciar a primeira divisão meiótica, os ovócitos bovinos necessitam de aproximadamente três horas para atingir MI, e três horas para anáfase e telófase I (GONÇALVES et al., 2008), quando ocorre o desaparecimento do nucléolo, extrusão do primeiro corpúsculo polar e formação do segundo fuso meiótico.

Os cromossomos atingem a metáfase da segunda divisão meiótica (MII), em aproximadamente quatro horas (GONÇALVES et al., 2008). Esta etapa é caracterizada pela presença dos cromossomos arranjados no centro do fuso e do primeiro corpúsculo polar no espaço perivitelínico, momento que ocorre o segundo bloqueio da meiose (GORDON et al., 1994). Elevadas concentrações

de MAPKs e MPF são importantes na manutenção do ovócito em estágio de MII, porém, também estão envolvidas no reinício e progressão da meiose II (SU et al., 2003). O intervalo entre o primeiro e segundo bloqueio da meiose é de aproximadamente 18 a 22 horas (GONÇALVES et al., 2008).

Após a reativação da segunda divisão meiótica por estímulo da fecundação, ocorre queda abrupta na concentração intraovocitária de MAPK e MPF, quando os ovócitos maduros progridem de MII a telófase II, finalizando a maturação nuclear, a qual resulta na extrusão do segundo corpúsculo polar (SU et al., 2003).

Em bovinos, diferentemente de algumas espécies, a capacidade de atingir os estádios de MI e II é adquirida em um mesmo momento. Entretanto, pode ocorrer a retenção em MI devido à deficiência de fatores que regulam o ciclo celular, já que estas duas etapas requerem mecanismos moleculares distintos (SIRARD, RICHARD e MAYES, 1998; SIRARD et al., 2006).

A competência para retomar a meiose e sofrer a quebra da vesícula germinativa é obtida quando os ovócitos atingem o diâmetro 100µm. Todavia, a competência para completar a maturação até o estágio de MII ocorre quando o ovócito atinge aproximadamente 110µm. Este diâmetro está diretamente relacionado ao tamanho do folículo. Assim, estes ovócitos são encontrados em folículos quando atingem 3mm de diâmetro. O potencial de desenvolvimento embrionário é adquirido mais tardiamente, quando os ovócitos atingem o diâmetro de 120µm, os quais estão contidos em folículos maiores de 3mm (HYTTEL et al., 1987). Segundo Hendriksen et al. (2000), a aquisição da competência pelo ovócito coincide com o término de seu crescimento e com a síntese da maioria dos RNAs.

Na maioria das vezes, os ovócitos recuperados a partir de folículos antrais são capazes de completar a maturação nuclear. Contudo, nem todos têm a capacidade de se desenvolver até o estágio de blastocisto. Um ovócito competente possui o potencial de desenvolver-se até o estágio de blastocisto, após a maturação e fecundação, podendo resultar posteriormente em gestação (SIRARD et al., 2006).

2.5.1. Maturação *in vitro* (MIV)

A MIV é uma das etapas da PIV, que consiste em uma série de eventos que ocorrem no ovócito imaturo, para que o mesmo adquira competência necessária para as etapas de FIV e cultivo *in vitro* (CIV) (GONÇALVES et al., 2008).

A execução da MIV de maneira adequada é fundamental para o sucesso da PIV, considerando a grande diferença entre ovócitos maturados *in vivo* e *in vitro*, quanto à capacidade de desenvolvimento até o estágio de blastocisto. Assim, a taxa de ovócitos competentes para tal condição é de 60 a 80% e 25 a 40% para ovócitos maturados *in vivo* e *in vitro*, respectivamente (FARIN et al., 2007).

O meio mais utilizado em laboratórios para maturação *in vitro* é o TCM199, acrescido de soro fetal bovino e gonadotrofinas (LH, FSH). Os ovócitos são incubados neste meio a 39°C em 5% de CO₂ e 95% de ar com alta umidade por 24 horas (HAFEZ e HAFEZ, 2004). A adição de gonadotrofinas ao meio de cultivo pode induzir à maturação citoplasmática, expansão do *cumulus* e melhorar o desenvolvimento embrionário (CALDER et al., 2003). O FSH promove a expansão das células do *cumulus* por retenção de

água, induzida pelo ácido hialurônico. A adição de estrógeno ao meio de maturação afeta negativamente a maturação nuclear e, consequentemente, o desenvolvimento embrionário. Embora estes efeitos sejam atenuados na presença do FSH, os protocolos de maturação sugerem a omissão deste hormônio aos meios (GONÇALVES et al., 2008).

Ovócitos recuperados para PIV geralmente são obtidos de folículos de dois a oito milímetros de diâmetro. Aqueles contidos em folículos menores que 2mm de diâmetro geralmente não são competentes para reiniciar a meiose. Adicionalmente, elevada proporção daqueles com mais de 8mm tem viabilidade comprometida pelo processo de atresia (GONÇALVES et al., 2008).

A maioria dos ovócitos maturados *in vivo* completa o seu desenvolvimento nuclear, não havendo diferença daqueles que alcançaram MII em cultivo *in vitro* (SIRARD e BLONDIN, 1996). Porém, são encontradas diferenças em relação à maturação citoplasmática, já que poucos se desenvolvem até o estágio de blastocisto *in vitro* (HYTTEL et al., 1987). Neste contexto, existe uma assincronia entre os processos de maturação nuclear e citoplasmática de COCs recuperados de pequenos folículos antrais. Destarte, o desenvolvimento molecular e celular necessários para suportar a maturação e a fase inicial da embriogênese ainda não estão completos, resultando em menores taxas de desenvolvimento embrionário (GILCHRIST e THOMPSON, 2007).

A seleção adequada dos ovócitos destinados a PIV é imprescindível para obtenção de bons resultados. Ovócitos de boa qualidade, com boas características morfológicas e de desenvolvimento são essenciais para o cultivo *in vitro* (SENEDA et al., 2001). Ovócitos bovinos que apresentam

citoplasma homogêneo com granulações finas, coloração marron e envolvidos completamente por várias camadas compactas de células do *cumulus* são considerados de alto potencial para desenvolvimento embrionário (GONÇALVES et al., 2008).

Uma das principais características para classificação morfológica dos ovócitos são as células do *cumulus*. Apesar de não serem essenciais para maturação nuclear, comprometem os eventos citoplasmáticos (GONÇALVES et al., 2008). A presença das células do *cumulus* durante a maturação é necessária para a expressão da competência na maioria dos ovócitos (SIRARD et al., 2006). Assim, um ovócito imaturo com um número maior de camadas das células do *cumulus* possui melhor competência de desenvolvimento (LONERGAN, 1992). Neste mesmo raciocínio, ovócitos desnudos não terão competência para se desenvolver em um embrião viável após a fecundação (GOTTARDI e MINGOTI, 2009). O reduzido número de camadas de células do *cumulus* pode ser causado pelo processo de aspiração dos ovócitos e pela fase inicial de atresia (SIRARD e BLONDIN, 1996).

As células do *cumulus* são uma subpopulação das células da granulosa, porém, com uma função diferente. Estas células fornecem nutrientes aos ovócitos durante o crescimento, participam na formação da zona pelúcida e estimulam a síntese de ácido hialurônico o qual induz a mucificação e expansão do *cumulus* durante a maturação (GONÇALVES et al., 2008).

O ácido hialurônico que é depositado entre as células, causa expansão dessas células. Essa expansão aumenta gradativamente e resulta em diminuição das ligações metabólicas existentes entre os complexos oócitos cumulus (COCs) (GONÇALVES et al., 2008).

Durante a maturação, as células do *cumulus*, possuem um importante papel no suprimento de substrato nutritivo e passagem de componentes químicos reguladores da maturação para o ovócito (HYTTEL, 1987).

Outro fator que influencia na capacidade de desenvolvimento é a quantidade de ovócitos cultivados ao mesmo tempo em uma placa (DE ROOVER et al., 2008). Assim, ovócitos maturados em grupos de 10 a 20 por microgota de cultivo apresentam maior taxa de formação de blastocistos que aqueles cultivados em grupos de cinco (BRUM et al., 2005). Esta condição ocorre tendo em vista que, durante a maturação, os ovócitos produzem fatores de crescimento, os quais são liberados no meio de cultivo. Deste modo, a interação de vários ovócitos em uma mesma gota de cultivo é benéfica para o desenvolvimento embrionário (O'DOHERTY et al., 1997).

Diante das informações apresentadas, destaca-se a importância em compreender as necessidades metabólicas do ovócito em sistemas de cultivo de maturação *in vitro*, para que o mesmo adquira competência de desenvolvimento e torne-se hábil para sustentar o desenvolvimento inicial do embrião.

2.6. Transmissão do BoHV1 por meio da PIV

A comercialização de material de multiplicação animal, principalmente sêmen, embriões e ovócitos, se tornou uma prática comum nos dias atuais e necessária para o incremento e manutenção da produtividade no setor pecuário. Apesar dos avanços tecnológicos obtidos na área, a questão sanitária é um fator preocupante (MACDIARMID e PHARO, 2003). Segundo as normas publicadas no manual da Sociedade Internacional de Transferência de

Embriões – IETS (1998; 2009), os protocolos sanitários reduzem extremamente o risco de transmissão de patógenos por embriões produzidos *in vivo* ou *in vitro*. As exigências para o comércio conferem segurança e minimizam os riscos de introdução de agentes infecciosos dentro de um rebanho controlado ou livre de certa doença (SILVA-FRADE, 2010).

O risco sanitário pela exposição ao BoHV1 é maior para embriões produzidos *in vivo* do que *in vitro* (STRINGFELLOW e WRATHALL, 1995; GUERIN et al., 1997). A suscetibilidade destes embriões é conferida por diferenças morfológicas e fisiológicas, além da manipulação e contato prolongado com produtos biológicos, o que aumenta o risco de contaminação por microrganismos patogênicos e não patogênicos, em relação aos produzidos *in vivo* (STRINGFELLOW et al., 1990).

São consideradas as principais fontes potenciais de transmissão de doenças em um sistema PIV, os gametas e seus fluidos, o embrião e o procedimento de manipulação do embrião (instrumentos, equipamentos). Também são importantes os materiais de origem animal utilizados para suplementação dos meios de cultura (soro fetal bovino, albumina sérica bovina), as células somáticas, os meios de lavagem, o transporte, a condição da receptora e da doadora (OLIVEIRA, 2007).

A interação entre gametas e embriões com patógenos tem sido amplamente estudada. Geralmente, está relacionada a agentes virais com interferência na reprodução, principalmente ao BoHV1, causador da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) (GUERIN, 1990; BIELANSKI e DUBUC, 1994; VANROOSE et al., 1999; MAKAREVICH et al., 2007).

2.6.1. Doadoras e receptoras

A realização da PIV de embriões utilizando ovócitos bovinos provenientes de doadoras com sanidade controlada (exigência para a comercialização) dificulta a disseminação de agentes infecciosos. Porém, ovócitos procedentes de animais de abatedouros, com estado sanitário desconhecido, é uma prática que apresenta risco potencial na transmissão de patógenos (BIELANSKI et al., 1993; D'ANGELO et al., 2002; FERREIRA et al., 2005). Receptoras saudáveis e livres de doenças infecciosas garantem melhores taxas de gestação de embriões produzidos *in vitro*. Portanto, as doadoras e receptoras devem ser procedentes de rebanhos livres ou vacinadas para as principais doenças infecciosas. (OLIVEIRA, 2007).

2.6.2. Materiais e equipamentos

A contaminação microbiológica proveniente do meio ambiente pode resultar na contaminação do produto manipulado, por meio dos materiais e equipamentos utilizados desde a coleta dos ovócitos até o cultivo dos embriões. A higiene durante o processo, o uso de materiais descartáveis e o uso da tripsina para desinfecção dos recipientes usados, são recomendáveis para assegurar a sanidade do embrião produzido (EDENS et al., 2003).

2.6.3. Meios de cultura

Todos os meios utilizados no cultivo *in vitro* podem ser fonte de contaminação viral (STRINGFELLOW e GIVENS, 2000). Assim, o soro fetal bovino (SFB), a soroalbumina (BSA), os hormônios, as células somáticas e as enzimas, por serem produtos de origem biológica, representam considerável

potencial de transmissão de agentes infecciosos quando adicionados ao sistema de PIV (OLIVEIRA, 2007).

A utilização do BSA representa um menor risco devido ao seu processo de produção, que envolve altas temperaturas (65 - 75°C por mais de três horas), inativando muitos agentes infecciosos. Entretanto, a contaminação do SFB é comum, sendo recomendada a utilização de soros tratados termicamente ou por irradiação gama (PERRY, 2007).

O álcool polivinílico (PVA) representa uma alternativa eficiente para substituição do SFB em protocolos de PIV, por constituir-se de uma macromolécula não protéica, que não apresenta risco biológico ao embrião (NOWSHARI e BREM, 2000).

Frequentemente, as monocamadas de células do *cumulus* de ovócitos ou células epiteliais ciliadas do oviduto de vacas de abatedouro são utilizadas na maturação de ovócitos e na cultura de zigotos. A utilização destas células somáticas deve ser evitada, tendo em vista a possibilidade de carrear patógenos ao sistema de cultivo, que podem se replicar e acarretar prejuízos ao desenvolvimento embrionário (GIVENS et al., 2002).

2.6.4. Sêmen e FIV

Touros podem ser carreadores do BoHV1 durante toda a vida após uma infecção primária ou imunização com vacinas vivas atenuadas. A eliminação do vírus pelo sêmen pode ocorrer intermitentemente em alguns animais ou pode ser desencadeada por fatores estressantes (VAN OIRSCHOT, 1995). O manejo adequado, livre de estresse, pode ser favorável a animais

soropositivos, evitando assim a eliminação viral em determinados intervalos de tempo (EAGLESOME e GARCIA, 1997).

A contaminação do sêmen ocorre no momento da ejaculação, quando o vírus está presente nas mucosas do prepúcio, pênis e uretra, podendo se aderir à membrana celular dos espermatozóides (WYLER et al., 1989; VAN OIRSCHOT, 1995; GIVENS e MARLEY, 2008).

A qualidade seminal pode estar comprometida em touros soropositivos, embora não esteja ligada diretamente ao efeito do vírus no espermatozóide (VAN OIRSCHOT et al., 1995). A motilidade espermática e a integridade acrossomal parecem não ser afetadas pelo vírus (VANROOSE et al., 1999; TANGHE et al., 2005; GIVENS e MARLEY, 2008).

A utilização de sêmen contaminado com BoHV1 na IA e na FIV é considerada um risco potencial para sua transmissão. Uma vaca inseminada pode estabelecer ou não uma infecção, dependendo da quantidade de vírus na palheta e da cepa do vírus, pois existem aquelas que possuem maior afinidade pelos órgãos genitais (MILLER e VAN DER MAATEN, 1986).

Guerin et al. (1990) sugerem que o vírus aderido ao espermatozóide poderia penetrar no ovócito no momento da fecundação. Porém, o processo de penetração é dificultado na presença de partículas virais aderidas, podendo reduzir em até 60% da ligação do espermatozóide à zona pelúcida (VANROOSE et al., 1999; TANGHE et al., 2005), além de reduzir a taxa de clivagem e de formação de blastocistos (BIELANSKI e DUBUC, 1994; VANROOSE et al., 1999) e também comprometer o desenvolvimento embrionário (MAKAREVICH et al., 2007).

O tratamento do sêmen com gamaglobulinas presentes no soro hiperimune é uma alternativa efetiva na neutralização do vírus, sem comprometimento de sua fertilidade (SCHULTZ et al., 1988). Também o tratamento com tripsina na concentração de 0,25%, resulta em satisfatória remoção do BoHV1, não comprometendo a fertilidade do sêmen. Todavia, a concentração de 0,3% danifica a membrana plasmática e diminuiu a motilidade espermática (SILVA et al., 1999).

O Código Sanitário dos Animais Terrestres da OIE prevê medidas para comercialização de sêmen livre de BoHV1. A certificação pode ser concedida quando o touro doador for mantido em uma central de IA ou em um rebanho livre. Para esta certificação, amostras de sangue obtidas em intervalos de 30 dias durante a coleta, devem ser testadas para anticorpos contra BoHV1 e apresentar resultados negativos. Para touros soropositivos ou com *status* sorológico desconhecido, uma amostra de sêmen deve ser submetida a testes de isolamento do vírus, com resultados negativos (OIE, 2008).

2.6.5. Ovócitos, Fluidos e MIV

O BoHV1 já foi encontrado associado a ovócitos (FERREIRA et al., 2005), líquido folicular (FERREIRA et al., 2005; MARLEY et al., 2008; D'ANGELO et al., 2009), células da granulosa (BIELANSKI et al., 1987), células epiteliais de oviduto bovino (GIVENS et al., 2002; D'ANGELO et al., 2009), corpos lúteos e líquidos tubáricos após infecção experimental (GUERIN et al., 1989; BIELANSKI e DUBUC, 1994).

O ovócito pode ser infectado antes da ovulação por meio do contato do vírus com o tecido ovariano ou o líquido folicular, e após a ovulação, pelo vírus associado ao sêmen (BIELANSKY et al., 1993).

Segundo Guerin et al. (1990), a maturação *in vitro* de ovócitos não é prejudicada quando eles são expostos ao BoHV1. Entretanto, embora a expansão das células do *cumulus* ocorra normalmente, a presença deste vírus causa um efeito citopático nas mesmas, caracterizado pelo arredondamento das células do *cumulus* com falha na produção de uma monocamada confluyente após a maturação (VANROOSE et al., 1999).

2.6.6. Gap junctions

Os processos citoplasmáticos emitidos pelas células da corona radiata formam projeções que atravessam a ZP e terminam em junções sobre a membrana citoplasmática do ovócito. Neste contato das membranas das células da corona com a membrana do ovócito ocorrem os chamados *gap junctions* (ALLWORTH e ALBERTINI, 1993). Segundo Vanroose et al. (2000) Os poros observados na superfície da ZP provavelmente correspondem à entrada destas projeções. Após a maturação, estes processos celulares se retraem ou desintegram, fechando os canais formados na ZP (IETS, 1998). Essas projeções permitem o contato com as células da granulosa e a passagem de íons inorgânicos, segundos mensageiros, metabólitos de glicose e nucleotídeos, necessários para reativação da meiose e alterações durante a maturação (KIDDER e MHAWI, 2002; GONÇALVES et al., 2008).

2.6.7. Embriões

Em condições *in vivo*, o contato inicial do embrião com o vírus ocorre quando a carga viral está alta nos órgãos genitais femininos. O vírus pode alcançar a membrana celular do embrião na ausência da ZP, ou pela passagem pela mesma (SPEAR, 2004). Segundo Miller et al. (1991), Bielasni et al. (1997), Vanroose et al. (1998), o vírus pode comprometer o desenvolvimento do embrião e do feto em qualquer fase da gestação.

Inúmeras pesquisas relatam o efeito deletério do BoHV1 no sistema de PIV. A reduzida proporção de desenvolvimento de blastocistos viáveis foi descrita por Guerin et al. (1990), Blalanski e Dubuc (1994), Vanroose et al. (1999), Makarevich (2007). Já Makarevich (2007) observou comprometimento no desenvolvimento embrionário pré-implantação após exposição ao BoHV1. Este pesquisador conclui que a influência da infecção viral na viabilidade dos embriões depende do título viral.

2.6.8. Zona Pelúcida

A zona pelúcida (ZP) é uma estrutura glicoprotéica que possui várias funções, tal como permitir a ligação do espermatozóide de maneira espécie específica, bloqueio da poliespermia e prevenir a dispersão dos blastômeros durante a pré-implantação. Além disto, facilita a passagem dos embriões pela tuba uterina e protege o embrião durante os estádios iniciais de desenvolvimento (EPIFANO e DEAN, 1994). A ZP também possui importante função na proteção de ovócitos e embriões contra a infecção viral (VANROOSE et al., 2000; MAKAREVICH et al., 2007). Todavia, a ZP dos ovócitos imaturos e embriões é muito irregular, com presença de diversos poros, fendas e

projeções. O diâmetro médio destes poros analisados por Vanroose et al. (2000) foi de 182 nm em ovócitos, 223 nm em zigotos, 203 nm em embriões de 8 células e 155 nm em mórulas.

Strinfellow e Givens (2000) afirmam que nenhum patógeno viral é capaz de penetrar na ZP de ovócitos, zigotos e embriões bovinos. Também vários autores afirmam que o BoHV1 é incapaz de penetrar na ZP intacta (BOWEN, 1985; BIELANSKI et al., 1987; VANROOSE et al., 1997; 1998; 1999; STRINGFELLOW e GIVENS, 2000). Entretanto, considerando o tamanho das partículas virais do BoHV-1, 180–200 nm, seria possível a entrada desses vírus através da ZP intacta, já que existem poros com diâmetro maior em embriões nos diferentes estágios de desenvolvimento (VANROOSE et al., 2000). Silva-Frade (2010) também confirmou que a zona pelúcida não é uma barreira eficaz para proteger ovócitos e prováveis zigotos da infecção pelo BoHV5.

Entretanto, Vanroose et al. (2000) afirmam que partículas com tamanho aproximado de 180–200 nm podem atravessar parte da ZP, chegando à camadas mais internas, mas não conseguiriam atravessá-la totalmente. Os vírus também podem estar aderidos a zona pelúcida e infectar o embrião no momento da fecundação. Na estrutura da ZP de zigotos fecundados, foi observada a formação de escavações e fissuras com dimensões exatas da cabeça espermática, podendo proporcionar um ponto de entrada para o vírus no momento da fecundação. Nesse local, o vírus pode estar protegido contra eventuais medidas sanitárias, como por exemplo, lavagens e tratamento com tripsina.

Considerando as condições de cultivo, a ZP dos embriões PIV possuem algumas diferenças na estrutura físico-químicas (JOOSTE, 2005) que as torna

mais susceptíveis a adsorção viral (STRINGFELLOW e WRATHALL, 1995; GUERIN, 1997). Contudo a replicação viral pode ocorrer em embriões sem ZP (BIELANSKI et al., 1987; BOWEN, 1985).

2.7. Procedimento para remoção ou inativação do BoHV1

2.7.1. Tratamento com tripsina

O protocolo para remoção ou inativação de patógenos aderidos a gametas e embriões é descrito pelo Manual da IETS (1998). A solução de lavagem é composta por salina fosfatada tamponada (PBS), contendo 0,4 % de BSA e antibiótico de amplo espectro. Para embriões e ovócitos, são realizadas 10 lavagens, sendo a tripsina na concentração de 0,25% adicionada nas primeiras cinco lavagens. Nas posteriores é adicionado 2% de soro fatal bovino para remoção de qualquer enzima residual. Após a série de lavagens, os embriões são analisados microscopicamente para verificar a integridade da ZP e ausência de material aderido.

A eficácia deste tratamento na remoção do BoHV1 é dependente da origem do embrião. Stringfellow e Givens (2000) e Jooste (2005) afirmam que ovócitos expostos ao BoHV1 durante as etapas de MIV e FIV podem não se tornar livres do vírus após o protocolo de lavagem dos mesmos, enquanto que embriões produzidos *in vivo* podem ser considerados livres após o mesmo protocolo. Bielanski et al. (1987) concluíram após vários trabalhos, que embriões produzidos *in vitro* tem maior capacidade de carrear o BoHV1 após infecção experimental, além da dificuldade de desinfecção dos mesmos por meio do tratamento com tripsina. Já os resultados obtidos por Singh et al. (1983), Stringfellow et al. (1990) e Edens et al. (2003) comprovariam a eficácia

do tratamento em embriões *in vivo* com ZP intacta, na remoção do BoHV1, após exposição ao vírus.

Todavia, vários estudos têm reportado que as lavagens com tripsina não foram suficientes para remoção do BoHV1 de embriões PIV e não melhoram as taxas de embriões transferíveis (BIELANSKI e DUBUC, 1994; BELANSKI et al., 1997; EDENS et al. 2003; D'ANGELO et al., 2009). O estudo conduzido por Bielanski e Dubuc (1994) produziu um sistema de PIV contaminado, com a utilização de ovócitos de doadoras infectadas naturalmente e artificialmente com BoHV1. Por meio deste procedimento produziram embriões contaminados, os quais não ficaram livres do vírus, mesmo após o tratamento com tripsina, sendo então potenciais transmissores. Também D'Angelo (2009) mostrou que embriões PIV expostos ao BoHV1 e submetidos ao tratamento com tripsina, conforme recomendado, não foi eficiente na eliminação do vírus, sendo verificados resultados positivos no *Nested-PCR* e em cultura de células Madin Darby de rim bovino (MDBK). Contudo, Seidel et al. (2007) verificaram uma diminuição de vírus aderidos a ovócitos e embriões. Estes dados sugerem que ainda não existe um consenso sobre a eficácia do uso da tripsina e a prevenção da infectividade de embriões após a transferência.

2.8. Referências

ACKERMANN, M.; PETERHANS, E.; WYLER, R. DNA of bovine herpesvirus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. **American Journal of Veterinary Research**, v.43, p.36-40, 1982.

ACKERMANN, M.; BÉLAK, S.; BITSCH, V.; EDWARDS, S.; MOUSSA, A.; ROCKBORN, G.; THIRY, E. Round table on infectious bovine rhinotracheitis infectious pustular vulvovaginitis virus infection diagnosis and control. **Veterinary Microbiology**, v.23, p.361-363, 1990.

AFFONSO, I.B.; AMORIL, J.G.; ALEXANDRINO, B.; BUZINARO, M.G.; RAMOS, A.S.M.; SAMARA, S.I. Anticorpos contra o herpesvirus bovino tipo 1

(BoHV-1) nas dez regiões de planejamento do estado de Goiás, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.4, p.892-98, 2010.

ALICE, J.F. Isolamento do vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) no Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, v.38, n.4, p.919-20, 1978.

ALLWORTH, A.; ALBERTINI, D. Meiotic maturation in cultured bovine oocytes is accompanied by remodeling of the cumulus cell cytoskeleton. **Developmental Biology**, v.158, p.101-121, 1993.

BIELANSKI, A.; LUTZE-WALLACE, C.; SAPP, T.; JORDAN, L. The efficacy of trypsin for disinfection of in vitro fertilized bovine embryos exposed to bovine herpesvirus 1. **Animal Reproduction Science**, v.47, p.1-8, 1987.

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.

BILODEAU-GOESEELS, S. Review: The regulation of meiotic maturation in bovine oocytes. **Canada Journal of Animal Science**, v.88, p.343-349, 2008.

BLONDIN, P.; SIRARD, M. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocyte. **Molecular Reproduction and Development**, v.41, p.54-62, 1995.

BOLS, P.E.J.; VANDENHEEDE, J.M.M.; VAN SOOM, A.; DE KRUIF, A. Transvaginal ovum pick up (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. **Theriogenology**, v.43, p.677-87, 1995.

BOLS, P.E.J.; LEROY, J.L.M.R.; VANHOLDER, T.; VAN SOOM, A. A comparison of a mechanical sector and a linear array transducer for ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval (OPU) in the cow. **Theriogenology**, v.62, p.906-14, 2004.

BORDIGNON, V. ; MORIN, N.; DUROCHER, J.; BOUSQUET, D. ; SMITH, L.C. GnRH improves the recovery rate and the in vitro developmental competence of oocytes obtained by transvaginal follicular aspiration from superstimulated heifers. **Theriogenology**, v.48, p.291-8, 1997.

BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; MORIN, N.; BRISSON, C.; CRBONNEAU, G.C.; DUROCHER, J. In vitro embryo production in the cow: an

effective alternative to the conventional embryo production approach. **Theriogenology**, v.51, p.59-70, 1999.

BOWEN, R.A.; ELDTSEN, R.P.; SEIDEL, G.E. Infection of early bovine embryos with Bovine Herpes virus-1. **American Journal of Veterinary Research**, v.46, p.1095-97, 1985.

BRUM, D.S.; LEIVAS, F.G.; SILVA, C.A.M.; RUBIN, M.I.B.; RAUBER, L.P.; FIALHO, S.S.; PILLA, L.F.C.; BERNARDI, M.L. The effects of the number of oocytes and the volume of maturation medium in bovine in vitro embryo production. **Animal Reproduction**, v.2. n.1, p.70-73, 2005.

BYSKOV, A.G. et al. Cumulus cells of oocyte– cumulus complexes secrete a meiosis activating substance when stimulated with FSH. **Molecular Reproduction and Development**, v.46, p.296-305, 1997.

CALDER, M.D.; CAVENEY, A.N.; SMITH, L.C.; WATSON, A.J. Responsives of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNA during maturation in vitro. **Reproduction Biology and Endocrinology**, v.1, p.14, 2003.

ČECH, S.; HAVLICEK, V.; LOPATAROVA, M.; VYSKOCIL, M.; DOLEZEL, R. Effects of superstimulation with FSH on follicular population and recovery rate of oocytes in the growing phase of the first and second follicular wave. **Veterinary Medicine**, v.47, p.33-37, 2002.

CHAUBAL, S.A.; MOLINAB, J.A.; OHLRICHSB, C.L.; FERREB, L.B.; FABERB, D.C.; BOLSC, P.E.J.; RIESEND, J.W.; TIANA, X.; YANGA, X. Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. **Theriogenology**, v.65, p.1631-1648, 2006.

CHAPMAN, M.S.; LUCAS, M.H.; HEBERT, C.N.; GOODEY, R.G. Survival of infectious bovine rhinotracheitis virus in stored bovine semen. **Veterinary Research Communications**, v.3, n.2, p.137-139, 1979.

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. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, p.536-539, 2009.

DEKEL, N. Protein phosphorylation/dephosphorylation in the meiotic cell cycle of mammalian oocytes. **Reviews of Reproduction**. v.1, p.82-8, 1996.

DEKEL, N. Cellular, biochemical and molecular mechanism regulating oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.234, p.19-25, 2005.

DIAS, J.A. Fatores de risco associados à infecção pelo herpesvírus bovino 1 em rebanhos bovinos da região Oeste do Estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.3, p.161-168, 2008.

DOWNS, S.M.; DUNN, H.M. Differential regulation of oocyte maturation and cumulus expansion in the mouse oocyte-cumulus cell complex by site-selective analogs of cyclic adenosine monophosphate. **Developmental Biology**, v.172, p.72-85, 1995.

DREW, T.W.; HEWITT-TAYLOR, C.; WATSON, L., EDWARDS, S. Effect of storage conditions and culture technique on the isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from bovine semen. **Veterinary Record**, v.121, n.23, p.547-548, 1987.

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

EDENS, M.S.D.; GALIKA, P.K.; RIDDELLA, K.P.; GIVENSA, M.D.; STRINGFELLOWA, D.A.; LOSKUTOFFB, 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.

ENGELS, M., ACKERMAN, M. Pathogenesis of ruminants pestivirus infections. **Veterinary Microbiology**, v.53, p.3-15, 1996.

EPIFANO O, DEAN J. Biology and structure of the zona pellucida: a target for immunocontraception. **Reproduction Fertility and Development**, v.6, p.319-330, 1994.

FARIN, C.E.; RODRIGUEZ, K.F.; ALEXANDER, J.E.; HOCKNEY, J.E.; HERRICK, J.R.; KENNEDY-STOSKOPF, S. The role of transcription in EGF- and FSH-mediated oocyte maturation in vitro. **Animal Reproduction Science**, v.98, p.97-112, 2007.

FAVA, C.D.; STEFANO, E.; PITUCO, E.M.; BILYNSKYJ, M.C.V.; OKUDA, L.H.; POZZI, C.R.; VERÍSSIMO, C.J.; DEMARCHI, J.J.A.A. Erradicação do herpesvírus bovino - 1 (BHV-1) de um rebanho bovino leiteiro em manejo semi-intensivo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.18, n.2, 1998.

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

FERREIRA, C.Y.M.R.; PIATTI, R.M.; MIYASHIRO, S.; GALUPPO, A.G.; ZERIO, N.M.C.; SÂMARA, S.I.; D'ANGELO, M.. Ocorrência do herpesvirus bovino 1 (BoHV-1) no líquido folicular e células epiteliais de oviduto bovino. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.3, p.309-311, 2005.

FLORES, E.F. **Virologia Veterinária**. 1Ed. São Paulo:ufsn, 888p., 2005.

GALLI, C.; CROTTI, G.; NOTARI, C.; TURINI, P.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. Embryo production by ovum pick up from live donors. **Theriogenology**, v.55, p.1341-57, 2001.

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

GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. **Theriogenology**, v.67, p.6-15, 2007.

GIVENS, M.D.; RIDDELLA, K.P.; GALIKA, P.K.; STRINGFELLOWA, D.A.; BROCKA, 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, 2006.

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

GONÇALVES, P.B.D.; BARRETA, M.H.; SANDRI, L.R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A.Q. Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.212-217, 2007.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas a Reprodução Animal**. 2ed., São Paulo: Roca, 408p., 2008.

GOTTARDI, F.P.; MINGOTI, G.Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.2, p.82-94, 2009.

GORDON, I. Oocyte recovery and maturation. In: Gordon I. Laboratory production of cattle embryos. Wallingford, UK: CAB International, p.30-65, 1994.

GUERIN, B. ; GUIENNE, B.L. ; CHAFFAUX, ST. ; HARLEY, T. ; ALLIETTA, M. ; THIBIER, M. Contamination des ovocytes et des embryons fécondes in vitro après infection expérimentale de vaches donneuses par le virus herpes bovin de type 1 (BHV-1). **Recueil de Medecine Veterinaire**, v.165, p.827-833, 1989.

GUERIN, B. ; LE GUIENNE, B. ; ALLIETTA, M. ; HARLAY, T. ; THIBIER, M. Effets de la contamination par le BHV-1 sur la maturation et fécondation in vitro

des ovocytes des bovines. **Recueil de Medecine Veterinaire**, v.66, p.911-917, 1990.

GUERIN, B.; NIBART, M.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P. Sanitary risks related to embryo transfer in domestic species. **Theriogenology**, v.47, p.33-42, 1997.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 6ed. São Paulo: Manole, 513 p., 2004.

HARE, W.C.D. Design and analysis of research on infectious diseases transmission by embryos. **Theriogenology**, v.33, p.51-57, 1990.

HASLER, J.F. In vitro production of cattle embryos: problems with pregnancies and parturition. **Human Reproduction**, v.15, p.47-58, 2000.

HENDRIKSEN, P.J.M.; VOS, P.L.A.M.; STEENWEG, W.N.M.; BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. **Theriogenology**, v.53, p.11-20, 2000.

HENDRIKSEN, P.J.M.; STEENWEGA, W.N.M.; HARKEMAA, J.C.; MERTONB, J.S.; BEVERSA, M.M.; VOSA, P.L.A.M.; DIELEMAN, S.J. Effect of different stages of the follicular wave on in vitro developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.61, p.909-902, 2004.

HOLZ, C.L.; CIBULSKI, S.P.; TEIXEIRA, T.F.; BATISTA, H.B.C.R.; CAMPOS, F.S.; SILVA, J.R.; VARELA, A.P.M.; CENCI, A.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. Soroprevalência de herpesvírus bovinos tipos 1 e/ou 5 no Estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.9, p.767-773, 2009.

HYTTEL, P. Bovine cumulus-oocyte disconnection in vitro. **Anatomy and Embryology**, v.176, p.41-44, 1987.

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, 1998,2009.

JOOSTE, F. The association between Foot-and-Mouth disease virus and bovine oocytes and embryos during in vitro embryo production. 2005. 111f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade de Pretoria, África do Sul, 2005.

JOSEFSBERG, L.B.; GALIANI, D.; LAZAR, S.; KAUFAMAN, O.; SEGER, R.; DEKEL, N. MPF governs MAPK activation and interphase suppression during meiosis of rat oocytes. **Biology of Reproduction**, v.68, p.1282-90, 2003.

JUNQUEIRA, J.R.C. ; FREITAS, J.C. ; ALFIERI, A.F. ; ALFIERI, A.A. 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.

KIDDER, G.M.; MHAWI, A.A. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. **Reproduction**, v.123, p.613-620, 2002.

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

KRAMPS, J.A.; MAGDALENA, J.; QUAK, J.; WEERDMEESTER, K.; KAASHOEK, M.J.; MARIS-VELDHUIS, M.A.; RIJSEWIJK, F.A.M.; KEIL, G.; VAN OIRSCHOT, J.T. A simple, specific, and highly sensitive blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine herpesvirus 1. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.9, p.2175-81, 1994.

KRUIP, T.A.M.; BONI, R.; WURTH, Y.A.; ROELOFSEN, M.W.M.; PIETERSE, M.C. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. **Theriogenology**, v.42, p.675-684, 1994.

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

LONERGAN, P. **Studies on the in vitro maturation, fertilization and culture of bovine follicular oocyte**. Ph.D. Thesis, National University of Ireland, Dublin. 1992.

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D.; BOLAND, M.P.; GORDON, I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v.37, p.48-53, 1994.

LOPES, C.E.R. Frequência de anticorpos contra o vírus da rinotraqueite infecciosa bovina (BoHV-1) em rebanhos de corte não vacinados no município Imperatriz-MA. In: IX Congresso Brasileiro Buiatria, 2011, Goiânia - Goiás, Anais...Veterinária e Zootecnia, Suplemento 3, 2011.

LOPEZ RUIZ, L. ALVAREZ, N.; NUÑES, I.; MONTES, I.; SOLANO, R.; FUENTES, D.; PEDROSO, R.; PALMA, G. A.; BREM, G. Effect of body condition on the developmental competence of IVM/IVF bovine oocytes. **Theriogenology**, v.45, p.292, 1996.

DE LOOS, F.A.M.; BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J.; KRUIP, T.A. Morphology of preovulatory bovine follicles as related to oocyte maturation. **Theriogenology**, v.35, p.527-535, 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**, v. 25, n. 3, p. 425-430, 1995.

MACDIARMID, S.C.; PHARO, H.J. Risk analysis: assessment, management and Communication. **Rev Sci Tech Off Int Epiz**, v.22, p.397-408, 2003.

MANIK, R.S., SINGLA, S.K., PALTA, P. Collection of oocytes through transvaginal ultrasound-guided aspiration of follicles in an Indian breed of cattle. **Animal Reproduction Science**, v.76, p.155-161, 2003.

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.

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, 2008.

MASRI, S.A.; OLSON, W.; NGUYEN, P.T.; PRINS, S.; DEREGT, D. 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.F.; ALFIERI, A.A. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1, decorrente de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. **Ciência Rural**, v.30, n.2, p.347-350, 2000.

MERTON, J.S.; DE ROOS, A.P.; MULLAART, E.; DE RUIGH, L.; KAAL, L.; VOS, P.L.; DIELEMAN, S.J. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, v.59, p.651-74, 2003.

MILLER, J.M.; VAN DER MAATEN, M.J. Experimentally induced infectious bovine rhinotracheitis virus infection during early pregnancy: effect on the bovine corpus luteum and conceptus. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, p.223-8, 1986.

MILLER, J.M.; VAN DER MAATEN, M.J.; WHETSTONE, C.A. Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA. **American Journal of Veterinary Research**, v.52, p.458-461, 1991.

NOWSHARI, M.A.; BREM, G. The protective action of polyvinil alcohol during rapid freezing of mouse embryos. **Theriogenology**, v.53, n.5, p.1157-66, 2000.

O'DOHERTY, E.M.; WADE, M.G.; HILL, J.L.; BOLAND, M.P. Effects of culturing bovine oocytes either singly or in groups on development to blastocysts. **Theriogenology**, v.48, p.161-169, 1997.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). Terrestrial Animal Health Code. World Organization for Animal Health. 2008. Disponível em: <<http://www.oie.int>>. Acesso em: 25/01/2012.

OHNO, S. e SMITH, J. B. Role fetal follicular cells in meiosis of mammalian oocytes. **Cytogenetics**, v.3, p.324-333, 1964.

OLIVEIRA, A.P. Pesquisa do vírus da rinotraquíte infecciosa dos bovinos em complexos cumulus-oócito e líquido folicular. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte ,2007.

PASTORET, P.P.; THIRY, E.; BROCHIER, B.; DERBOVEN, G. Bovine Herpesvirus 1 infection of cattle pathogenesis, latency, consequences of latency. **Annual Record Veterinary**, v.13, p.221-235, 1982.

PERRY GH. Risk assessment of transmission of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in abattoir-derived in vitro produced embryos. **Theriogenology**, v.68, p.38-55, 2007.

PHILPOT, M. The dangers of disease transmission by artificial insemination by embryo transfer. **British veterinary journal**, v.149, p.339-69, 1993.

PIETERSE, M.C.; KAPPEN, K.A.; KRUIP, T.A.M.; TAVERNE, M.A.M. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. **Theriogenology**, v.30, n.4, p.751-762, 1988.

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**, v.35, p.19-24, 1991.

PITUCO, E.M.; CARNEIRO, B.; MENZ, I.; STEFANO, E.; OKUDA, L.H. Detecção de anticorpos contra o Herpesvírus Bovino tipo 1 (HVB-1) em rebanhos de corte e leite com problemas reprodutivos no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 3., 1999, São Paulo. Resumos. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.66, supl., p.126, 1999.

PONTES, J.H.F.; MELO STERZAB, F.A.; BASSO, A.C.; FERREIRA, C.R.; SANCHES, B.V.; RUBIN, K.C.P.; SENEDA, M.M. Ovum pick up, in vitro embryo

production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v.75, p.1640-46, 2011.

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.**, v.17, p.89-95, 1989.

RIZOS, D.; BURKE, L.; DUFFY, P.; WADE, M.; MEE, J.F.; O'FARRELL, K.J.; MACSIURTAİN, M.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Comparisons between nulliparous heifers and cows as oocyte donors for embryo production in vitro. **Theriogenology**, v.63, p.939-949, 2005.

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. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53 n.6, 2001.

ROCK, D., LOKENSGARD, J.; LEWIS, T.; KUTISH, G. Characterization of dexamethasone-induced reactivation of latent bovine herpesvirus 1. **Journal of Virology**, v.66, p.2484-90, 1992.

DE ROOVER, R.; FEUGANG, J.M.N.; BOLS, P.E.J.; GENICOT, G.; HANZEN, CH. Effects of Ovum Pick-up Frequency and FSH Stimulation: A retrospective study on seven years of beef cattle in vitro embryo production. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p.239-245, 2008.

RUBIN, K.C.P.; PONTES, J.H.F.; NONATO, J.R.; ERENO, J.C.; PANSARD, H.; SENEDA, M.M. Influência de grau de sangue Nelore na produção in vivo de oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p.183, 2005 (Abstract).

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.

SATO, E.; MATSUO, M.; MIYAMOTO, H. Meiotic maturation of bovine oocytes in vitro: Improvement of meiotic competence by dibutyl cyclic adenosine 3,5'-monophosphate'. **Journal Animal Science**, v.68, p.1182-1187, 1990.

SCHULTZ RD, KAPROTH M, BEAN B. Immunoextension: a method to eliminate viral activity in contaminated semen. In: Proceedings of the 11th International Congress on Animal Reproduction and AI, p. 522, 1988.

SEIDEL, G.E. Jr. Recombinant bovine trypsin made in maize inactivates bovine herpesvirus-1 adsorbed to the bovine zona pellucida. **Reproduction Fertility and Development**, v.19, p.236 (abstract), 2007.

SENEDA, M.M.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; OLIVEIRA, J.A.; VANTINI, R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, v.67, p.37-43, 2001.

SENEDA, M. M.; ESPER, C. R.; ANDRADE, E. R.; BINELLI, M.; OLIVEIRA, J. A.; MAX, M. C.; GARCIA, J. M. Relationship between follicle size after FSH treatment and efficiency of oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, v.2, n.3, p. 178-182, 2005.

SILVA, N.; SOLANA, A.; CASTRO, J.M. Evaluation of the effects of different trypsin treatments on semen quality after BHV-1 inactivation, and a comparison of the results before and after freezing, assessed by a computer image analyser. **Animal Reproduction Science**, v.54, p.227-35, 1999.

SILVA, C.; CALEGARI, R.S.; MARTINS JÚNIOR, A. Desenvolvimento de embriões bovinos após maturação in vitro de oócitos em meio de cultivo suplementado com taurina ou glicina. **Veterinária e Zootecnia**, v.16, n.1, p.89-100, 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, 2010.

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

SIRARD, M.A.; BLONDIN, P. Oocyte maturation and IVF in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.417-26, 1996.

SIRARD, M.A.; PICARD, L.; DERY, M.; COENEN, K.; BLONDIN, P. The time between FSH administration and ovarian aspiration influences the development of cattle oocytes. **Theriogenology**, v.51, p.699-708, 1999.

SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v.65, p.126-36, 2006.

SOUSA, V.E.; CHAVES, N.P.; BEZERRA, D.C.; SANTOS, H.P.; PEREIRA, H.M. Frequência de anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1 (bvh-1) em bovinos leiteiros não vacinados na bacia leiteira da Ilha de São Luís-Ma. **Ciência Animal Brasileira**, Suplemento 1, p.491-5, 2009.

SPEAR, P.G. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. **Cellular Microbiology**, v.6, p.401-410, 2004.

STRAUB, O.C. Infectious bovine rhinotracheitis virus. In: DINTER, Z. e MORUN, B. **Virus Infectious of Ruminants**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p.71-108, 1990.

STRINGFELLOW, D.A.; LAUERMAN, L.H.; NASTI1, 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.; WRATHALL, A.E. Epidemiological implications of the production and transfer of IVF embryos. **Theriogenology**, v.43, p.89-96, 1995.

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

SU, Y.Q.; DENEGRÉ, J.M.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, F.L.; O'BRIEN, M.J.; EPPIG, J.J. Oocytedependent activation of mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) in cumulus cells is required for the maturation of the mouse oocyte-cumulus cell complex. **Developmental Biology**, v.263, p.126-38, 2003.

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.

TANGHE, S.; VANROOSE, G.; VAN SOOM, A.; DUCHATEAU, L.; YSEBAERT, M.T.; KERKHOF, P.; THIRY, E.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; VAN OOSTVELDT, P.; NAUWYNCK, H. Inhibition of bovine sperm-zona binding by bovine herpesvirus-1. **Reproduction**, v.130, p.251-9, 2005.

THIBIER, M. Stabilization of numbers of in vivo collected embryos in cattle but significant increases of in vitro bovine produced embryos in some parts of the world. **IETS Embryo Transfer Newsletter**, v.22, p.12-9, 2004.

TOMICH, R.G.P.; SERRA, C.V.; BOMFIM, M.R.Q.; CAMPOS, F.S.; LOBATO, Z.I.P.; PELLEGRINI, A.O.; PELLEGRINI, L.A.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F. Reproductive diseases serosurvey in dairy cattle from rural settlements of Corumbá city, Mato Grosso do Sul state, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.4, 2009.

TOSTI, E. Calcium ion currents mediating oocyte maturation events. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.4, p.26, 2006.

TSAFRIRI, A.; CHUN, SANG-YOUNG; ZHANG, R.; HSUEH, A.J.W.; CONTI, M. Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of camp levels in follicular somatic and germ cells: studies using selective phosphodiesterase inhibitors. **Developmental Biology**, v.178, p.393-402, 1996.

VAN DER ENGELENBURG, F.A.C.; MAES, R.K.; VAN OIRSCHOT, J.T.; RIJSEWIJK, F.A. Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.12, p.3129-35, 1993.

VAN OIRSCHOT, J.T. Bovine herpesvirus 1 in semen of bulls and the risk of transmission: a brief review. **Veterinary Quarterly**, v.17, p.29-33, 1995.

VANROOSE, G.; NAUWYNCK, H.; VAN SOOM, A.; VANOPDENBOSCH, E.; DE KRUIF, A. Replication of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhea virus in zona-free and zona-intact in vitro-produced bovine embryos and the effect on embryo quality. **Biology of Reproduction**, v.58, p.857-866, 1998.

VANROOSE, G.; NAUWYNCK, H.; VAN SOOM, A.; VANOPDENBOSCH, E.; DE KRUIF, A. Effect of bovine herpesvirus-1 or bovine viral diarrhea virus on development of in vitro-produced bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.54, 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. **Theriogenology**, v.53, p.322, 2000.

VARAGO, F.C.; MENDONÇA, L.F.; LAGARES, M.A. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.2, p.100-109, 2008.

VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A.; FERREIRA, A.M; SÁ, W.F; MARQUES JUNIOR, A. P. Nascimento de bezerra gerada com auxílio das técnicas de punção folicular e fertilização in vitro no Estado de Minas Gerais. **Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Leite**. Publicado em 09 de março de 2001.

VIANA, J.H.M; FERREIRA, A.M.; CAMARGO, L.S.A.; SÁ, W.F.; FERNANDES, C.A.C.; MARQUES JÚNIOR, A.P. Efeito da pré-estimulação ovariana sobre características de oócitos após punção folicular em bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.1, 2003.

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

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.

XU, K.P.; BRACKET, B.G. A detailed analysis of early events during in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.82, p.127-134, 1988.

WAGTENDONK-de LEEUW van A.M. Ovum Pick Up and In Vitro Production in the bovine after use in several generations: A 2005 status. **Theriogenology**, v.65, p.914-925, 2006.

WARD, F. A.; LONERGAN, P.; ENRIGHT, B.P.; BOLAND, M.P. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology. **Theriogenology**, v.54, p.433-446, 2000.

WIT, A.A.C.; WURTH, Y.A.; KRUIP, A.M. Effect of ovarian and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. **Journal of Animal Science**, v.78, p.1277-83, 2000.

WRATHALL, A.E.; SIMMONS, H.A.; VAN SOOM, A. Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilization with virusinfected semen. **Theriogenology**, v.65, p.247-274, 2006.

WYLER, R.; ENGELS, M.; SCHWYZR, M. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV-1). In: WITTMANN, G. Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs. Boston: Kluwer Academic Publishers, p.1-72, 1989.

3. CAPÍTULO 1

PRESENÇA DO DNA VIRAL EM COMPLEXOS *CUMULUS OÓFORUS* DE VACAS NATURALMENTE INFECTADAS PELO HERPESVIRUS BOVINO 1 (BoHV1)¹

¹ Apoio financeiro da FAPEMIG

RESUMO: O objetivo deste estudo foi verificar a presença do DNA do herpesvirus bovino 1 (BoHV1) em Complexos *Cumulus* Oóforus (COCs) de vacas naturalmente infectadas. Os COCs foram obtidos de 15 doadoras por meio de aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU). A extração do DNA foi realizada em um *pool* de COCs de todas as aspirações de uma mesma doadora e no sangue total. Após este procedimento, seguiu-se a realização das reações de *Nested-PCR*. O DNA do BoHV1 foi identificado no *pool* de COCs de três doadoras soropositivas, não sendo detectado em nenhuma das amostras soronegativas. Entretanto, não foi encontrado DNA viral em amostras sanguíneas, mesmo nas oriundas de animais soropositivos. Todas as amostras de sangue e COCs foram submetidas à *Nested-PCR* para a detecção do BoHV5, não sendo encontrado nenhum resultado positivo. Os resultados obtidos permitem concluir que o DNA viral pode estar presente em estruturas ovarianas de vacas infectadas naturalmente pelo BoHV1.

ABSTRACT: This study was carried out to verify the presence of DNA of the bovine herpesvirus 1 (BoHV1) in *Cumulus Oophorus Complexes* (COCs) and blood from the cows naturally infected by BoHV1. COCs were obtained from 15 donors during 22 sessions of Follicular Aspiration Guided by Ultrassom (OPU). The DNA extraction was accomplished in a *pool* of COCs of all aspirations from the same donor and in the total blood. After this procedure, the *Nested-PCR* reactions were accomplished. The DNA of BoHV1 was identified in the *pool* of COCs from three serum-positive donors, but it was not detected in none of the serum-negative samples. However, no viral DNA was found in sanguine samples, even in those from the serum-positive animals. All blood samples and COCs were subjected to *Nested-PCR* for detection of BoHV5, but no positive result were found. The obtained results allow to conclude the viral DNA viral could be present in ovarian structures of the cows naturally infected by BoHV1.

INTRODUÇÃO

A interação entre gametas e embriões com patógenos tem sido amplamente estudada, estando geralmente relacionada a agentes virais que provocam problemas reprodutivos. Neste contexto, destaca-se o BoHV1, causador da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) (GUERIN, 1990 ; BIELANSKI, A.; DUBUC, 1994 ; VANROOSE et al., 1999; FLORES et al., 2005 ; MAKAREVICH et al., 2007 ; PAVÃO, 2009).

O BoHV1 é um vírus de ocorrência cosmopolita, associado à perdas significativas na produtividade das pecuárias de corte e leite, gerando um prejuízo econômico considerável devido aos problemas respiratórios e reprodutivos (KIRKBRIDE, 1985; WRATHALL et al., 2006; MARLEY et al., 2008). A doença geralmente é subclínica, caracterizada pela latência viral, momento pelo qual não há expressão de antígenos virais, além de ocorrer interrupção da replicação (WRATHALL et al., 2006). Entretanto, é frequente a ocorrência de abortamentos do quarto ao oitavo mês de gestação (GIVENS e MARLEY, 2008), repetição de estros em intervalos regulares ou irregulares, natimortalidade, mortalidade perinatal, redução na fertilidade e infertilidade temporária devido à infecção uterina (RUFINO et al., 2006).

Um aspecto a ser considerado quanto à contaminação do ovócito é a presença de prolongamentos citoplasmáticos das células da *corona radiata*, os quais atravessam a zona pelúcida (ZP), chegando até o espaço perivitelino (HYTTEL et al., 1986; Costa, 2004). Estas projeções formam comunicações com a membrana citoplasmática do ovócito, estabelecendo um elo importante na passagem de componentes químicos reguladores da maturação ovocitária

(HYTTEL, 1987; GONÇALVES et al., 2002). Estas condições sugerem que o BoHV1 possa utilizar tais filamentos para facilitar seu trajeto pela ZP (FERREIRA, 2005).

O presente trabalho teve como objetivo identificar a presença do DNA do BoHV1 em COCs obtidos por meio da aspiração folicular em vacas naturalmente infectadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas 15 fêmeas bovinas adultas (mestiças Holandês x Gir), não vacinadas contra o BoHV1. Amostras de sangue foram coletadas em tubos sem anticoagulante, transportadas à temperatura ambiente e centrifugadas por cinco minutos a 1.500G para a separação do soro sanguíneo e realização da soroneutralização para BoHV1 em microplacas, de acordo com a metodologia proposta pelo "Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines" (OIE, 2008). Uma segunda amostra sanguínea foi coletada de cada animal, em tubos contendo anticoagulante, a fim de realizar a detecção molecular do DNA viral pela técnica de *Nested-PCR*.

As aspirações foliculares foram realizadas após a devida contenção dos animais e anestesia peridural intercoccígea com dois a quatro mL de Cloridrato de Lidocaína a 2%. Para este procedimento, foi utilizado aparelho de ultrassom (DPS Mindray DP-2200VET), equipado com transdutor microconvexo ajustado para oito MHz de frequência e acoplado a uma guia intravaginal. Foram utilizadas agulhas 40x10 (19 G) e bomba de vácuo com pressão de vácuo de 80mmHg, correspondente a um fluxo de 14 mL de água/min. Foram puncionados os folículos maiores que dois milímetros sendo o material

coletado transportado em tubos plásticos de 50 mL (Falcon), contendo cinco mL de solução salina tamponada (PBS), acrescida de 1000 UI de heparina à 37°C. O conteúdo aspirado foi lavado com PBS em filtro de coleta de embriões com malha de 80µ (Millipore). Os COCs foram rasteados em microscópio estereoscópico e transferidos para outra placa contendo meio Talp-hepes para sua manutenção. Os COCs foram rasteados em microscópio estereoscópico, acondicionados em tubos de polipropileno e congelados a -20 °C.

A detecção do DNA viral nos COCs foi realizada por meio da *Nested-PCR* a fim avaliar a presença do BoHV1. Neste contexto, foi também realizada a *Nested-PCR* para o BoHV5, tendo em vista que pode ocorrer reação cruzada pela soroneutralização (SILVA-FRADE et al., 2010).

A extração do DNA total foi realizada nos COCs, como indicado pelo fabricante do Kit de extração SV Wizard Genomic (Promega®), para serem utilizados no ensaio molecular. Os oligonucleotídeos utilizados e protocolo de execução das reações de *Nested-PCR* foram padronizados a partir da descrição de CAMPOS et al. (2009).

Cada reação foi constituída de um volume final de 25µL, contendo 1µL de DNA total de cada amostra, 2µL de cada um dos oligonucleotídeos (20 pMol) EF e ER (Tabela 1), 2,5µL de DMSO, 12,5µL de Go Taq® Green Master Mix 2x (Promega®) e água ultra-pura (Millipore®), amplificando um fragmento de DNA de 162 pares de base.

Alíquotas de aproximadamente 5µL das reações foram submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1%, diluído em tampão borato TBE 0,5X (TRIS 1M pH8,3 50mM, Ácido bórico 45mM, EDTA 0,5M pH8,0 0,5mM) sob uma voltagem constante de 90V, por 40 minutos. Foram utilizados

marcadores padrões de 100 pares de base (Marcador DNA Leader) para comparação dos fragmentos amplificados, visualizados sob luz Ultravioleta (UV).

RESULTADOS

Os animais soronegativos não apresentaram o DNA do BoHV1 nas amostras avaliadas, tanto no sangue quanto no *pool* de COCs. Entretanto, reação positiva pela *Nested-PCR* (Figura 1) foi observada no *pool* de COCs de três animais soropositivos (3/12). Quanto ao BoHV5, não foi detectado o DNA viral em nenhuma amostra avaliada.

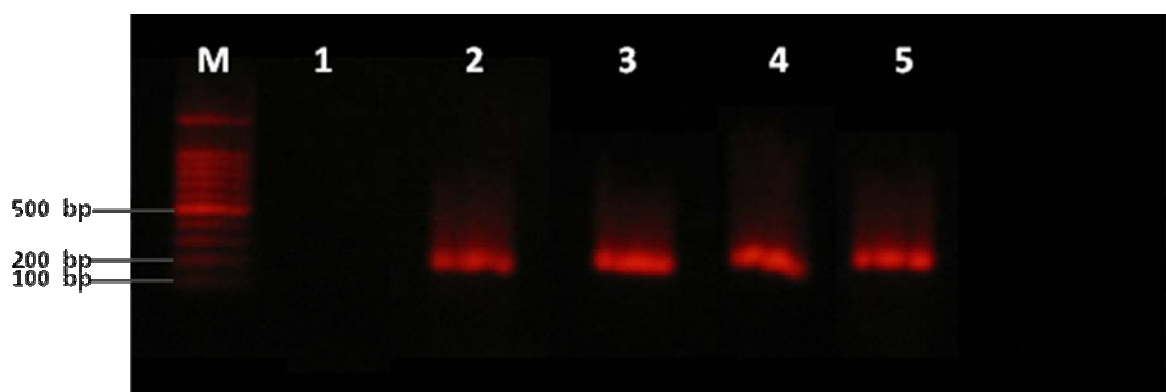


Figura 1. Produto da *Nested-PCR* em gel de agarose a 1%, de COCs de vacas soropositivas para o BoHV1 (M: marcador; 1: controle negativo; 2: controle positivo; 3, 4 e 5: Amostras de COCs positivas).

DISCUSSÃO

A técnica *Nested-PCR* foi adotada no presente experimento para a detecção do DNA viral, devido ao fato de que é mais sensível quando

comparada a outras técnicas de detecção do BoHV1, como o isolamento viral, fluorescência e sorologia (TAKIUCHI et al., 2005).

Conforme o esperado, os animais soronegativos, não apresentaram o DNA do BoHV1 nas amostras avaliadas, tanto no sangue quanto no *pool* de ovócitos. Entretanto, reação positiva pelo *Nested-PCR* foi observada no *pool* de COCs de três animais soropositivos (3/12).

Os animais soropositivos que revelaram o DNA viral não apresentavam sintomatologia clínica da doença. Esta condição anula a hipótese de OLIVEIRA (2007) em que, animais sorologicamente positivos e que não apresentam sintomatologia clínica são improváveis transmissores do BoHV1 por meio dos COCs e líquido folicular.

Assim, como na presente pesquisa, OLIVEIRA (2007) encontrou COCs negativos em animais infectados naturalmente, sob baixas condições de estresse. Entretanto, este pesquisador não encontrou o DNA viral em nenhum animal soropositivo, fato este não observado no presente trabalho. Isto pode ter ocorrido porque a *nested-PCR*, utilizada no presente experimento, é um método mais sensível em relação ao PCR convencional utilizado por OLIVEIRA (2007). Destarte, a *nested-PCR* é a técnica mais adequada para pesquisa molecular em estruturas com baixa carga viral (TAKIUCHI et al., 2005). Outro aspecto a ser considerado é que a infecção dos órgãos genitais e a excreção viral estão associadas à fase aguda da doença, a qual é extremamente curta em animais infectados sob condições naturais (GUERIN et al., 1997).

Segundo SINGH et al. (1986) o grau de infectividade observado em animais contaminados artificialmente é muito mais elevado do que em animais naturalmente infectados. Em estudos onde o vírus foi adicionado em condições

de cultivo, foi detectado o DNA viral em amostras de COCs, líquido folicular, espermatozóides e embriões (BIELANSKI e DUBUC, 1993 e 1995; BIELANSKI et al., 1993; VANROOSE et al., 1999; STRINGFELLOW e GIVENS, 2000).

Para uso em sistema de PIV, os ovócitos devem possuir a ZP intacta, o citoplasma homogêneo e ainda ser circundado por uma multi-camada compacta de células do *cumulus* (BOLS et al., 2005). Apesar da ZP ter a função de proteger os ovócitos e embriões contra a infecção viral (VANROOSE et al. 2000; MAKAREVICH et al., 2007), esta proteção não é muito eficaz.

A ZP dos ovócitos imaturos e embriões é muito irregular, com presença de diversos poros, fendas e projeções (VANROOSE et al., 2000). Neste contexto, VANROOSE et al. (2000) afirmaram que partículas com tamanho aproximado de 180–200 nm (tamanho aproximado das partículas virais do BoHV-1) podem atravessar parte da ZP, chegando à camadas mais internas.

Os vírus também podem estar aderidos na ZP e nas células do cumulus (VANROOSE et al., 1999; 2000). O fato de ter sido encontrado DNA viral em COCs de animais naturalmente contaminados do presente experimento indicam que o vírus poderia estar nas células do *cumulus*, ter penetrado e se localizado na ZP ou estar no interior do ovócito.

A ausência de DNA viral no sangue também está associada ao curto período de manifestação aguda da doença em animais naturalmente infectados. Em períodos de reinfecção, o vírus pode ser encontrado no sangue ou dentro dos leucócitos. Assim, a reativação do vírus, a qual ocorre em momentos de estresse ou imunossupressão, pode levar à sua propagação via corrente sanguínea (SPEAR, 2004). Portanto, o mecanismo de latência, característico da subfamília *Alphaherpesvirinae*, principalmente nos gânglios

trigêmio e sacral (PASTORET et al., 1982), explica os resultados nas amostras sanguíneas.

Além do BoHV1, há também uma preocupação com a possível transmissão do BoHV-5, devido a sua grande similaridade genômica com o BoHV1, observada por ABDELMAGID et al. (1995). Segundo CHOWDHURY (1995), o BoHV5 e o BoHV1 apresentam 85% de similaridade genômica. Dessa forma, é possível que o BoHV5, após a reativação viral, tenha tropismo pelos órgãos genitais, levando a comprometimentos na esfera reprodutiva, assim como observado para o BoHV1. Diante disto, foram realizadas análises de todas as amostras pela Nested-PCR para o BoHV5, a fim de verificar se existiam amostras contaminadas por este tipo de vírus. Entretanto, não foi encontrada nenhuma amostra contaminada.

Nossos resultados contrastam com os observados por SILVA-FRADE et al. (2010), os quais encontraram o DNA do BoHV5 pela técnica de PCR em ovócitos. Entretanto, estes autores infectaram experimentalmente os ovócitos, fato este não realizado no presente experimento.

CONCLUSÕES

Os resultados encontrados permitem concluir que o DNA viral pode estar presente em estruturas ovarianas de vacas infectadas naturalmente pelo BoHV1. Diante disto, animais sorologicamente positivos e sem sintomatologia clínica, podem ser potencialmente transmissores do BoHV1 através de COCs.

REFERÊNCIAS

- ABDELMAGID, O.Y.; MINOCHA, H.C.; COLLINS, J.K.; CHOWDHURY, S.I. Fine mapping of bovine herpesvirus-1 (BoHV-1) glycoprotein D (gD) neutralizing epitopes by type-specific monoclonal antibodies and sequence comparison with BoHV-5 gD. **Virology**, v.206, p.242-253, 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.
- CAMPOS, F.S.; FRANCO, A.C.; HÜBNER, S.O.; OLIVEIRA, M.T.; SILVA, A.D.; ESTEVES, P.A.; ROEHE, P.M.; RIJSEWIJK, F.A.M. High prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.139, p.67-73, 2009.
- CHOWDHURY, S.I. Molecular basis of antigenic variation between the glycoprotein C of respiratory bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurovirulent BHV-5. **Virology**, v.213, p.558-568, 1995.
- COSTA, E. P. **Aspectos morfológicos (citológicos e ultraestrututais) e desenvolvimento de ovócitos de bovinos “in vitro”**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1994. 155f. Tese (Doutorado em Ciência Animal, área Reprodução Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, 1994.
- FERREIRA, C.Y.M.R.; PIATTI, R.M.; MIYASHIRO, S.; GALUPPO, A.G.; ZERIO, N.M.C.; SÂMARA, S.I.; D'ANGELO, M. Ocorrência do herpesvirus bovino 1 (BoHV-1) no líquido folicular e células epiteliais de oviduto bovino. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.3, p.309-311, 2005.
- GIVENS, M.D.; MARLEY, M.S.D. Pathogens that cause infertility of bulls or transmission via semen. **Theriogenology**, v.70 p.504-507, 2008.
- GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas a Reprodução Animal**. 2ed., São Paulo: Roca, 408p., 2008.
- GUERIN, B.; LE GUIENNE, B.; ALLIETTA, M.; HARLAY, T.; THIBIER, M. Effets de la contamination par le BHV-1 sur la maturation et fécondation in vitro des ovocytes des bovines. **Recueil de Medecine Veterinaire**, v.66, p.911-917, 1990.

GUERIN, B.; NIBART, M.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P. Sanitary risks related to embryo transfer in domestic species. **Theriogenology**, v.47, p.33-42, 1997.

HYTTEL, P.; XU, K.P.; SMITH, S. ; GREVE, T. Ultrastructural of in vitro oocyte maturation in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.78, n.2, p.615-25, 1986.

HYTTEL, P. Bovine cumulus-oocyte disconnection in vitro. **Anatomy and Embryology**, v.176, p.41-44, 1987.

KIRKBRIDE, C.A. Manangin and outbreak of liverstock abortion 2: diagnosis and control of bovine abortion. **Veterinary Medicine**, v.80, n.5, p.70-79, 1985.

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.

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, 2008.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). Terrestrial Animal Health Code. World Organization for Animal Health. 2008. Disponível em: <<http://www.oie.int>>. Acesso em: 25/01/2012.

OLIVEIRA, A.P. Pesquisa do vírus da rinotraquite infecciosa dos bovinos em complexos cumulus-oócito e líquido folicular. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

PASTORET, P.P.; THIRY, E.; BROCHIER, B.; DERBOVEN, G. Bovine Herpesvirus 1 infection of cattle pathogenesis, latency, consequences of latency. **Annual Record Veterinary**, v.13, p.221-235, 1982.

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.

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, p.324-331, 2010.

SINGH, E.L.; HARE, W.C.D.; THOMAS, F.C.; BIELANSKI, A. Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. Non-transmission

of infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis virus following trypsin treatment of exposed embryos. **Theriogenology**, v.20, p.169-76, 1983.

SPEAR, P.G. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. **Cellular Microbiology**, v.6, p.401-410, 2004.

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

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.

VANROOSE, G.; NAUWYNCK, H.; VAN SOOM, A.; VANOPDENBOSCH, E.; DE KRUIF, A. Effect of bovine herpesvirus-1 or bovine viral diarrhea virus on development of in vitro-produced bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.54, 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. **Theriogenology**, v.53, p.322, 2000.

WRATHALL, A.E.; SIMMONS, H.A.; VAN SOOM, A. Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilization with virus infected semen. **Theriogenology**, v.65, p.247-274, 2006.

4. CAPÍTULO 2

CAPACIDADE DE MATURAÇÃO NUCLEAR EM OVÓCITOS ORIUNDOS DE VACAS NATURALMENTE INFECTADAS PELO HERPESVIRUS BOVINO 1 (BOHV1)¹

¹ Apoio financeiro da FAPEMIG

RESUMO: Objetivou-se no presente experimento avaliar a capacidade de desenvolvimento de ovócitos oriundos de vacas infectadas naturalmente pelo BoHV1. A taxa de maturação nuclear foi avaliada em vacas soronegativas e soropositivas contra o BoHV1. Os tratamentos foram definidos a partir do título de anticorpos detectados pela soroneutralização em microplacas, sendo estabelecidos quatro grupos: animais negativos (título menor do que 2); título baixo (2 a 8); título médio (16 a 32) e título alto (64 a 512). Os Complexos *Cumulus* Oóforus (COCs) foram obtidos de 15 doadoras por meio de aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU). Foram selecionados para o cultivo *in vitro* somente os COCs com camada compacta de células do *cumulus*, zona pelúcida íntegra e citoplasma homogêneo. Após 24 horas de cultivo, os ovócitos foram fixados e corados para avaliação da maturação nuclear. O estágio do ciclo celular meiótico foi avaliado, por meio de um microscópio óptico com aumento de 1000X em imersão. Foi considerado maduro o ovócito que atingiu o estágio de metáfase II. Não houve diferença ($P>0,05$) na taxa de maturação nuclear ovocitária do grupo controle negativo (76,7%) quando comparada com a observada em animais com baixa titulação de anticorpos contra o BoHV1 (62,2%). Entretanto, verificou-se menor taxa de maturação nuclear ($P<0,05$) em ovócitos oriundos de vacas com titulação média (48,4%) e

alta (50,9%), quando comparadas com o controle negativo. Diante dos resultados obtidos conclui-se que vacas infectadas naturalmente pelo vírus BoHV1 podem apresentar comprometimento na taxa de maturação nuclear.

ABSTRACT: This study was conducted to evaluate the development ability of oocytes from the cows naturally infected by BoHV1. The nucleus maturation rate was evaluated in either serum-positive and serum-negative cows against BoHV1. The treatments were defined from the titer of the antibodies detected by serum neutralization in microplates. Four groups were established: negative animals (titer lower than 2); low titer (2 to 8); medium titer (16 to 32) and high titer (64 to 512). Some Cumulus Oophorus Complex (COCs) were collected from 15 donors during 22 sessions of Follicular Aspiration Guided by Ultrasound (OPU). For the in vitro culture, only the COCs with compact layer of cells of the cumulus, an integral pellucida zone and homogeneous cytoplasm were selected. After 24 hours under culture, the oocytes were fixed and stained for evaluation of the nucleus maturation. The stadium of the meiotic cellular cycle stage was evaluated through an optical microscope with increase of 1000X in immersion. The oocyte reaching the stage of metaphase II was considered as mature. No differences ($P>0.05$) occurred in the oocyte nucleus maturation rate of the negative control (76.7%), when compared with the observed in animals with low titration of antibodies against BoHV1 (62.2%). However, lower nucleus maturation rate ($P <0.05$) was verified in oocytes from the cows with medium (48.4%) and high (50.9%) titration, when compared with the control group. According to the results, it is concluded the cows naturally infected by BoHV1 to present endangerment in the nucleus maturation rate.

INTRODUÇÃO

O herpesvirus bovino 1 (BoHV1) é um DNA vírus, pertencente a subfamília *Alphaherpesvirinae* (FENNER, 1987) e está relacionado à afecções respiratórias e reprodutivas (WRATHALL et al., 2006). A Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), a Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IPV) e a Balanopostite Pustular (IPB) são as manifestações clínicas mais comuns entre os animais infectados. Além disso, é frequente a ocorrência de abortamentos do quarto ao oitavo mês de gestação (GIVENS e MARLEY, 2008) e repetição de estros em intervalos regulares ou irregulares, natimortalidade, mortalidade perinatal, redução na fertilidade e infertilidade temporária, devido à infecção uterina (RUFINO et al., 2006).

Uma importante característica biológica deste vírus após uma infecção natural é o estabelecimento de latência, preferencialmente nos gânglios trigêmio e sacral (WRATHALL et al., 2006). Porém, a reativação da infecção, com liberação de partículas virais infectantes, pode ocorrer pela depressão no sistema imunológico como o estresse ou o tratamento com corticóides (ACKERMANN et al., 1982; STRAUB, 1990). Apesar de minimizar as manifestações clínicas da doença, as vacinas não impedem o mecanismo de latência e não eliminam o vírus já instalado. Destarte, é possível a reativação e eliminação do vírus por um animal infectado, mesmo depois de vacinado (LEMAIRE et al., 1994).

O vírus pode ser carregado pelo ovócito (GUERIN et al., 1990; BIELANSKI et al., 1993), líquido folicular (FERREIRA et al., 2005; MARLEY et al., 2008), células epiteliais da tuba uterina (FERREIRA et al., 2005), espermatozóides (VAN OIRSCHOT et al., 1995; TANGHE et al., 2005),

embrião (GUERIN et al., 1990; BIELANSKI e DUBUC, 1994; VANROOSE et al., 1999; MAKAREVICH, 2007), além dos meios utilizados no sistema de produção *in vitro* de embriões (PIV) (STRINGFELLOW e GIVENS, 2000).

A maturação *in vitro* de ovócitos é uma das etapas da PIV, que consiste em uma série de eventos que ocorrem no ovócito imaturo, para que o mesmo adquira a competência necessária para as etapas de fecundação e cultivo *in vitro* (GONÇALVES et al., 2008). A influência do BoHV1 na PIV de embriões bovinos é um tema recorrente de pesquisas em diversos países. A interação do vírus em gametas e embriões infectados naturalmente ou experimentalmente é prejudicial aos mesmos e gera falhas durante o processo, reduzindo os resultados obtidos em cultivo (GUERIN et al., 1990; BIELANSKI e DUBUC, 1994; VANROOSE et al., 1999). Entretanto, a literatura é escassa quanto à influência deste vírus na capacidade de maturação nuclear do ovócito.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a relação entre diferentes títulos sorológicos do BoHV1 e a capacidade de desenvolvimento (maturação nuclear) *in vitro* de ovócitos de bovinos naturalmente contaminados.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 15 fêmeas bovinas adultas, mestiças Holandês x Gir de diferentes graus de sangue, em diferentes estágios do ciclo estral. Estes animais foram provenientes de rebanhos não vacinados contra o BoHV1, a fim de evitar a interferência da vacinação nos resultados.

Para a seleção das vacas doadoras de ovócitos foram coletadas amostras de sangue em tubos sem anticoagulante, transportadas à temperatura ambiente e centrifugadas por cinco minutos à 1.500G para separação do soro

sanguíneo. Posteriormente, foi realizada a soroneutralização em microplacas de acordo com a metodologia proposta pelo "Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines" (OIE, 2008). Os animais foram então divididos em quatro grupos de acordo com o título de anticorpos: cinco animais com título baixo (2 a 8); quatro com título médio (16 a 32) e três com título alto (64 a 512). Foram utilizados três animais soronegativos como controle (título menor do que 2).

As aspirações foliculares foram realizadas após a devida contenção dos animais e anestesia peridural intercoccígea com dois a quatro mL de Cloridrato de Lidocaína a 2%. Para este procedimento foi utilizado aparelho de ultrassom (DPS Mindray DP-2200VET), equipado com transdutor microconvexo ajustado para oito MHz de frequência e acoplado a uma guia intravaginal. Foram utilizadas agulhas 40x10 (19 G) e bomba de vácuo com pressão de vácuo de 80mmHg, correspondente a um fluxo de 14 mL de água/min. Foram puncionados os folículos maiores que dois milímetros sendo o material coletado transportado em tubos plásticos de 50 mL (Falcon), contendo cinco mL de solução salina tamponada (PBS), acrescida de 1000 UI de heparina à 37°C. O conteúdo aspirado foi lavado com PBS em filtro de coleta de embriões com malha de 80µ (Millipore). Os COCs foram rasteados em microscópio estereoscópico e transferidos para outra placa contendo meio Talp-hepes para sua manutenção. Posteriormente, foram classificados de acordo com COSTA et al. (1997a). Os ovócitos destinados à maturação *in vitro* foram envasados em palhetas de 0,25 mL em meio Talp-hepes e acondicionados em transportador de embriões com temperatura controlada de 38° C. Os demais

COCs foram acondicionados em tubos de polipropileno e congelados à -20°C, para a posterior detecção do DNA viral por meio da *Nested-PCR*.

No laboratório, as palhetas contendo os COCs foram cortadas e o conteúdo transferido para placa de cultivo sobre placa aquecedora a 38°C, contendo Talp-hepes. Os COCs foram rasteados novamente, lavados em microgotas de Talp-hepes e transferidos para uma placa de cultivo de 35 milímetros de diâmetro, contendo 1,5 mL de meio previamente equilibrado de TCM 199, acrescido de 10% de soro de vaca em estro e 10 µg/mL de FSH. Os COCs foram cultivados por 24 horas à 38,5°C em atmosfera de 5% de CO₂, 95% de ar atmosférico e 95% de umidade em estufa incubadora. Após este período, foram submetidos à avaliação da taxa de maturação nuclear (COSTA, 1994).

Para avaliação da taxa de maturação nuclear, os COCs cultivados foram transferidos para placa escavada contendo 300 µL de meio de Talp-hepes e submetidos ao procedimento de remoção do *cumulus oophorus* (COSTA et al., 1997a). Posteriormente, foram hipotonizados, fixados em lâmina e corados com orceína a 2%, segundo COSTA et al. (1997b). A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico, com aumento de 1.000X em imersão. Foram considerados como maturação nuclear, os ovócitos que apresentaram configuração cromossômica em metáfase II. As variáveis qualitativas foram comparadas em tabelas de contingência e analisadas pelo teste de qui-quadrado a 5% de probabilidade (SAMPAIO, 2002).

A detecção do DNA viral por meio da *Nested-PCR* foi realizada a fim avaliar a presença do BoHV1. Neste contexto, foi também realizada a *Nested-*

PCR para o BoHV5, tendo em vista que pode ocorrer reação cruzada pela soroneutralização.

A extração do DNA total foi realizada nos COCs, como indicado pelo fabricante do Kit de extração SV Wizard Genomic (Promega®), para serem utilizados no ensaio molecular. Os oligonucleotídeos utilizados e protocolo de execução das reações de *Nested*-PCR foram padronizados a partir da descrição de CAMPOS et al. (2009).

Cada reação foi constituída de um volume final de 25µL, contendo 1µL de DNA total de cada amostra, 2µL de cada um dos oligonucleotídeos (20 pMol), 2,5µL de DMSO, 12,5µL de Go Taq® Green Master Mix 2x (Promega®) e água ultra-pura (Millipore®), amplificando um fragmento de DNA de 162 pares de base.

Alíquotas de aproximadamente 5µL das reações foram submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1%, diluído em tampão borato TBE 0,5X (TRIS 1M pH8,3 50mM, Ácido bórico 45mM, EDTA 0,5M pH8,0 0,5mM) sob uma voltagem constante de 90V, por 40 minutos. Foram utilizados marcadores padrões de 100 pares de base (Marcador DNA Leader) para comparação dos fragmentos amplificados, visualizados sob luz Ultravioleta (UV).

RESULTADOS

Conforme o esperado, nenhum animal soronegativo apresentou o DNA viral nas amostras avaliadas. Entretanto, reação positiva pela *Nested*-PCR (Figura 1) foi observada em três animais soropositivos (3/12) revelaram o DNA do BoHV1 no *pool* de COCs, sendo dois animais com titulação baixa contra o

BoHV1 (dois de cinco) e um animal com titulação alta (um de três). Adicionalmente, não foi detectado o DNA do BoHV5 em nenhum animal, independente de estar infectado ou não. Quanto ao BoHV5, não foi detectado o DNA viral em nenhuma amostra avaliada.

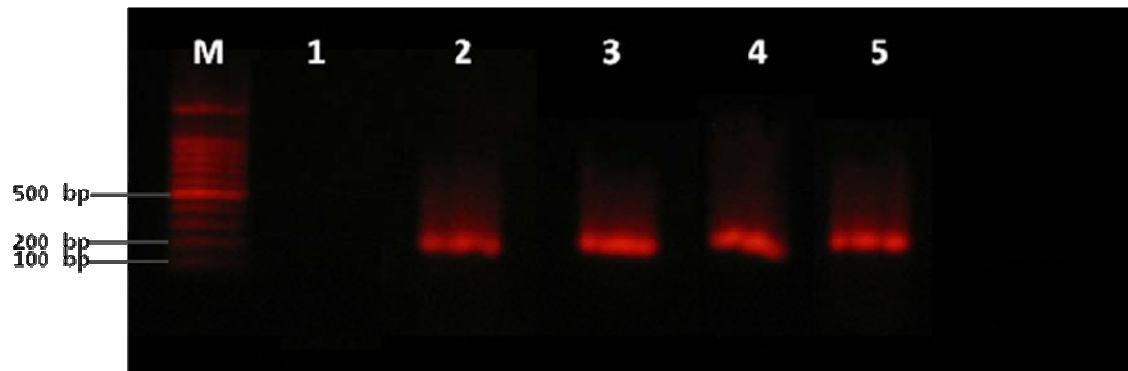


Figura 1. Produto da *Nested-PCR* em gel de agarose a 1%, para COCs de vacas soropositivas para o BoHV1 (M: marcador; 1: controle negativo; 2: controle positivo; 3, 4 e 5: Amostras de COCs positivas).

Os resultados encontrados quanto ao desenvolvimento dos ovócitos após o cultivo *in vitro* encontram-se apresentados na Tabela 1. Houve influência ($P<0,05$) do título viral contra o BoHV1 na taxa de maturação nuclear em ovócitos bovinos. Assim, os animais que apresentaram titulação média (48,4%) e titulação alta (50,9%) tiveram uma redução da taxa de maturação nuclear ovocitária ($P<0,05$) em relação aos animais controle (76,7%).

Tabela 1. Taxa de maturação nuclear de ovócitos oriundos de animais com diferentes títulos de anticorpos anti-BoHV1.

Tratamento	Ovócitos avaliados	Maturação nuclear	
		N	%
Negativo (Título < 2)	30	23	76,7 ^a
Título Baixo (2 - 8)	45	28	62,2 ^{a,c}
Título Médio (16 - 32)	31	15	48,4 ^{b,c}
Título Alto (64 - 512)	59	30	50,9 ^{b,c}
Total	165	96	58,2

Percentuais com letras sobrescritas diferentes indicam diferença ($P < 0,05$) pelo teste do Qui-quadrado.

DISCUSSÃO

O número de animais de cada grupo foi aleatório e variou de acordo com a titulação de anticorpos neutralizantes para o BoHV1. Houve uma grande dificuldade em encontrar rebanhos não vacinados e, ao mesmo tempo, animais com as diferentes titulações conforme definidas na metodologia. Além disto, havia a necessidade de conciliar a aspiração folicular com a logística para o transporte e cultivo ovocitário no laboratório em condições e tempo adequados.

Ocorreu variação individual em relação à quantidade de COCs recuperados para cada vaca por sessão de OPU (1 a 46 ovócitos). Em estudo recente, foram observadas taxas de recuperação também muito variável, sendo de 10 a 59 COCs por sessão de aspiração (PONTES et al., 2011), o que reforça os resultados obtidos no presente trabalho. Vários fatores podem ter influenciado essa variação, como idade, raça, condição corporal e fase reprodutiva (BOUSQUET et al., 1999; VIANA et. al., 2010). Entretanto,

observou-se uma consistência na quantidade de COCs recuperados de uma mesma vaca ao longo das sessões de OPU (duas a nove sessões por doadora). Estes achados corroboram com os dados de Petym et al. (2003), os quais verificaram esta condição ao longo de 16 a 32 sessões de OPU e Pontes et al. (2011) em 1 a 6 sessões. Estes achados indicam que as doadoras possuem uma produção regular de ovócitos.

O não aproveitamento de todos os COCs recuperados pode ser decorrente da aspiração dos ovócitos em fase aleatória do ciclo estral. No presente trabalho, o intervalo entre as aspirações não teve um padrão pré-estabelecido, o que pode ter influenciado na quantidade e qualidade dos COCs recuperados. Esta condição pode ter ocorrido devido muitos ovócitos estarem provavelmente em fase de atresia, condição esta relatada por Sirard et al. (1999). Reforçando esta condição, sabe-se que a presença de um folículo dominante induz a um processo de atresia gradativa nos demais folículos (GALLI et al., 2001).

Outro fator que interferiu para o não aproveitamento de todos os ovócitos aspirados estava relacionado às células do *cumulus*. Segundo Sirard et al. (1999), ovócitos coletados por meio da aspiração folicular podem apresentar um reduzido número de camadas das células do *cumulus*. As células do *cumulus*, durante a maturação, possuem um importante papel no suprimento de substrato nutritivo e passagem de componentes químicos reguladores da maturação para o ovócito (HYTTEL, 1987; GONÇALVES et al., 2008). Assim, ovócitos desnudos não terão competência para se desenvolver em um embrião viável após a fecundação (SIRARD et al., 2006).

Um total de 674 COCs foi recuperado durante 22 sessões de OPU em 15 doadoras. Foram utilizados aproximadamente 400 COCs para o processamento pelo *Nested-PCR* e avaliados 165 ovócitos para a determinação da taxa de maturação nuclear. A variável “taxa de maturação” é qualitativa dicotômica, exigindo então a análise pelo qui-quadrado. Segundo Sampaio (2002) o número mínimo de repetições para este teste deve atender a relação $n=15k$, onde k = número de respostas a serem estudadas. No presente experimento foram estudadas duas respostas (maturou ou não maturou). Assim, o número mínimo de repetições de cada tratamento seria 30 (15×2).

Conforme esperado, nenhum animal soronegativo apresentou o DNA viral nas amostras avaliadas. Entretanto, reação positiva pela *Nested-PCR* foi observada em três animais soropositivos (3/12) revelaram o DNA do BoHV1 no *pool* de COCs. Adicionalmente, não foi detectado o DNA do BoHV5 em nenhum animal, independente de estar infectado ou não.

A taxa de maturação observada no grupo controle (76,7%) está coerente com a observada na literatura, onde 70 a 80% dos CCOs bovinos submetidos aos sistemas de maturação *in vitro*, atingem o estágio de MII da meiose (COSTA, 1994; DODE e ADONA et al., 2001; ALM et al., 2005). Entretanto, houve influência ($P<0,05$) do título de anticorpos contra o BoHV1 na taxa de maturação em ovócitos bovinos. Assim, os animais que apresentaram titulação média e alta tiveram uma redução ($P<0,05$) da taxa de maturação ovocitária (48,4 e 50,9%, respectivamente) em relação aos animais controle (76,7%).

Em relação ao BoHV1, sabe-se que animais aparentemente saudáveis podem conter o vírus em seus ovários, tubas uterinas e ovócitos (GUERIN et al., 1990). Contudo, não foram observadas diferenças morfológicas nos ovócitos

durante a avaliação realizada antes e após o cultivo *in vitro*, apesar do comprometimento na taxa de maturação nuclear, corroborando com dados apresentados por D'Angelo (1998). Este pesquisador verificou que tanto ovócitos bovinos maturados *in vitro* com BoHV1 quanto os maturados na ausência do vírus, apresentam morfologia indistinguível. Esta informação é relevante, uma vez que, quase sempre, a análise de ovócitos para a produção de embriões *in vitro* baseia-se somente em observações de ovócitos envoltos por camadas de células do *cumulus*, podendo desta forma, contribuir para a utilização de gametas contaminados e disseminação do vírus no decorrer da manipulação *in vitro*.

Os resultados na taxa de maturação obtidos no presente experimento não são condizentes com outros trabalhos, onde os ovócitos foram expostos experimentalmente ao BoHV1 durante a etapa de MIV (GUERIN et al., 1990 e VANROOSE et al., 1999). Entretanto, VANROOSE et al. (1999) verificaram que a infecção experimental provoca um efeito citopático nas células do *cumulus ooforus* (arredondamento das células com falha na produção de uma monocamada confluyente após a maturação), apesar de não interferir na expansão destas células. Como já descrito anteriormente, as células do *cumulus ooforus* são importantes no processo de maturação.

É importante ressaltar que o presente experimento foi delineado para comparar grupos de animais nas diferentes titulações de anticorpos. Apesar dos resultados obtidos, é importante salientar que a infecção dos órgãos genitais e a excreção viral estão associadas à fase aguda da doença, a qual é extremamente curta em animais infectados sob condições naturais (GUERIN et al., 1997), cuja condição foi a dos animais estudados no presente experimento.

Assim, após a infecção e replicação viral, o vírus invade terminações nervosas de neurônios sensoriais, onde estabelecerá latência (ROCK et al., 1992), preferencialmente nos gânglios trigêmio e sacral (WRATHALL et al., 2006). Com o estabelecimento desta latência não ocorre expressão de antígenos virais, ocorrendo interrupção da replicação (WORKMAN et al., 2009). Provavelmente, a maturação ovocitária nesta condição poderia não ser comprometida, apesar do animal ser soropositivo. Entretanto, a reativação da infecção, com liberação de partículas virais infectantes, pode ocorrer posteriormente devido a depressão no sistema imunológico, como o estresse ou o tratamento com corticóides (ACKERMANN et al., 1982; STRAUB, 1990; SPEAR, 2004).

CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos conclui-se que vacas infectadas naturalmente pelo vírus BoHV1 apresentam comprometimento na taxa de maturação nuclear, dependendo do grau de titulação de anticorpos contra o vírus.

REFERÊNCIAS

ACKERMANN, M.; PETERHANS, E.; WYLER, R. DNA of bovine herpesvirus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. **American Journal of Veterinary Research**, v.43, p.36-40, 1982.

ALM, H.; TORNER, H.; LÖHRKE VIERGUTZ, G.I.M.; KANITZ, W. Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. **Theriogenology**, v.63, p.2194-2205, 2005.

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.1211-17, 1994.

BOLS, P.E.J.; VANDENHEEDE, J.M.M.; VAN SOOM, A.; DE KRUIF, A. Transvaginal ovum pick up (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. **Theriogenology**, v.43, p.677-87, 1995.

BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; MORIN, N.; BRISSON, C.; CRBONNEAU, G.C.; DUROCHER, J. In vitro embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. **Theriogenology**, v.51, p.59-70, 1999.

CAMPOS, F.S.; FRANCO, A.C.; HÜBNER, S.O.; OLIVEIRA, M.T.; SILVA, A.D.; ESTEVES, P.A.; ROEHE, P.M.; RIJSEWIJK, F.A.M. High prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.139, p.67-73, 2009.

COSTA, E. P. **Aspectos morfológicos (citológicos e ultraestrututais) e desenvolvimento de ovócitos de bovinos “in vitro”**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1994. 155f. Tese (Doutorado em Ciência Animal, área Reprodução Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, 1994.

COSTA, E.P.; VALE FILHO, V.R.; NOGUEIRA, J.C.; COSTA, A.H.A.; CAMARGOS, E.R.S.; FERREIRA, A.M.; BRUSCHI, J.H. Técnicas para desnudamento rápido de ovócitos de bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, p.425-432, 1997a.

COSTA, E.P.; VALE FILHO, V.R.; NOGUEIRA, J.C.; FERREIRA, A.M.; COSTA, A.H.A. Técnica para a avaliação do estágio de maturação “in vitro” de ovócitos bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, p.433-440, 1997b.

D'ANGELO, M. **Interação do Herpesvirus Bovino tipo-1 (BHV-1) com oócitos bovinos maturados in vitro**. 1998. 52f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

DODE, M.A.N.; ADONA, P.R. Developmental capacity of *Bos indicus* oocytes after inhibition of meiotic resumption by 6-dimethylaminopurine. **Animal Reproduction Science**, v.65, p.171-180, 2001.

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

FERREIRA, C.Y.M.R.; PIATTI, R.M.; MIYASHIRO, S.; GALUPPO, A.G.; ZERIO, N.M.C.; SÂMARA, S.I.; D'ANGELO, M. Ocorrência do herpesvirus bovino 1 (BoHV-1) no líquido folicular e células epiteliais de oviduto bovino. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.3, p.309-311, 2005.

GALLI, C.; CROTTI, G.; NOTARI, C.; TURINI, P.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. Embryo production by ovum pick up from live donors. **Theriogenology**, v.55, p.1341-57, 2001.

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

GONGALVES, P.B.D.; FIGUEREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. Biotécnicas aplicadas a Reprodução Animal. 2° ed., Roca, São Paulo, 408p., 2008.

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. **Recueil de Medecine Veterinaire**, v.66, p.911-917, 1990.

GUERIN, B. ; NIBART, M.; MARQUANT -LE GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P. Sanitary risks related to embryo transfer in domestic species. **Theriogenology**, v.47, p.33-42, 1997.

HYTTEL, P. Bovine cumulus-oocyte disconnection in vitro. **Anatomy and Embryology**, v.176, p.41-44, 1987.

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

LONERGAN, P. **Studies on the in vitro maturation, fertilization and culture of bovine follicular oocyte**. Ph.D. Thesis, National University of Ireland, Dublin. 1992.

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.

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 diarrhoea virus in bovine follicular fluid. **Theriogenology**, v.70, p.153-160, 2008.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). Terrestrial Animal Health Code. World Organization for Animal Health. 2008. Disponível em: <<http://www.oie.int>>. Acesso em: 25/01/2012.

PETYIM, S.; BAGE, R.; HALLAP, T.; BERGQVIST, A.S.; RODRIGUES-ARTINEZ, H.; LARSSON, B. Two different schemes of twice weekly ovum pick-up in dairy heifers: effect on oocyte recovery and ovarian function. **Theriogenology**, v.60, p.175-88, 2003.

PONTES, J.H.F.; MELO STERZAB, F.A.; BASSO, A.C.; FERREIRA, C.R.; SANCHES, B.V.; RUBIN, K.C.P.; SENEDA, M.M. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v.75, p.1640-46, 2011.

ROCK, D.; LOKENSGARD, J.; LEWIS, T.; KUTISH, G. Characterization of dexamethasone-induced reactivation of latent bovine herpesvirus 1. **Journal of Virology**, v.66, p.2484-90, 1992.

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, 265p. 2002.

SIRARD, M.A.; PICARD, L.; DERY, M.; COENEN, K.; BLONDIN, P. The time between FSH administration and ovarian aspiration influences the development of cattle oocytes. **Theriogenology**, v.51, p.699-708, 1999.

SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v.65, p.126-36, 2006.

SPEAR, P.G. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. **Cellular Microbiology**, v.6, p.401-10, 2004.

STRAUB, O.C. Infectious bovine rhinotracheitis virus. In: DINTER, Z. e MORUN, B. **Virus Infectious of Ruminants**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p.71-108, 1990.

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

TANGHE, S.; VANROOSE, G.; VAN SOOM, A.; DUCHATEAU, L.; YSEBAERT, M.T.; KERKHOFS, P.; THIRY, E.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; VAN OOSTVELDT, P.; NAUWYNCK, H. Inhibition of bovine sperm-zona binding by bovine herpesvirus-1. **Reproduction**, v.130, p.251-9, 2005.

VAN OIRSCHOT, J.T. Bovine herpesvirus 1 in semen of bulls and the risk of transmission: a brief review. **Veterinary Quarterly**, v.17, p.29-33, 1995.

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

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**, v.38, p.661-74, 2010.

WORKMAN, A.; PEREZ, S.; DOSTER, A.; JONES, C. Dexamethasone treatment of calves latently infected with bovine herpesvirus 1 leads to activation of the bICP0 early promoter, in part by the cellular transcription factor C/EBP-Alpha. **Journal of Virology**, p.8800-09, 2009.

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.

5. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados permitem concluir o DNA viral pode estar presente em estruturas ovarianas de vacas infectadas naturalmente pelo BoHV1, contrariando a hipótese de que animais sorologicamente positivos e sem sintomatologia clínica, são improváveis de terem as suas estrutura reprodutivas femininas acometida pela infecção do BoHV1 e potencialmente serem transmissores do BoHV1 através de COCs. Conclui-se também que vacas infectadas naturalmente pelo vírus BoHV1 apresentam comprometimento na taxa de maturação nuclear, dependendo do grau de titulação contra o vírus. E que variações individuais devem ser consideradas, tendo em vista a característica biológica do vírus.