

PESQUISA DO VÍRUS DA RINOTRAQUÍTE INFECCIOSA DOS BOVINOS EM
COMPLEXOS *CUMULUS*-OÓCITO E LÍQUIDO FOLICULAR.

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre
em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Medicina Veterinária
Preventiva

Orientador: Rômulo Cerqueira Leite
Coorientadores: João Henrique Moreira Viana
Marcos Bryan Heinemann

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2007

Agradeço à minha família e amigos, aos professores Rômulo Cerqueira Leite, Marcos Bryan Heinemann, Marc Roger Jean Marie Henry, Pedro Lúcio Ligthg Pereira pela minha iniciação no mundo científico, José Newton Coelho Menezes, Ao Dr. João Henrique Moreira Viana, Gilmar Pereira Alvim (Del), aos integrantes da equipe do laboratório de reprodução da EMBRAPA CNPGL, a EPAMIG, em especial ao Dr. Alberto Marcatti pelo apoio e carinho em que me recebeu nesta intuição e a todos os estagiários que participaram da elaboração deste sonho de vida.
MUITO OBRIGADO!!!!

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO	8
2. LITERATURA CONSULTADA	8
3 RINOTRAQUEÍTE INFECCIOSA BOVINA (IBR)	10
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1 Local e período do experimento.....	13
4.2 Seleção dos animais e coleta dos dados.....	13
4.3 Processamento das amostras sanguíneas para IBR.....	13
4.4 Aspiração folicular e coleta de amostras.....	13
4.4.1 Processamento do material aspirado.....	14
4.4.2 Extração do DNA.....	14
4.4.3 Análise da PCR.....	14
4.4.4 Controle da técnica.....	14
5 RESULTADOS	15
6 DISCUSSÃO	18
7 CONCLUSÃO	19
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Resultado da punção animais negativos.....	15
TABELA 2 Resultado sorológico fazenda 2.....	15
TABELA 3 Resultado sorológico fazenda 3.....	16
TABELA 4 Resultado sorológico fazenda 4.....	16
TABELA 5 Avaliação ginecológica e recuperação de oócitos Fazenda 1.....	16
TABELA 6 Avaliação ginecológica e recuperação de oócitos Fazenda 3.....	17
TABELA 7 Avaliação ginecológica e recuperação de oócitos Fazenda 2.....	17

LISTA DE ABREVIações

BHV-1	Herpesvírus Bovino tipo 1
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
IA	Inseminação Artificial
PIV	Produção <i>in vitro</i> de embriões
OPU	<i>Ovum pick-up</i>
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
COCs	Complexo cumulus oócito
OIE	Organização Internacional de Epizootias
IETS	Sociedade Internacional de Transferência de Embriões
FAO	Organização das nações para agricultura e alimentação
OMS	Organização Mundial de Saúde
IBR	Rinotraqueíte Infecciosa dos Bovinos
BVD	Diarréia Viral dos Bovinos
VE	Estomatite Vesicular
SNC	Sistema nervoso central
CL	Corpo Lúteo
ZP	Zona Pelúcida
BSA	Albumina sérica bovina
CECP	Centro Experimental Coronel Pacheco
CESM	Centro Experimental Santa Mônica
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
DPBS	Solução de salina tamponada Dubeco
PCR	Reação de Cadeia em Polimerase
LF	Líquido Folicular

OLIVEIRA, AP. Pesquisa do vírus da rinotraquíte infecciosa dos bovinos (Bhv-1), em complexos *cumulus*-oócito e líquido folicular. Minas Gerais. 2007, 29p. Dissertação (mestrado em medicina veterinária). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

RESUMO

O risco da introdução de doenças exóticas ou cepas mais virulentas de doenças endêmicas através da transferência de embriões é uma preocupação constante, afetando as relações comerciais internacionais. O objetivo desse trabalho foi pesquisar a presença do vírus BHV-1, causador da IBR, no líquido folicular e complexos *cumulus*-oócito (COCs) bovinos em animais naturalmente infectados. Foram utilizados 38 animais sorologicamente positivos e 8 negativos para IBR. Os COCs e líquidos foliculares foram obtidos através da técnica de punção folicular orientada por ultrassonografia (OPU). A pesquisa do vírus feita através da PCR. Não foi encontrado o DNA viral em nenhuma das amostras obtidas. Pode-se concluir que a utilização de animais sorologicamente positivos para BHV-1, na PIV segura enquanto o animal não estiver na fase aguda da doença e que a existência de um COC negativo em um sistema PIV não prediz o status epidemiológico do rebanho, portanto um protocolo para comercialização de embriões e gametas deve levar em conta o perfil sorológico das doadoras.

Palavras-chave: BHV-1; OPU; Oócitos; Líquido Folicular; PCR.

ABSTRACT

The risk of the introduction of exotic illnesses or more virulent kinds of endemic diseases through the transference of embryos is a constant concern, affecting the international commercial relationships. The objective of this study was to investigate the presence of the BHV-1 virus, causer of the IBR, in the bovine folicular fluid and *cumulus*-oocytes complexes in naturally infected animals of form. Positive animals (n= 38) and negatives (n=8) animals were

selected for IBR. The *cumulus*-oocytes complexes and folicular fluid were obtained by ovum pick-up (OPU) and the research of the virus made through PCR. The viral DNA was not found in the samples. In conclusion the use of positive animals for BHV-1 in the IVP, is acceptable for animals not in the acute phase of the illness, and the existence of a negative *cumulus*-oocytes complexes in a PIV system does not mean that the donator is negative for the illness, therefore a protocol for commercialization of embryos and germ cells must take in account the serological profile of the donators.

Key-words: BHV-1, OPU, oocytes, Folicular fluid, PCR

1. Introdução:

O comércio mundial de embriões bovinos vem acompanhando o crescimento da produção. Contudo uma série de problemas sanitários ocorridos recentemente, como os focos de aftosa no Brasil, estomatite vesicular em países da América do Sul, e BSE na América do Norte e países da União Européia, aumentou a preocupação com o risco da introdução de doenças exóticas em áreas livres ou cepas mais virulentas de doenças endêmicas.

Devido a essa preocupação, foram criados protocolos para assegurar a qualidade e minimizar o risco da introdução e disseminação de doenças nos rebanhos através do comércio mundial de sêmen, embriões e gametas.

Os países têm buscado desenvolver metodologias de verificação de risco para doenças infecto-contagiosas com bases científicas sólidas, para que possam justificar ou não a liberação da importação de germoplasma animal.

Estes protocolos reguladores para o transporte internacional de germoplasma têm grande importância político-econômica, e envolvem a responsabilidade ética e técnica dos serviços oficiais de saúde animal do país exportador, respeitando os requisitos restritivos de cada país importador.

Para o desenvolvimento de protocolos reguladores deve-se, primeiramente, conhecer a epidemiologia das doenças e a interação entre os patógenos e os complexos cumulus-oócitos, embriões e sêmen.

Procurou-se estabelecer neste trabalho o risco da introdução do herpes vírus bovino 1 (BHV-1), em laboratórios de FIV através dos oócitos provenientes de animais naturalmente infectados e sem tratamentos para a indução do estresse.

2. Literatura consultada:

A produção mundial de embriões bovinos vem crescendo anualmente (Viana, 2006). Existe uma

grande variação na forma de produção (*in vivo* ou *in vitro*), no tipo de raça (corte ou leite) e no uso ou não da criopreservação ou da transferência a fresco.

Esta variação se dá principalmente pelas particularidades produtivas de cada país; na África e América do Sul existe uma maior demanda por raças zebuínas e embriões transferidos a fresco, já na América do Norte, Europa e países asiáticos a produção de embriões ocorre principalmente em raças leiteiras e a transferência utilizando embriões criopreservados.

A disponibilidade de terra e de receptoras é um fator determinante para a escolha da tecnologia de produção de embriões a ser empregada. O Brasil é o maior produtor de embriões *in vitro* do mundo e quase a totalidade das transferências é realizada a fresco (Viana, 2006). Contudo, o uso de biotecnologias no país vem sendo alavancado por possibilitar o uso de raças ou cruzamentos bem mais adaptados às condições tropicais (Viana, 2002), esse desenvolvimento passa pelo uso de técnicas como a inseminação artificial (IA), a produção e transferência de embriões (*in vivo* e *in vitro*), o diagnóstico precoce de gestação, a sexagem de embriões, entre outros.

A produção *in vitro* de animais (PIV) consiste em um conjunto de procedimentos que englobam a punção folicular, para a recuperação dos gametas (oócitos), a maturação e fertilização *in vitro* (MIV e FIV, respectivamente) dos mesmos em ambiente controlado e o posterior cultivo dos embriões gerados. A PIV demonstra ser uma boa alternativa, pois segundo Bousquet *et al.* (1999) o número de gestações obtidas de uma doadora, por dessa técnica e em determinado período de tempo, é muito superior ao obtido pela produção *in vivo*.

A técnica da punção folicular transvaginal guiada por ultrassonografia, também chamada *ovum pick-up* (OPU), foi desenvolvida na década de 80 para a obtenção de complexos *cumulus*-oócito (COCs) *in vivo*, proporcionando sua obtenção com um mínimo de trauma para a doadora (Pieterse *et al.*, 1991a e b). Esta técnica

substituiu abordagens mais invasivas como a cirúrgica e a laparoscopia, até então utilizadas, sendo considerada hoje o procedimento de eleição para recuperação de oócitos para a PIV de embriões.

Existem diversas vantagens no uso da técnica de OPU, como não dependência de tratamentos hormonais, como a possibilidade de ser realizada em animais jovens, senis, em fase inicial de gestação ou com alterações físicas no trato genital (Boni *et al.*, 1997). Desta forma, contorna-se o principal obstáculo ao uso comercial da fertilização *in vitro*, que era a obtenção de complexos cumulus-oócito (COCs) de doadoras vivas e a produção em escala comercial de embriões.

O Brasil tem importante participação no uso dessa tecnologia, principalmente em rebanhos de corte, aonde existe a disponibilidade de receptoras, terra e os produtos obtidos (machos e fêmeas) têm valor no mercado. Deve-se ressaltar, contudo, a importância da possibilidade da transmissão de doenças a partir da produção de embriões *in vitro* (Lage, 1999).

Na década de 80, começo da comercialização de embriões, muitos países impunham um grande número de exigências sanitárias para o a importação e exportação de embriões, com diversos testes em doadoras, receptoras e nos produtos para a transferência de embriões. Estas exigências tornavam a importação de embriões proibitiva uma vez que era aplicada às mesmas exigências sanitárias que as exigidas ao transporte de animais vivos (Stumöller & Wratall, 1997).

Após estudos realizados pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) e Organização Internacional de Epizotias (OIE), os embriões passaram a ser considerados como um produto separado dos animais vivos, com normas exclusivas de coletas, manipulação e transferência, para que fosse minimizado o risco de transmissão de doenças. Este regulamento sanitário internacional encontra-se sob a responsabilidade da OIE/FAO/OMS.

A responsabilidade geral pela integridade e credibilidade da certificação sanitária, contudo, é do serviço veterinário oficial de cada país,

devendo este estabelecer metodologias para verificação de risco sanitário e assegurar que sejam seguidos os padrões adequados de credibilidade na certificação (Evans, 1999), evitando conflitos de interesses ou proteção comercial.

Devido a menor probabilidade de transmissão de patógenos, a transferência de embriões tem-se mostrado uma biotécnica eficiente para minimizar a possibilidade da entrada de doenças nos rebanhos, sendo portanto uma ferramenta auxiliar importante no controle de algumas doenças nos bovinos (Philpott, 1993; Stumüller & Wratall, 1997).

As principais fontes potenciais de transmissão de doenças em um sistema PIV são: o complexo cumulus-oócito; o sêmen; o embrião; o procedimento de manipulação do embrião; os meio de cultura utilizados; a receptora e a doadora. Em relação às doadoras e receptoras, o principal cuidado é assegurar que sejam procedentes de rebanhos livres ou vacinadas para as principais doenças infecciosas. Quanto aos embriões, a maior resistência do embrião é conferida pela zona pelúcida e, secundariamente, pelo estado de desenvolvimento e conformação. Assim, é uma exigência que deve constar no certificado zoosanitário internacional que o embrião, antes de ser congelado, apresente a zona pelúcida íntegra, além das lavagens sucessivas com tripsina, anti-soros específicos e antibióticos.

Existem 4 abordagens principais para investigar o potencial dos embriões em transmitir doenças infecciosas. São elas: a abordagem *in vitro-in vitro*, quando os embriões ou oócitos são retirados de doadoras negativas e são infectados *in vitro*; a abordagem *in vitro-in vivo*, aonde embriões de doadoras livres de determinada doença são expostos ao agente *in vitro* e então transferidos para receptoras sorologicamente negativas para o monitoramento da soroconversão; a abordagem *in vivo-in vitro*, aonde as doadoras são soropositivas e o agente é pesquisado *in vitro*; a abordagem *in vivo-in vivo*, quando os embriões são coletados de animais positivos e transferidos para animais negativos que serão monitorados quanto à presença do agente (Hare, 1990).

A duas primeiras abordagens tendem a exacerbar o risco de transmissão e a terceira e a quarta tem a tentativa de predizer o risco real.

O conhecimento e o controle de cada um dessas fontes e a abordagem é fundamental para a análise do risco de transmissão de doenças como, a Leucose Enzoótica Bovina (LEB), a Rinotraqueíte Infeciosa Bovina (IBR), a Diarréia Bovina a Vírus (BVD), Língua Azul (Bluetongue), Febre Aftosa, Estomatite Vesicular (VE).

Entre as doenças citadas chama atenção por causar grandes prejuízos na pecuária bovina mundial a Rinotraqueíte Infeciosa Bovina (IBR).

3. Rinotraqueíte Infeciosa Bovina (IBR):

A IBR é uma infecção causada pelo herpes vírus bovino 1 (BHV-1), pertencente à família *herpesviridae* gênero *varicellovirus* e subfamília *alfaherpesviridae*. O vírus, contendo DNA de fita dupla e um capsídeo icosadeltahédrico de aproximadamente 100 nm de diâmetro e 162 capsômeros (Butel, 1992).

Os herpesvírus bovinos são epiteliotrópicos, multiplicando-se inicialmente nas mucosas da região nasal, faringe e tonsilas. Após o primeiro ciclo, o vírus pode prosseguir via terminações nervosas até os gânglios sensoriais no sistema nervoso central, onde pode permanecer em latência por toda a vida do hospedeiro porém, o vírus latente pode ser reativado em resposta a diferentes estímulos como parição, estresse, superinfecção por outros agentes, tratamentos com corticóides, ACTH, dentre outros, em diferentes frequências por toda a vida do hospedeiro carreador (Botelho, 2000). Após a reativação, o vírus pode voltar ao sítio de entrada e ser reexcretado produzindo lesões primárias em contato com hospedeiros susceptíveis (Engels & Ackerman, 1996).

A disseminação viral ocorre principalmente por aerossóis e secreções corpóreas, porém pode ocorrer também por transmissão venérea (Botelho, 2000).

Bovinos de todas as idades são susceptíveis em infecções experimentais, em condições naturais são mais susceptíveis os animais jovens, preferencialmente os confinados nas estações secas (Gustafson, 1981).

Surtos da doença podem aparecer quando animais portadores são introduzidos em rebanhos susceptíveis (Gustafson, 1981). Não existem diferenças quanto a susceptibilidade em relação a raças e sexo (Kahrs, 1977), porém grande importância deve ser dada quanto ao sistema de produção a qual esses animais estão inseridos.

Segundo Khars (1977), o período de incubação varia entre 2 a 6 dias, mas Gustafson (1981) relata o aparecimento da doença de 10 dias a várias semanas após animais de várias regiões distintas terem sido transportados juntos.

A infecção pelo BHV-1 pode provocar danos diretamente no útero, nos ovários e oviduto, causando ooforites com necrose hemorrágica do oviduto, diminuição da produção de progesterona pelo corpo lúteo, infertilidade, reabsorção embrionária e nascimento de bezerras fracas.

Quando a infecção pelo BHV-1 ocorre logo após o estro, quando existe um máximo fluxo sanguíneo para a formação do CL, um maior número de células seriam simultaneamente expostas ao vírus e o resultado seria uma necrose difusa. Se, por outro lado, a infecção ocorrer quando o CL estiver totalmente funcional, menos células estarão expostas ao vírus, portanto as lesões serão menores e focais (Miller, 1986).

Na infecção experimental de animais com BHV-1, o vírus foi encontrado associado com oócitos, líquido folicular, células da granulosa, corpos lúteos e líquidos tubáricos (Gerin, *et al.*, 1989).

Segundo Canant (1984; 1985), Kirkbride (1985), Bowen (1985), Bielasni *et al.* (1987), Miller (1991), Vanroose *et al.* (1998), Wrathall & Suttmüller (1998) o vírus pode comprometer o desenvolvimento do embrião e do feto em qualquer fase da gestação. A morte embrionária ocorre logo após a perda da proteção da zona pelúcida, por volta do 7º dia após a fertilização, pela atividade citotóxica nas células embrionárias ou por alterações fisiopatológicas

no ambiente uterino, sendo o aumento da temperatura um fator crucial (Putney *et al.*, 1988). Prostaglandinas também podem estar elevadas no período febril, levando a luteólise e a perda da gestação (Vanroose *et al.*, 2000). Chirstianson (1992), afirma que o estresse gerado no animal devido ao pico febril poderia levar indiretamente à perda embrionária pela elevação da concentração de esteróides, causando a supressão da resposta imune.

A imunidade específica contra o vírus parece ser muito importante Bielanski *et al.* (1987) afirma não haver influencia do vírus na fertilização e desenvolvimento embrionário *in vivo*, em fêmeas múltiparas, por essas já estarem em contato com os demais animais positivos do rebanho e desenvolvido imunidade específica anteriormente. Demonstrou-se também a ocorrência de absorção embrionária em fêmeas nulíparas quando em contato com outros animais positivos no rebanho.

O vírus pode ser transmitida pela monta natural ou pela inseminação artificial. Especula-se que a doença tenha se disseminado na Europa através da utilização de sêmen proveniente de animais portadores (Gustafson, 1981).

A IBR se perpetua nos rebanhos através do contato direto entre animais portadores e susceptíveis, além de portadores da forma subclínica nos quais infecções latentes ocasionalmente são reativadas e são acompanhadas da excreção do vírus. Animais de todas as idades podem apresentar títulos de anticorpos contra o BHV-1, porém têm sido encontrado principalmente em animais com idades superiores a 20 meses (Khars, 1977).

O BHV-1 provoca uma doença cosmopolita e de grande importância econômica. Pituco (1988) e Vidor *et al.* (1995), demonstram que o agente HVB-1 encontra-se disseminado nos rebanhos brasileiros apresentando, portanto, caráter endêmico em plantéis destinados à produção de carne e leite. Animais com idades superiores a 18 meses possuem alta prevalência para a doença em rebanhos positivos (Leite, 1999).

Na América do Sul o vírus tem apresentado uma distribuição variável de 13 a 68% (Roeche *et al.*, 1998).

Pituco (1988) e Rocha *et al.* (1994), realizaram inquéritos sorológicos em touros de centrais de inseminação constatando uma prevalência de 72,5 e 63,15% respectivamente de animais soropositivos.

A inseminação artificial com sêmen positivo para BHV-1 reduz a taxa de gestação e pode causar endometrites (Vanroose *et al.*, 2000), porém touros positivos para IBR aparentemente não reduzem a fertilidade dos rebanhos utilizando-se monta natural (Oliveira Júnior, 2005). Bielasni *et al.* (1993) propõem que o BHV-1 têm efeito direto no espermatozóide, aderindo nas células espermáticas, pois a composição química do receptor de sulfato de heparina difundido na superfície celular espermática é muito similar e correspondente ao sítio de ligação das glicoproteínas gC e gB do vírus (Therien *et al.*, 1997; Trybala, *et al.*, 1998). Também é conhecido que o vírus se liga a heparina, o que poderia afetar a capacitação *in vitro* do sêmen bovino (efeito indireto do BHV-1) (Okazaki *et al.*, 1994).

Partículas virais aderidas podem dificultar o processo de penetração do espermatozóide no oócito pela ZP (Vanroose *et al.*, 1999). Bowen (1979) afirma que o vírus aderido a ZP ou ao espermatozóide fertilizante poderia penetrar no oócito no momento da fertilização. Já Wrattall & Suttmöller (1998), sugerem ser extremamente improvável que isso ocorra, pois os canais da zona pelúcida deixados pelas expansões das células da corona radiata ou pela passagem do espermatozóide se fecham muito rapidamente. Todavia os menores vírus não são móveis e as bactérias móveis são muito grandes para penetrar nos canais.

Migrações passivas do vírus pela zona pelúcida são muito improváveis de ocorrer, já que partículas com o diâmetro de 40-100 µm (referentes aos vírus da BVD e IBR) permanecem retidos na ZP (Vanroose *et al.*, 1999).

É certo que embriões produzidos *in vitro* são mais susceptíveis à contaminação tanto por microrganismos patogênicos como não patogênicos.

Embriões desenvolvidos de oócitos fecundados *in vitro* diferem morfológica e fisiologicamente de embriões fecundados *in vivo* (McLeod *et al.*, 1980).

Na produção *in vitro* de embriões, é necessária a utilização de sistemas de cultivo específicos que, por conter células animais, são uma possível fonte de contaminação embrionária. Todos os meios utilizados *in vitro* também podem ser fonte de contaminação viral, estabelecendo estreita proximidade com o embrião até o momento da transferência, (Stringfellow & Givens, 2000).

Bactérias, fungos e micoplasmas poderiam alterar os meios levando a turbidez e alterações de pH. A contaminação é claramente depreciativa, no sistema de produção, sendo portanto auto-limitantes, pois as culturas afetadas são descartadas. Contudo a baixa contaminação traria maiores efeitos, pois sua presença poderia passar despercebida permanecendo, portanto, mais tempo em contato com os oócitos e embriões.

A higiene no momento da coleta dos gametas, seja por punção ou no abatedouro e o uso de equipamentos de biossegurança nos laboratórios reduzem a contaminação microbiológica oriundas das doadoras e do meio ambiente (Mapletoft & Stookey, 1998; Nibart *et al.*, 1998; Schiewe, 1998). Contudo, produtos de origem biológica utilizados na PIV, representam uma fonte de contaminação considerável; soro, soroalbumina, hormônios, e enzimas são todas fontes potenciais de microorganismos patogênicos e não-patogênicos.

A segurança desses subprodutos deve ser acompanhada pela combinação das seguintes atividades:

-Controle da fonte primária animal, controles específicos como radiação gama, tratamento com calor, betapropiolactona, e filtração, testes sorológicos específicos, teste da viabilidade dos contaminantes e produção de resíduos tóxicos, após sua manipulação (Brock, 1998).

O controle pode se dar pela utilização de meios de cultura pré-definidos, pois estes apresentam

vantagens como a padronização dos cultivos na PIV de embriões bovinos, a prevenção da introdução de patógenos pela eliminação do uso de subprodutos adicionais de origem animal, e facilitariam estudos na determinação exata dos requerimentos para o desenvolvimento embrionário *in vitro* (McLaughlin *et al.*, 1990; Carolan *et al.*, 1995; Fanscovits *et al.*, 1998).

A troca do soro por BSA ou por meios pré-definidos diminui o risco sanitário para a presença do BHV-1, sendo ainda mais seguro a substituição do soro por álcool polivinílico, hialuronato de sódio ou VF-5 surfactante (Gerin *et al.*, 1997).

Sistemas de cultura baseados em meios semidefinidos poderiam resolver os problemas adversos causados pela infecção viral das células somáticas em sistemas de co-cultura, Vanroose *et al.* (1999). A melhor forma de controle do risco sanitário seria a utilização de linhagens de células estabilizadas para cultivo ou meios quimicamente definidos, que possam ser testados para a presença de patógenos antes de sua utilização (Gerin *et al.*, 1997).

A zona pelúcida é uma estrutura glicoproteica que funciona como receptor primário e secundário do espermatozóide (Betteridge, 1995). Ela tem importância fundamental na proteção do embrião (Bowen, 1979).

Apesar de não ter sido demonstrado em bovinos, Gwatkin (1967) provou que a ZP de embriões de hamsters e ratos permitem a passagem de pequenos vírus como da meningoencefalite. Contudo, a ZP de camundongos têm aproximadamente 5µm de espessura, enquanto de bovinos e ovinos têm entre 10 e 15µm, (Betteridge, 1995). Isso pode ser relevante para sua função como uma barreira contra patógenos (Wrattall & Suttmöller, 1998). Stringfellow & Givens (2000) afirmam não haver nenhum patógeno viral capaz de penetrar na ZP de oócitos, zigotos e embriões bovinos após a exposição artificial ao vírus.

A zona pelúcida de embriões produzidos *in vitro* tem diferenças significativas na estrutura físico-química, devido ao longo tempo de incubação a temperaturas em torno de 39°C, às forças

eletrostáticas e à composição do meio de cultura, (Bielaski & Jordan, 1996), e apresenta sensibilidade a pronase (Pollard & Leibo, 1993). Portanto espera-se maior potencial para infecção em relação aos embriões produzidos *in vivo*.

Bowen (1979), Singh *et al.* (1982), Potter *et al.*, (1984), Hare (1985), Bielanski *et al.* (1987; 1993), Gillespie *et al.* (1990) Bielanski & Loewen (1994), Bielaski & Dubuc (1995; 1993), Stringfellow *et al.* (1997), Vanroose *et al.* (1999; 2000), Stringfellow & Givens (2000) afirmam que o vírus da IBR não penetra na ZP intacta. Contudo pode replicar em embriões sem ZP (Bielanski *et al.*, 1987; Bowen, 1985).

4. Material e métodos:

4.1. Local e período do experimento:

O experimento foi realizado em três diferentes fazendas: Fazenda 1 no município de Coronel Pacheco, com altitude de 484 metros, temperatura média de 21°C e média pluvial anual de 1581mm³; Fazenda 2, no município de Valença no Rio de Janeiro, com altitude de 434 metros, temperatura média de 19°C e média pluvial anual de 1325mm³ e Fazenda 3 no município de Pedro Leopoldo com altitude de 710 metros, temperatura média de 20,9°C e média pluvial anual de 1328,7mm³.

Os animais dos três rebanhos alimentam-se basicamente a pasto com suplementação mineral.

O experimento foi realizado no período de agosto a dezembro de 2006, com 2 testes sorológicos e uma punção folicular por animal.

4.2. Seleção dos animais e coletas dos dados:

Para a seleção dos animais a serem puncionados, foram coletadas amostras sanguíneas de animais pertencentes aos três rebanhos. As amostras sanguíneas foram coletadas com tubos a vácuo e agulhas múltiplas, dessoradas e acondicionadas em criotubos plásticos devidamente identificados e conservadas a -20°C até a realização dos testes laboratoriais, conforme preconizado por Thrusfield (1999).

Os animais selecionados (38 positivos e 8 negativos) tiveram, no momento da aspiração folicular, suas populações foliculares quantificadas assim como o tamanho do maior folículo, presença de corpo lúteo, e presença de sintomas clínicos das doenças, além da coleta de nova amostra sanguínea.

4.3. Processamento das amostras sanguíneas para pesquisa de IBR:

O diagnóstico sorológico de IBR foi realizado pela prova de soroneutralização em microplacas, segundo metodologia proposta por "Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines" (OIE, 1992) e o protocolo seguido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Governo Brasileiro.

Os soros foram inativados a 56°C por 30 minutos, diluídos a 1:2 em meio essencial mínimo (MEM) e homogeneizados até diluição final de 1:256. A amostra viral utilizada foi a cepa de referência IBR Colorado 1 (ATCC, VR-864) com títulos de 10^{6,5} em 50µl. As microplacas com a mistura soro-vírus foram incubadas 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂, e após esse período, adicionou-se a cada cavidade 50µl de uma suspensão de células de rim bovino (MDBK), contendo 3x10⁵ células/mL, as quais foram incubadas nas mesmas condições anteriores, por 72 horas. A leitura foi realizada em microscópio invertido, para visualização do efeito citopático. Foram consideradas positivas as amostras que neutralizaram 50% das cavidades, calculadas conforme o método de Reed & Muench (1938). Paralelamente foram realizados controles da suspensão celular, da titulação do vírus, da amostra de soro padrão positivo com títulos previamente determinados e do soro padrão negativo. Títulos maiores ou iguais a 4 foram considerados positivos.

4.4. Aspiração folicular e coleta de amostras:

A punção folicular (OPU) foi realizada segundo Bols (2005). Foi utilizado um aparelho de ultrassom (Scanner 200s, Pie Medical, The Netherland) equipado com uma probe transvaginal de 7,5 MHz, circuitos de silicone, agulhas 40x10 (19 G) e bomba de vácuo regulada com pressão de aspiração de 12

mL/min. Para lavagem do conteúdo aspirado foram utilizados filtros Nutricell®, com malha de 80µm de diâmetro. O conteúdo do aspirado folicular foi transferido para placas de petri estéreis, nas quais os oócitos foram identificados e classificados. Os circuitos, as placas e os filtros utilizados eram estéreis e trocados para cada animal.

Para a coleta e processamento das amostras foi utilizado o meio DPBS acrescido de heparina na proporção de 100µL para 40 mL de solução.

As amostras retiradas foram armazenadas da seguinte forma:

- Líquido folicular puro: para a obtenção do líquido folicular puro foi realizada a aspiração individual do maior folículo de cada animal, com circuito e tubo falcon novos (estéreis e lacrados) para que não houvesse contaminação do líquido folicular. O líquido extraído foi centrifugado em 2500 rpm por 20 minutos, para a separação de células, e o sobrenadante pipetado e armazenado em nitrogênio líquido para pesquisa dos vírus.
- Complexos *cumulus*-oócito aspirados: após a retirada do maior folículo, os animais tiveram seus folículos visíveis puncionados. Os complexos *cumulus*-oócito recolhidos foram avaliados e classificados em viáveis e inviáveis, sendo os primeiros com ooplasma homogêneo circundados por uma multi-camada compacta de revestimento do *cumulus*. Quanto menos compacta eram as células do *cumulus* e mais irregular o citoplasma menor a qualidade (Bols *et al.*, 2005), portanto, estes oócitos foram classificados como inviáveis. Posteriormente os oócitos foram armazenados em nitrogênio líquido.

4.4.1. Processamento do material aspirado:

Para a pesquisa dos vírus no material aspirado, foi utilizada a técnica de PCR

4.4.2. Extração de DNA:

Para a extração do DNA foi utilizado o Kit de Extração de DNA (KIT BIOLOGICAL INDUSTRIES) da Biosystems®.

Após a extração, o material foi catalogado e acondicionado em freezer -20°C.

4.4.3. Análise por PCR:

O par de primers utilizados no trabalho, bem como as condições de amplificação foram descritos segundo (Alegre *et al.* 2001). A reação da PCR foi realizada em um volume de 50 µL, contendo 10 µL de DNA, 10 mM de Tris HCL pH 9,0; 1,5 mM de MgCl₂, 200µM de cada nucleotídeo (dNTPs), 5% de glicerol, 2,5 U da enzima *Taq* DNA polimerase e 50 pmol de cada um dos *primers sense* e *antisense*, respectivamente *primer 1* (P1: 5'-AGACCCAGTTGTGATGAATGC-3');) e *primer 2* (P2: 5'-ACACGTCCAGCACGAACACC-3') que amplificam o fragmento de 183 pares de base (pb) do gene da timinas kinasegB do BoHV-1. As amostras foram inicialmente desnaturadas a 95°C por 5 minutos. A reação de amplificação foi feita com 35 ciclos repetidos de desnaturação (95°C por 5 minutos), hibridização (57° C por 1 minuto) e extensão (72° C por 1 minuto e 30 segundos) e uma extensão final de 10 minutos a 72° C. Como controles negativos foram utilizadas a mistura dos reagentes e água milliQ sem adição de DNA e uma amostra de um animal sabidamente que não teve contato com o vírus da IBR.

Os fragmentos amplificados foram analisados através de eletroforese em cuba horizontal, em gel de agarose 1% imerso em tampão Tris-Borato-EDTA (0,045M Tris-borato, 1mM EDTA, pH 7,2) e a uma voltagem adequada às dimensões do gel (1 a 10V/cm de gel). A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada através de transiluminação do gel em luz ultravioleta, após corá-lo em solução de brometo de etídeo a uma concentração final de 0,5µL/mL (Sambrook *et al.*, 1989). As dimensões dos amplificados foram comparadas a um padrão disposto no gel juntamente com as amostras analisadas, a cada corrida eletroforética.

4.4.4. Controle da técnica:

Para avaliação da sensibilidade analítica da PCR, foram utilizadas amostras de líquido folicular e

oócitos de 8 animais negativos sorologicamente. As amostras foram artificialmente infectadas com a cepa de referência IBR Colorado 1 (ATCC, VR-864) com títulos de $10^{6.5}$ em 50 μ l. As amostras infectadas apresentaram resultado positivo para o PCR, comprovando a sensibilidade do teste.

5. Resultados:

O resultado da sensibilidade analítica da Reação em Cadeia pela Polimerase em oócitos e líquido folicular foi de $10^{0.5}$ TCID (figura 1).

O resultado da OPU estão apresentados na tabela 1:

Tabela 1. Resultado da OPU das vacas negativas:

Animal	Avaliação ginecológica	Viáveis	Inviáveis
213	DF8(8)EF10(5)	2	7
216	DF(5)EF10(16)	6	12
221	DF9(4)EF12(6)	7	0
251	DCLF10(4)EF(3)	3	2
252	DF10(4)EF(5)	3	4
266	DCLF15(5)EF(9)	4	6
285	DF12(2)EF(4)	0	6
387	DF12(5)EF15(7)	4	6
445	DCLF(10)EF15(12)	9	8

Legenda: D= ovário direito, E= ovário esquerdo, CL= corpo lúteo, F= foliculos visualizados, (n°)= n°de foliculos visualizados, n° (ex: F10)= tamanho do maior foliculo em milímetros.

Tabela 2. Animais aspirados fazenda 2:

Animal	IBR 08/09/2006	IBR 20/12/2006 (punção)
4	1/16	1/16
469	1/4	1/256
1165	1/32	1/16
1930	1/16	1/4
6890	1/16	1/32
6916	1/8	1/32
7704	1/16	1/64
7705	1/16	1/4
7726	1/16	1/64
7780	1/8	1/8
7789	1/16	1/128
7794	1/4	1/16
8824	1/16	1/16

Tabela 3. Animais positivos para IBR aspirados na fazenda 3:

Animal	IBR 28/07/2006	IBR 11/09/2006 (Punção)
18	1/256	1/256
19	1/128	1/128
51	1/64	1/32
78	1/4	1/8
118	1/4	1/4
146	1/128	1/128
207	1/8	1/16
251	1/256	1/256
396	1/256	1/256
517	1/4	1/8

Tabela 4. Resultado sorológico dos animais aspirado na fazenda 1:

Animal	IBR 11/09/2006	IBR 21/12/2006 (Punção)
2732	1/64	1/128
2449	1/256	1/256
2896	1/32	1/16
5856	1/64	1/64
7697	1/16	1/8
7816	1/256	1/256
8651	1/8	1/16
8854	1/8	1/4
2828	1/16	1/64
2844	1/16	1/64
2874	1/256	1/128
2875	1/64	1/128
4366	1/64	1/128
6432	1/128	1/128
8810	1/64	1/64

Tabela 5. Avaliação ginecológica e recuperação de oócitos no fazenda 1:

Animal	avaliação ginecológica	viáveis	Inviáveis
2732	DF14(12)EF(8)	6	10
2449	DCLF10(10)EF(12)	12	14
2896	DCLF(6)EF10(5)	3	4
5856	DF9(5)Endn	2	2
7697	DCLF(4)EF(3)	2	3
7816	DF(4)EF10(7)	5	4
8651	DF28EF(12)	4	5
8854	DF30EF26(8)	2	3
2828	DF10(5)EF(4)	4	3
2844	DF(7)EF12(8)	5	8
2874	DF(4)EF10(7)	2	4
2875	DF14(12)EF(8)	7	6
4366	DCLF(6)EF12(5)	3	5

Legenda: D= ovário direito, E= ovário esquerdo, CL= corpo lúteo, F= folículos visualizados, (n°)= n°de folículos visualizados, n° (ex: F10)= tamanho do maior folículo em milímetros.

Tabela 6. Avaliação ginecológica e recuperação de oócitos na Fazenda 3:

Animal	avaliação ginecológica	viáveis	Inviáveis
18	DCLF15(3)EF(2)	1	3
19	DCL(6)EF10(8)	5	3
51	DCLF10(12)EF(4)	6	11
78	DF8(4)ECL(2)	3	2
118	DF15(2)EF4	2	5
146	DDF(4)Ends	0	3
207	DCLF10(5)EF9(7)		1
251	DCLF10(4)EF(3)	3	2
517	DndnECL16(3)	3	5

Legenda: D= ovário direito, E= ovário esquerdo, CL= corpo lúteo, F= folículos visualizados, (n°)= n°de folículos visualizados, n° (ex: F10)= tamanho do maior folículo em milímetros.

Tabela 7. Avaliação ginecológica e recuperação de oócitos no CESM

Animal	avaliação ginecológica	viáveis	Inviáveis
4	DF(9)EF25(8)	6	4
469	DCLF12(9)EF(12)	7	3
1165	DF(2)EF(3)	0	1
1930	DF15(10)Endn	4	3
6890	DCLF(13)EF(6)	7	4
6916	DF27,32 EF(8)	3	2
7704	DF(4)EF10(3)	2	3
7705	DCLF20(15) EF(12)	15	7
7726	DCLF10(10)EF(8)	5	6
7780	DCLF40(12)EF(15)	8	9
7789	EF30(4) DF(7)	2	4
7794	DCLRF10(8) EF(10)	5	6
8824	DCLF(10)EF10(2)	7	2

Legenda: D= ovário direito, E= ovário esquerdo, CL= corpo lúteo, F= folículos visualizados, (n°)= n°de folículos visualizados, n° (ex: F10)= tamanho do maior folículo em milímetros.

6. Discussão:

O presente trabalho foi conduzido objetivando avaliar a possibilidade da existência de DNA viral nos complexos *cumulus*-oócito e líquidos foliculares.

Os resultados sorológicos dos animais utilizados caracterizam uma infecção antiga, pois na sorologia pareada, não se observou um aumento significativo (4 vezes) dos títulos para IBR, o que pode ser observado nas tabelas 2, 3 e 4.

Os animais submetidos a OPU não apresentavam no momento da punção, alterações patológicas nos órgãos reprodutivos e sintomas clínicos da doença. A grande variação no número de folículos visualizados, o tamanho do maior folículo e a presença ou não do corpo lúteo pode ser devido a fatores individuais e a não sincronização dos animais, como observado nas tabelas 5, 6, 7. A qualidade dos oócitos está relacionada com a fase do ciclo estral, devido o estabelecimento da dominância entre os folículos além de fatores genéticos, físicos, químicos e patológicos que podem ser de origem endógena; alterações metabólicas e hormonais ou também ser de origem exógena.

Existe uma grande variação individual no número e na qualidade de complexos *cumulus*-oócito obtidos por aspiração. O desenho experimental do estudo não permite a avaliação individual das doadoras na relação entre o número e a qualidade dos complexos *cumulus*-oócitos, e a interferência do título viral. Para tanto, seriam necessárias punções ovarianas sucessivas, sincronização das doadoras e a obtenção sistemática dos títulos virais.

Todas as amostras colhidas dos complexos *cumulus*-oócito viáveis, inviáveis e LF apresentaram-se negativas para a PCR.

Os resultados obtidos pela PCR são semelhantes aos observados por Vanroose *et al.* (1997; 1998), Bielanski & Dubuc (1993), Gillespie *et al.* (1990), Singh *et al.* (1982) e Stringfellow *et al.* (1990), nos quais oócitos com zona pelúcida intacta e embriões de até 4 células são refratários à infecção por BHV-1, exceto quando micromanipulados (Bielanski *et al.*, 1987).

O mecanismo que impede a replicação viral em oócitos e embriões jovens não está totalmente

elucidado, porém, especula-se que a replicação ocorra no momento em que começa a síntese do RNA ribossomal, proteínas e partículas virais são produzidas após a formação dos ribossomas. Barnes & First (1991) detectaram que o início da síntese de tais proteínas acontece em embriões de 8 a 16 células.

De toda forma oócitos viáveis para entrarem em um sistema PIV devem possuir a ZP intacta, o ooplasma homogêneo circundado por uma multicamada compacta de revestimento do *cumulus*, (Bols *et al.*, 2005). Tsuboi *et al.* (1992) afirmam que o vírus replica em oócitos foliculares com células do *cumulus*, mas não em oócitos desnudos e realiza a detecção de anticorpos por imunofluorescência indireta nas células do *cumulus*. Em oócitos maturados em meio de cultura artificialmente infectado com o vírus foram encontrados efeitos citopáticos nas células do *cumulus* entre 1 e 3 dias após a maturação (Vanroose *et al.*, 1999). Como, ao contrário da produção *in vivo* de embriões na produção *in vitro*, oócitos maturados ainda estão circundados pelas células do *cumulus*, e não possuem glicoproteínas adicionais produzidas pelas células do oviduto aderidas na ZP, aumenta-se os riscos de ocorrerem efeito citopático nos embriões bovinos.

Considerando que o desenvolvimento embrionário seja afetado pela ação do vírus sobre as células do *cumulus*, o vírus teria efeito na maturação do COC impossibilitando a fertilização e a transmissão viral através da transferência de embriões.

Na literatura consultada os complexos *cumulus*-oócitos e as amostras de líquido folicular pesquisadas para o vírus foram obtidas de animais artificialmente infectados provocando uma infecção aguda ou foram infectados em placas com títulos virais muito altos (Bielanski & Dubuc, 1993 e 1995; Bielanski & Loewen, 1994; Bielanski *et al.*, 1993; Stringfellow & Givens, 2000), ao contrário do presente estudo, realizado com animais naturalmente infectados em condições de pouco estresse. Segundo Singh *et al.* (1986) é muito improvável que este grau de infectividade seja encontrada em animais naturalmente infectados. Gerin *et al.* (1997) acrescenta demonstrando que a fase aguda da doença associada com a excreção viral e infecção dos tecidos reprodutivos em animais infectados sob condições naturais é extremamente curta.

Thibier & Nibart (1987) utilizando uma abordagem *in vivo-in vivo*, transferindo embriões *in vivo* de animais sorologicamente positivos para IBR não encontrou nenhum produto positivo. Além das receptoras não se tornarem positivas, as taxas de prenhez não diferiram daquelas com embriões de vacas negativas. Com resultados semelhantes, Stringfellow & Givens (1999) pesquisou o risco de transmissão da doença através da transferência de embriões tratados com tripsina provenientes de animais naturalmente e artificialmente infectados pelo monitoramento das receptoras e animais nascidos repetindo os resultados encontrados por Thibier & Nibart (1987).

É improvável que embriões transmitam doenças, se procedimentos adequados de lavagens, tratamentos com tripsina, uso de antibióticos no meio, controle adequado dos produtos biológicos (soro ou soroalbumina) e a avaliação dos embriões forem realizados em concordância com as recomendações da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões, (Stringfellow & Wrathall, 1995).

Bielanski (1998) afirma que um resultado negativo não significa que a dose mínima do agente exigida para a transmissão do agente não esteja lá. Alternativamente o agente pode estar presente em níveis tão baixos que podem ser removidos totalmente, ou a concentração seja abaixo do nível infectante.

Paralelamente, Smutmöller & Wrathall (1995) utilizando a metodologia de passagens por cenário na avaliação quantitativa de riscos associados com a importação e de animais ou produtos animais, avaliam o risco em 3 níveis, sendo o primeiro nível relacionado à situação da doença no país exportador, o segundo dependente do uso de padrões internacionalmente aceitos de manipulação e processamento de embriões e o terceiro relacionado à vigilância pós-coleta das doadoras e fazendas doadoras.

Como um embrião negativo pode ser oriundo de um animal ou um rebanho positivo, a importação e exportação de gametas e embriões apenas poderão acontecer após serem testados sorologicamente, com exames de alta sensibilidade e especificidade, quanto às doadoras devem ser realizados testes de triagem

(quando possível), ou por amostragem os rebanhos envolvidos.

Os embriões produzidos *in vitro* apresentam maiores taxas de mortalidade que os embriões produzidos *in vivo*, portanto grande parte do sucesso da transferência de embriões FIV se deve à saúde das receptoras. Animais saudáveis e livres de doenças infecciosas, em especial às que atuam direta ou indiretamente nos órgãos reprodutivos, são fundamentais para a obtenção de boas taxas de gestação.

Além de agregar valor aos animais nascidos, a transferência de embriões é uma biotecnologia que promove uma grande difusão de material genético de alta qualidade além de se apresentar bastante segura do ponto de vista sanitário.

7. Conclusão:

O risco de transmissão do BHV-1 através de COCs e LFs provenientes de animais sorologicamente positivos e que não apresentam sintomatologia clínica da doença pode ser considerado irrelevante.

Os animais sorologicamente positivos para BHV-1 produziram complexos *cumulus*-oócito negativos indicando que a triagem da doença em gametas não é satisfatória.

8. Referências bibliográficas:

ALEGRE M., NANNI M, FONDEVILA N. Development of a Multiplex Polymerase Chain Reaction for the Differentiation of Bovine Herpesvirus-1 and - and -5. *J. Vet. Med. B*, vol.48, .613-621, 2001.

BARNES, F., FIRST, N. Embryonic transcription in *in vitro* culture cultured bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, vol. 29, 117-123, 1991.

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

- BIELANSKI, A., DUBUC C. *In vitro* fertilization of ova from cows experimentally infected with a noncytopathic strain of bovine viral diarrhoea virus (BVDV). *Anim Reprod Sci*, vol. 38, 215-221, 1995.
- BIELANSKI, A., DUBUC, C. *In vitro* fertilization of bovine oocytes exposed to bovine herpesvirus 1 (BHV-1). *Reprod. Dom. Anim.*, vol. 28, 285-288, 1993.
- BIELANSKI, A., JORDAN, L. Washing or washing and trypsin treatment is ineffective for removal of noncytopathic bovine viral diarrhoea virus from bovine oocytes or embryos after experimental viral contamination of an *in vitro* fertilization system. *Theriogenology*, vol. 46, 1467-1476, 1996.
- BIELANSKI, A., LOEWEN, K. *In vitro* fertilization of bovine oocytes with semen from bulls persistently infected with bovine diarrhoea virus. *Anim Reprod Sci*, vol. 35, 183-189, 1994.
- BIELANSKI, A., LOEWEN, K.S., DEL CAMPO, M.R., SIRARD, M.A., WILLADSEN, S.M. Isolation of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) from embryos produced by *in vitro* fertilization. *Theriogenology*, vol. 40, 531-538, 1993.
- BIELANSKI, A.; SINGH, L. HARE, W.C.D. The exposure to bovine rhinotracheitis virus of zona pellucida micromanipulated bovine embryos with the zona pellucida damaged or removed. *Theriogenology*, vol. 28, 495-501, 1987.
- BOLS, P.E.J.; LEROY J.L.M.R.; VIANA, J.H.M. Aspectos técnicos e biológicos na recuperação de oócitos via trans-vaginal guiada por ultra-som em vacas. *Actae Scientiae Veterinariae*. 33 (Supl 1), 2005.
- BONI, R.; ROELOFSEN, M. W. M.; PIETERSE, M. C.; KOGUT, J.; KRUIP, T. A. M. Follicular dynamics, repeatability and predictability of f_p follicular recruitment in cows -undergoing repeat follicular puncture. *Theriogenology*, vol.48, 277-289, 1997.
- BOTELHO, R.G.A. *Desenvolvimento de testes de PCR para BoHV-5 e sua aplicação no diagnóstico de casos clínicos*. 2000. 38f Dissertação (mestrado), Escola de veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; MORIN, N.; BRISSON, C.; CARBONEAU, G. DUROCHER, J. *In vitro* embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. *Theriogenology*, v.51, 59-70, 1999.
- BOWEN, R.A. Viral infections of mammalian preimplantation embryos. *Theriogenology*, vol.11, 5-15, 1979.
- BOWEN, R.A., ELDSSEN, R.P., SEIDEL, G.E. Infection of early bovine embryos with Bovine Herpes virus-1. *Am J Vet Res*, vol. 46, 1095-1097, 1985.
- BROCK, K.V. Quality control for materials of animals origin use in embryo production and transfer. In: STRINFELLOW DA, SEIDEL SM (eds), *Manual of the International Embryo Transfer Society*, 3rd. Savoy, IL: IETS, 135-140, 1998.
- BUTEL, J.S. Microbiologia médica de Jawetz. *Editorial EL Manual Moderno*. S.A. de C.V. México, D.F. 1992, cap.35, p.346-364.
- CANANT, J.C. Dianosis of the cause of bovine abortion. part 1. *Mod. Vet. Pract.*, vol.65, n.12, 929-931, 1984.
- CANANT, J.C. Dianosis of the cause of bovine abortion. part 2. *Mod. Vet. Pract.*, vol.66, n.1, p.47-40. 1985.
- CAROLAN, C., LONERGAN, P., VAN LANGENDONCKT, A., MERMILLOD, P. Factors affecting bovine embryo development in a synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Theriogenology*, vol. 43: 1115-1128, 1995.
- CHISTIANSOON, W.T. Stillbirths, mummies, abortions, and early embryonic death. *Vet. Clin. North and Am.*, vol. 8: 623-639, 1992.
- ENGELS, M., ACKERMAN, M. Pathogenesis of ruminants pestivirus infections. *Vet. Microbiol*, vol.53, p. 3-15, 1996.

- EVANS, B.R. Considerações práticas e éticas sobre a certificação e o comércio internacional de embriões. In: STRINFELLOW, D.A., SEIDEL, S.M. *Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões*, 3^{ed} 1999, 2-7.
- FRANCSOVITS, P., BARANYAI, B., BODO, S., DINNYÉS, A., DOHY, J. Comparison of defined embryo culture systems in cattle. *Theriogenology*, vol. 49, 199, 1998.
- GERIN, B., GUIENNE, B., CHAFFAUX, St., HARLEY, T., ALLIETA, 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). *Rec. Med.Vet.*, vol. 165-827-833, 1989.
- GERIN, B., NIBART, M., MARQUANT, LE-GUIENNE., HUMBLLOT, P. Sanitary risks related to embryo transfer in domestic species. *Theriogenology*, vol. 47, 33-42, 1997.
- GILLESPIE, J., SCHLAFER, D., FOOTE, R., QUICK, S. DOUGHERTY, E., SCHIFF, E., ALLEN, S. Comparison of persistence of seven bovine viruses on bovine embryos following *in vitro* exposure. *Dtsch Tierä Wschr*, vol. 97, 65-68, 1990.
- GUSTAFSON, D.P. Herpesvirus disease of mammals and birds: comparative aspects and diagnosis. In: *Comparative diagnosis of viral disease*. 1981, New York, Academic Press, New York, 1981, 76-97.
- GWATKIN, R.B.L. Passage of Meningovirus through the zona pellucida of the mouse morula. *J Reprod Fert.*, vol. 13, 577-578, 1967.
- HARE, W.C.D. Design and analysis of research on infectious diseases transmission by embryos. *Theriogenology*, vol 33, 51-57, 1990.
- HARE, W.C.D. Diseases transmissible by semen and embryo transfer techniques. *Office International des Epizooties Serie Thechnique*, Paris. 1985; 4: 1-83.
- KAHRS, R.F. Infectious bovine rhinotracheitis a review and update. *J. Am. Vet. Med.*, vol.171, n. 12, 1055-1064, 1977.
- KIRKBRIDE, C.A. Managing an outbreak of livestock-2: diagnosis and control of bovine abortion. *Vet. Med.*, vol. 80, n.5, 70-79, 1985.
- LAGE, A.P. Aspectos sanitários em doadoras e receptoras de embriões bovinos. *Rev. Bras. Reprod Anim*, v. 23, n.4, 539-549, out./dez., 1999.
- LEITE, R.C. Controle da diarréia bovina a vírus (BVD) e rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR). *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.23, n.4, 531-535, 1999.
- MAPLETOFT, R.J., STOOKEY, J.M. General sanitary procedures and welfare considerations associated with in-vivo-production of embryos. In: STRINFELLOW D.A., SEIDEL S.M. (eds), *Manual of the International Embryo Transfer Society*, 3^{ed}. Savoy, IL: IETS, 55-66, 1998.
- McGARRITY, G.J. Detection and contamination. In: JAKOBY, W.B., PASTAN, I.H. (eds), *Methods in Enzymology*, vol. LVIII. New York: Academic Press, New York, 18-29. 1979.
- McLEOD, C., ANDERSON, D.W.J., KRATZ, W. Preparation of foetal calf serum for use in tissue culture. *J. Biol. Stand.*, vol. 8, 263-270, 1980.
- MILLER J.M., VAN DER MAATEN M.J. Experimentais induced infectious bovine rhinotracheitis virus infection during early pregnancy: Effect on the bovine corpus luteum and conceptus. *Am. J. Vet. Res.*, vol. 47, 223-228, 1986.
- MILLER, J.M. The effects of IBR virus infection on reproductive function of cattle. *Vet. Med.*, vol. 86: 95-98, 1991.
- NIBART, M., MARQUANT-LE GUIENNE, B., HUMBLLOT, P. General sanitary procedures associated with *in vitro* production of embryos. In: STRINFELLOW DA, SEIDEL SM (eds), *Manual of the International Embryo Transfer Society*, 3^{ed}. Savoy, IL: IETS, 67-76, 1998.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. *Manual of Standards for diagnostic test and vaccines*. (O.I.E). Paris, France. 2 ed. 783 p., 1992.

- OKASAKI, K., HONDA, E., KONO, Y. Heparin-binding of bovid herpesvirus 1 glycoprotein III. *Arch Virol*, vol. 134, 413-419, 1994.
- OLASCOAGA, C.R. Diagnóstico serológico de la brucelosis. *Zoonosis*, vol. 18, p.101-141, 1976.
- OLIVEIRA JÚNIOR, A.C. *Influência climática e de doenças infecciosas na eficiência reprodutiva de um rebanho de corte mestiço zebu no extremo sul da Bahia*. Dissertação (mestrado), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 2005, Belo Horizonte.
- PHILPOT, M. The dangers of disease transmission by artificial insemination by Embryo Transfer. *Br. Vet. J.*, vol. 149, 339-369, 1993.
- PIETERSE, M. C.; VOS, P.L.A.M.; KRUIP, T.A.M.; WURTH, Y.A.; BENEDEN, Th.H.; WILLEMSE, A.H.; TAVERNE, M.A.M. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology*, vol.35, 19-24, 1991 a.
- PIETERSE, M. C.; VOS, P.L.A.M.; KRUIP, T.A.M.; WURTH, Y.A.; BENEDEN, Th.H.; WILLEMSE, A.H.; TAVERNE, M.A.M. Characteristics of bovine estrous cycles during repeat transvaginal ultrasound guided puncturing of follicles for ovum pick-up. *Theriogenology*, vol.35, 401-413, 1991 b.
- PITUCO, E.M. *Ocorrência da Rinotraqueíte Infecciosa dos Bovinos / Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IBR/IPV) em rebanhos criados no estado de São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná, Minas Gerais*. Dissertação (doutorado em patologia bovina) Faculdade de medicina veterinária e zootecnia, 1988, São Paulo.
- POLARD, J., LEIBO, S. Comparative cryobiology of *in vitro* and *in vivo* derived bovine embryos. *Theriogenology*, vol. 39, 287 1993.
- POTTER, M.L., CORSTVET, R.E., LOONEY, C.C.R., FULTON, R.W., ARCHBALD, L.F., GODKE, R.A. Evaluation of bovine viral diarrhoea virus uptake by preimplantation embryos. *Am J Vet Res*, vol. 45, 1778-1780, 1984.
- PUTNEY, D.J., DROST, M., THATCHER, W.W. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposure to elevated ambient temperatures between days 1 to 7 post insemination. *Theriogenology*, vol. 30, 195-209, 1988.
- REED, L.J.; MÜENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *The Am. J. Hygien.*, vol.27, n.3, 493-497, 1938.
- ROCHA, M.A.. GOUVEIA, A.M.G., LEITE, R.C. *Pesquisa de anticorpos anti IBR em soro de touros de uma central de inseminação*. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 1994, Olinda. Anais... Recife, PE: Sociedade Pernambucana de Medicina Veterinária, 1994; 656f, 213.
- ROECHE, P.M., TEIXEIRA, M.B., ESTEVES, P.A., MELO, S.V, et al. Situação do BHV-1 e BHV-5 no Brasil. In: *Simpósio Internacional sobre Herpesvírus Bovino (tipo 1 e 5) e vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV)*, 1998; Santa Maria. Anais... Santa Maria, RS, 1998; 89-96.
- SAMBROOCK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 2^{ed}. Edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, United States.
- SCHIEWE, M.C. General hygiene and quality control practices in an embryo-production laboratory. In: STRINFELLOW DA, SEIDEL SM (eds), *Manual of the International Embryo Transfer Society*, 3^{ed}. Savoy, IL: IETS, 93-102, 1998.
- SINGH, E.L., McVICAR, J.W., HARE, W.C.D., MEBUS, C.A. Embryo transfer as a mean of controlling the transmission of viral infections. VII. The *in vitro* exposure of bovine and porcine embryos to foot-and-mouth disease virus. *Theriogenology*, vol.26, 587-593, 1986.
- SINGH, E.L., THOMAS, F.C., PAPP-VID, G., EAGLESOME, M.D., HARE, W.C.D. Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. The *in vitro* exposure of pre implantation bovine embryos to infectious bovine rhinotracheitis virus. *Theriogenology*, vol. 18, 133-140, 1982.

- STRINFELLOW, D.A., RIDDELL, K.P., BROCK, K.V., RIDELL, M.G., GALIK, P.K., WRIGHT, J.C., HASLER, J.F. *In vitro* fertilization and *in vitro* culture of bovine embryos in the presence of noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Theriogenology*, vol. 46,382, 1997.
- STRINGFELLOW, D.A., GIVENS, M.D. Infectious agents in bovine embryo production: Hazards and Solutions. *Theriogenology*, vol. 53, 85-94, 2000.
- STRINGFELLOW, D.A., GIVENS, M.D. Preventing disease transmission through the transfer of in-vivo-derived bovine embryos. *Livest. Prod. Sci.* 1999, in press.
- STRINGFELLOW, D.A., LAUWERMAN, L.H., NASTI, K.B., GALIK, P.K. Trypsin treatment of bovine embryos after *in vitro* exposure to infectious bovine rhinotracheitis virus or bovine herpesvirus-4. *Theriogenology*, vol. 34, 427-433, 1990.
- STRINGFELLOW, D.A., WRATHALL, A.E. Epidemiological implications of the production and transfer of IVF embryos. *Theriogenology*, vol. 43: 89-96, 1995.
- STUMÖLLER, P & WRATHALL, A. E. A quantitative assessment of the risk of transmission of foot-and-mouth disease, bluetongue and vesicular stomatitis by embryo transfer in cattle. *Prev. Vet. Med.*, vol. 32, 111-132, 1997.
- THERIEN, I., SOUBEYRAND, S., MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma modulating sperm capacitation by high-density lipoprotein. *Biol. Reprod.*, vol. 57: 1080-1088, 1997.
- THIBIER, M., NIBART, M. Disease control and embryos imports. *Theriogenology*, vol. 27, 37-47, 1987.
- THRUSFIELD, M. *Vet. Epi. Cap.* VAN OIRSCHOT, J.T.; *et al.* Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. *Vet. Microbiol.*, vol.64, 169-183, 1999.
- TRYBALA, E., BERGSTROM, T., SPILLMANN, T., SVENNERHOLM, B., FLYNN, S.J., RYAN, P. interaction between pseudorabies virus and heparin/heparan sulfate – pseudorabies virus mutants differ in their interaction with heparin/heparan sulfate when altered for specific glycoprotein c heparin-binding domain. *J Biol Chemistry*, vol. 273. 5047-5052, 1998.
- TSUBOI, T, KANAZAWA, Y, SYOJI, T, TOKUHISA, S. Growth activity of herpesvirus 1 in bovine follicular oocytes with cumulus cells. *J. Vet. Med. Sci.*, vol.54, n.6, 1179-1181, 1992.
- VANROOSE, G., de KRUIF, A., VAN SOOM, A. Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. *Anim, Reprod, Sci.*, vol. 60-61, 131-143. 2000.
- VANROOSE, G., NAUWYNCK, H., VAN SOOM, A., VANOPDENBOSCH, E., DE KRUIF, A. Effect of bovine herpesvirus-1 or bovine viral diarrhoea virus on development of *in vitro*-produced bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, vol. 54, 255-263, 1999.
- VANROOSE, G., NAUWYNCK, H., VAN SOOM, A., VANOPDENBOSCH, E., DE KRUIF, A. Susceptibility of zona-intact and zona-free *in vitro*-produced bovine embryos at different stages of development to infection with bovine herpesvirus –1. *Theriogenology*, vol. 47, 1389-1402, 1997.
- VANROOSE, G., NAUWYNCK, H., VAN SOOM, A., VANOPDENBOSCH, E., DE KRUIF, A. Replication of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus in zona-free and zona-intact *in vitro*-produced embryos and the effect on embryo quality. *Biol Reprod*, vol. 58, 857-866, 1998.