

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

INFLUÊNCIA DO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5 NO
SÊMEN CONGELADO DE BOVINO SOBRE OS
PARÂMETROS ESPERMÁTICOS E
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO *IN VITRO*

Diego Gouvêa de Souza

Médico Veterinário

ARAÇATUBA – SP

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**INFLUÊNCIA DO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5 NO
SÊMEN CONGELADO DE BOVINO SOBRE OS
PARÂMETROS ESPERMÁTICOS E
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO *IN VITRO***

Diego Gouvêa de Souza

Orientadora: Prof^a. Adjunto Tereza Cristina Cardoso

Coorientador: Prof. Adjunto Alicia Martins Júnior

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Câmpus de Araçatuba, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

ARAÇATUBA – SP

2011

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Influência do herpesvírus bovino tipo 5 no sêmen congelado de bovino sobre os parâmetros espermáticos e desenvolvimento embrionário in vitro.

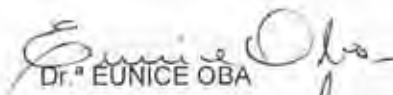
AUTOR: DIEGO GOUVÊA DE SOUZA

ORIENTADOR: Dr. ALICIO MARTINS JÚNIOR (Co-Orientador)

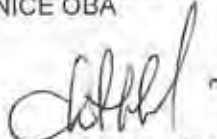
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL (MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E PRODUÇÃO ANIMAL) pela Comissão Examinadora.



Dr.^a FERNANDA DA CRUZ LANDIM E ALVARENGA



Dr.^a EUNICE OBA



Dr. ALICIO MARTINS JÚNIOR

DATA DA REALIZAÇÃO: 29 de março de 2011.



Presidente da Comissão Examinadora
Dr. ALICIO MARTINS JÚNIOR
- Co-Orientador -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

DIEGO GOUVÊA DE SOUZA – nascido em 03 de novembro de 1982, na cidade de Araraquara-SP, formado em Medicina Veterinária pela Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC-Minas) – Poços de Caldas - MG, em 2007. Possui estágio de atualização e treinamento na área de Biotecnologia Aplicada à Reprodução Animal pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – FMVA- Araçatuba – SP. Apresenta um artigo publicado, doze publicações em anais de eventos científicos de âmbito nacional e internacional (resumo), além de participações em congressos (10) e cursos (12).

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”
(Chico Xavier)

DEDICATÓRIA

- À Deus, por estar presente em minha vida em todos os momentos.
- Aos meus pais, familiares, namorada e amigos que de muitas formas me incentivaram e ajudaram para que fosse possível a concretização desta fase da vida.

AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais, José Antonio de Souza, Sandra Regina Gouvêa Fiore e Cesár Augusto Fiore, pela educação, formação e amor que sempre me deram, sendo auxílio fundamental em mais esta fase da minha vida.
- À minha namorada, Sabrina Cruz Tfaile Frasnelli, pelo amor, paciência e apoio incondicional.
- Ao orientador e amigo, Professor Adjunto Alicio Martins Júnior, não só pela orientação e ensinamentos profissionais, mas também pela amizade e sinceridade constantes, digna da minha total admiração pessoal e profissional.
- À Professora Adjunto Tereza Cristina Cardoso, por ter dado a oportunidade e orientação neste trabalho, sem o qual não seria possível sua realização.
- Aos amigos e pós-graduandos, André Maciel Crespilho e Renata Sanches Calegari, pelo suporte técnico, colaborando expressivamente para a realização deste trabalho.
- À amiga Camila Silva-Frade, pelo auxílio no desenvolvimento deste projeto.
- Aos funcionários do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal do Curso de Medicina Veterinária – UNESP – Câmpus de Araçatuba: Martha Pato e Esaú Medeiros da Silva Oliveira.
- À UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, curso de pós-graduação, por proporcionar a oportunidade de realização do presente trabalho.

- À UNESP – *Laboratório de Reprodução Animal* da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, por propiciar a análise computadorizada do sêmen.
- À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	13
1 Infecção de gametas e embriões bovinos pelo BoHV-1 e BoHV-5	13
Referências	19
CAPÍTULO 2	26
Resumo	26
Summary	27
2.1 Introdução	28
2.2 Material e Métodos	29
2.2.1 Preparo dos meios.....	29
2.2.2 Preparação do vírus e da amostra de sêmen.....	30
2.2.3 Coincubação vírus e sêmen e congelação das amostras seminais.	30
2.2.4 Recuperação e detecção do vírus.....	31
2.2.4.1 Recuperação do vírus.....	31
2.2.4.2 Detecção do ácido nucléico viral.....	32
2.2.5 Hibridização <i>in situ</i>	33
2.2.6 Análises do sêmen.....	34
2.2.6.1 Transposição da fosfatidilserina em espermatozóides.....	34
2.2.6.2 Análise computadorizada da motilidade e movimento espermático.....	35
2.2.7 Avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal, e função mitocondrial	35
2.2.8 Análise estatística	36
2.3 Resultados	36
2.4 Discussão	39
2.5 Conclusão	43
2.6 Referências	43
CAPÍTULO 3	50
Resumo	50
Summary	51
3.1 Introdução	52

3.2 Material e Métodos	53
3.2.1 Preparação do vírus e da amostra de sêmen.....	53
3.2.2 Coíncubação vírus e sêmen e congelação das amostras seminais.....	54
3.2.3 Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.....	55
3.2.4 Detecção do vírus.....	56
3.2.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	56
3.2.6 Hibridização <i>in situ</i>	57
3.2.7 Análise estatística.....	59
3.3 Resultados	60
3.3.1 Infecção experimental com BoHV-5.....	60
3.3.2 Desenvolvimento e produção <i>in vitro</i> de embrião.....	60
3.4 Discussão	61
3.5 Conclusão	64
3.6 Referências	64
APÊNDICES	69

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AHL = deslocamento lateral de cabeça

AN = anexina V

BCF = frequência de batimento cruzado

BoHV-5 = *herpesvirus* bovino tipo 5

BoHV-1 = *herpesvirus* bovino tipo 1

BSA = albumina sérica bovina

BVDV = vírus da diarreia viral bovina

CASA = “Computer Assisted *Semen* Analysis”

CIV = cultivo *in vitro*

COC = complexo *cumulus* oócito

CO₂ = dióxido de carbono

Cy3 = *cyanine* 3

DAPI = 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMSO = dimetilsulfóxido

DNA = ácido desoxirribonucléico

FIV = fertilização *in vitro*

FITC = isotiocionato de fluoresceína

FSH = hormônio folículo estimulante

gC = glicoproteína C

HIV = vírus da imunodeficiência humana

hpi = horas pós-inseminação

IETS = “International Embryo Transfer Society”

JC-1 = iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarbocianina

ISH = hibridização *in situ*

LH = hormônio luteinizante

LIN = linearidade

MDBK = “Madin Darby Bovine Kidney”

MEM = “minimum essential medium”

MgCl₂ = cloreto de magnésio
MIV = maturação *in vitro*
MM = meio de maturação
MP = motilidade progressiva
MT = motilidade total
pb = pares de base
PBS = tampão fosfato salina
PCR = reação em cadeia da polimerase
PHE = penicilamina, hipotaurina e epinefrina
PI = iodeto de propídio
PIV = produção *in vitro*
PS = fosfatidilserina
PSA = *Pisum sativum*
RAP = espermatozóides rápidos
RNA = ácido ribonucléico
SFB = soro fetal bovino
SOF = “synthetic oviduct fluid”
SPTZ = espermatozóide
SSC = solução citrato salina
STR = retilinearidade
TALP = Tyrode’s albumina lactato e piruvato
TCID = “tissue culture infective dose”
TCM = “tissue culture médium”
TE = transferência de embriões
UV = ultravioleta
VAP = velocidade média
VCL = velocidade curvilínea
VSL = velocidade progressiva
ZP = zona pelúcida
w/v = weight/volume (peso/volume)

INFLUÊNCIA DO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5 NO SÊMEN CONGELADO DE BOVINO SOBRE OS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO *IN VITRO*

RESUMO – Este estudo foi delineado com objetivo de verificar os efeitos da exposição experimental do sêmen fresco bovino ao BoHV-5, previamente à congelação, através de análises *in vitro* e de produção de embriões. Os seguintes testes foram avaliados no Grupo I (sêmen não exposto ao vírus) e II (sêmen exposto ao vírus): motilidade e movimento espermático, através de análise computadorizada, integridade da membrana plasmática/acrossomal (IMPA) e função mitocondrial (FM), utilizando sondas fluorescentes, translocação da fosfatidilserina (PS) na membrana do espermatozóide, com Anexina-V, desenvolvimento embrionário *in vitro*, evidenciado pela proporção de embriões gerados, detecção viral em espermatozóides e embriões, através do emprego da técnica de hibridização *in situ* (ISH) e PCR. Nenhuma diferença significativa foi observada para IMPA e FM entre os grupos. Entretanto, resultados da translocação da PS no Grupo II foram significativamente diferentes ($P=0,00005$) dos encontrados no Grupo I; valores maiores ($P<0,05$) para velocidade média (VAP), velocidade curvilínea (VCL) e amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) e menores para a retilinearidade (STR) e linearidade (LIN) foram obtidos no Grupo II quando comparados com o Grupo I. Concluindo, a ISH revelou a presença de DNA viral nos espermatozóides e embriões infectados; além disso, o BoHV-5 levou à alterações funcional e morfológica nos espermatozóides, sem comprometer o desenvolvimento embrionário, mesmo após ser carregado para os embriões, através da infecção dos oócitos na fertilização *in vitro*.

Palavras-chave: BoHV-5; preservação do sêmen; motilidade espermática; hibridização *in situ* fluorescente; desenvolvimento embrionário.

INFLUENCE OF BOVINE *HERPESVIRUS* TYPE 5 IN FROZEN BOVINE SEMEN ON THE SPERM PARAMETERS AND IN VITRO EMBRYONIC DEVELOPMENT

SUMMARY – This study was designed to verify the effects of experimental exposure of fresh bull semen to BoHV-5, previously to the freezing process, on in vitro sperm evaluations and embryo production. The following tests were performed in groups I (semen not exposed to virus) and II (semen exposed to virus): sperm motility and movement by computerized analysis (CASA), plasma/acrosomal membrane integrity (PAMI) and mitochondrial function (MF) by fluorocromes dyes, sperm membrane phosphatidylserine (PS) transposition using Annexin-V, in vitro embryonic development evidenced by the proportion of yielded embryos, and viral detection in sperm and embryos performed by in situ hybridization (ISH) assay and PCR. No significant difference was observed for PAMI and MF between groups. However, results of PS transposition in group II were significantly different ($P=0.00005$) from those found in group I; higher values ($P<0.05$) for mean velocity (VAP), curvilinear velocity (VCL) and lateral head displacement (ALH) and lower values for straightness (STR) and linearity (LIN) were obtained in group II when compared to those observed in group I. In conclusion, the ISH assay showed the presence of viral DNA on spermatozoa and embryos; besides, BoHV-5 induced functional and morphological sperm alterations, but did not compromise the embryonic development even after being carried to the embryos through the IVF infected oocytes.

Keywords: BoHV-5; sperm preservation; sperm motility; fluorescent in situ hybridization; embryonic development.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INFECÇÃO DE GAMETAS E EMBRIÕES BOVINOS PELO BoHV-1 E BoHV-5

Com a utilização de biotécnicas de reprodução animal, usualmente aplicadas no melhoramento genético de bovinos, tornou-se indispensável o uso de sêmen congelado. Porém, umas das grandes preocupações no seu emprego é a presença de patógenos. Apesar do controle sanitário de touros doadores de sêmen, exigidos pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e Ministério da Agricultura e Abastecimento, nem todos os agentes infecciosos carregados pelo sêmen têm sido monitorados.

Quando empregadas corretamente, tais biotécnicas podem ser utilizadas para prevenir a propagação de diversos agentes infecciosos (GARD et al., 2007).

A garantia de segurança sanitária no comércio de sêmen bovino é importante para aumentar o número de exportações e importações, além de minimizar a ocorrência de surtos de doenças ou até mesmo a introdução de uma nova enfermidade em um rebanho controlado.

Muitos patógenos têm sido relatados no sêmen de bovinos e de outros animais domésticos (AFSHAR; EAGLESOME, 1990; EAGLESOME; GARCIA, 1997; PHILPOTT, 1993), contudo, estes foram encontrados livres no plasma seminal ou nos constituintes celulares do sêmen, exceto, nos espermatozóides.

Em relação ao sêmen usado para produzir embriões para comércio internacional, na maioria dos casos, o mesmo é selecionado a partir de lotes de sêmen processados em centrais de inseminação credenciadas. Tais touros, normalmente, apresentam certificados negativos para doenças agudas e epidêmicas, como a febre aftosa e, também, para doenças crônicas como brucelose, tuberculose, leptospirose, campilobacteriose e tricomonose (WRATHALL et al., 2006). Um número crescente de centrais de inseminação também asseguram que seus touros são negativos para leucose enzoótica

bovina, BoHV-1 e para o vírus da diarréia viral bovina (BVDV) (WRATHALL et al., 2006).

O *herpesvirus* bovino tipo-5 (BoHV-5) pode ser encontrado em oócitos, sêmen e embriões. Devido à sua grande similaridade genômica com o *herpesvirus* bovino tipo-1 (BoHV-1) (ABDELMAGID et al., 1995), é possível que o vírus, após a reativação viral, tenha tropismo pelo aparelho genital, comprometendo a reprodução, assim como ocorre com o BoHV-1.

Diversos autores têm relatado a presença do BoHV-1 no sêmen bovino, através do emprego da técnicas de PCR (D'ANGELO et al., 2005; KUPFERSCHMIED et al., 1986; PARSONSON; SNOWDON, 1975; VANROOSE et al., 1999; WRATHALL et al., 2006), mas, a detecção do BoHV-5 foi descrita pela primeira vez por Gomes et al. (2003).

O BoHV-5, pertencente à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, é o agente etiológico de uma meningoencefalite nos bovinos. Essa enfermidade é de curso geralmente fatal e afeta principalmente animais jovens (LOVATO, 1998; ROEHE et al., 1998).

Os genomas do BoHV-1 e BoHV-5 apresentam uma homologia de aproximadamente 85%, de acordo com testes de cruzamento-hibridização do genoma completo (ABDELMAGID et al., 1995). Ambos BoHV-5 e BoHV-1 são vírus neurotrópicos que estabelecem latência no gânglio trigeminal (CHOWDHURY et al., 2000).

O BoHV-5 foi classificado como o segundo maior causador de encefalite letais, em bovinos (SANCHES et al., 2000), com tendência a ser reativado da latência, após uma situação de estresse, como, por exemplo, pós infecções por outros agentes (OSÓRIO, 1998; TIKOO et al., 1985), ocasionando a liberação de interleucina-6 (IL-6) e, conseqüentemente, levando ao aparecimento de distúrbios na homeostasia do sistema imunológico e imunossupressão (GOSSELIN et al., 1992).

O BoHV-1, tem sido associado com problemas respiratórios e reprodutivos (BIELANSKI; DUBUC, 1994), incluindo vulvovaginites, endometrites, abortos e balanopostite (WRATHALL et al., 2006). Em touros, o

vírus geralmente se replica na mucosa do prepúcio, pênis e uretra, sendo o sêmen, provavelmente contaminado pelo vírus presente na mucosa, durante a ejaculação (WRATHALL et al., 2006). Nas fêmeas, o vírus pode ser encontrado nos ovários, ovidutos, líquido folicular e oócitos (BIELANSKI; DUBUC, 1994).

Sua presença foi detectada em amostras de sêmen bovino, diretamente e após o isolamento em cultura de células usando o sistema “nested” PCR, amplificando o gene US4. Os animais infectados pelo BoHV-5 não apresentam sinais clínicos, sendo assim, é necessário o exame do sêmen, a fim de prevenir a transmissão do mesmo (GOMES et al., 2003).

A infecção causada pelo BoHV-5 tem sido descrita na Argentina (CARILLO et al., 1983), Brasil (WEIBLEIN et al., 1989), Áustria (STUDDERT, 1989), Estados Unidos (D’OFFAY et al., 1993) e Hungria (ABDELMAGID et al., 1995). A transmissão natural do BoHV-5, através do sêmen contaminado, foi descrita na Austrália (KIRKLAND et al., 2009) e isolado em amostras de sêmen obtidas de touros saudáveis (DIALLO et al., 2010).

Em contraste aos conhecimentos e reais riscos da transmissão da doença, através do uso de sêmen contaminado na inseminação artificial (IA), há pouca evidência de que o uso de sêmen contaminado para produzir embriões possa oferecer risco à viabilidade dos mesmos (WRATHALL et al., 2006). No entanto, tem sido demonstrado que a infecção experimental de gametas bovinos *in vitro*, com BoHV-5, produziu embriões infectados, sem que houvesse prejuízo no desenvolvimento embrionário (SILVA-FRADE et al. 2010a, 2010b).

Oliveira et al. (2011) detectaram a presença de DNA viral para o BoHV-5 (100%) e BoHV-1 (44,7%) em amostras de sêmen fresco e congelado de touros de centrais de inseminação, em dois estados do Brasil, através da técnica de nPCR.

Parsonson e Snowdon (1975), utilizando sêmen contaminado com BoHV-1, na IA em bovinos, observaram baixas taxas de fecundação (40%). Nas vacas que retornaram ao cio foram observados casos de endometrite,

salpingite e vaginite, sendo que 28% desses animais exibiram encurtamento do ciclo estral e sinais clínicos de vulvovaginite pustular infecciosa.

Além do sêmen, agentes infecciosos podem ser encontrados no ambiente no qual o material é manipulado, assim como em oócitos, líquido folicular, células somáticas e materiais de origem animal utilizados no preparo dos meios para produção de embriões bovinos *in vitro*. (D'ANGELO et al., 2005; VANROOSE et al., 1999).

O sêmen, oócitos e embriões podem ser infectados durante a criopreservação, através da exposição direta ao nitrogênio líquido contaminado, quando se emprega a técnica de vitrificação ou mesmo durante o armazenamento em recipientes inadequados ou selados imprópriamente (BIELANSKI et al., 2000).

O uso de embriões tornou-se uma rotina largamente aceita como sendo segura, eficiente e prática para o deslocamento de germoplasma. Entretanto, os procedimentos de transferência e produção *in vitro* de embriões podem facilitar a disseminação de alguns patógenos, os quais podem ser transmitidos ocasionalmente pelo sêmen ou embriões (GARD et al., 2007).

O BoHV-1 foi listado pela IETS como sendo de categoria 1, isto é: "... agente infeccioso, para o qual há evidência suficiente mostrando que o risco de transmissão é insignificante, sustentado pela adequada manipulação dos embriões da coleta à transferência" (Apêndice 3.3.5 do Código de Saúde dos Animais Terrestres da OIE).

Diversos pesquisadores têm demonstrado a presença do BoHV-1 no sêmen (D'ANGELO et al., 2005; KUPFERSCHMIED et al., 1986; PARSONSON; SNOWDON, 1975; VANROOSE et al., 1999; WRATHALL et al., 2006); contudo, a grande preocupação reside no fato de existir uma tendência do vírus se ligar à membrana plasmática do espermatozóide, inibindo sua habilidade para fertilizar o oócito. Não existem evidências de que os espermatozoides infectados possam penetrar através da zona pelúcida (ZP) intacta e, desta forma, contaminar os embriões (WRATHALL et al., 2006).

Stringfellow e Givens (2000) trabalharam com a hipótese de que a ZP intacta de embriões bovinos produzidos *in vivo*, poderia protegê-los de agentes infecciosos e que, o tratamento apropriado da ZP intacta, antes da criopreservação e/ou transferência, provavelmente, reduziria o risco de ocorrência natural de patógenos que poderiam ser transmitidos para a receptora.

Segundo Gomes et al. (2003), não há nenhuma correlação entre o título de anticorpos e a eliminação de BoHV-5 no sêmen. Alguns autores têm relatado a detecção do BoHV-1 em amostras de sêmen de touros soronegativos (KUPFERSCHMIED et al., 1986; PARSONSON; SNOWDON, 1975).

Vanroose et al. (2000) demonstraram que a utilização de espermatozoides previamente incubados com BoHV-1, na FIV, promoveu uma redução de até 60% no número de espermatozoides aderidos na ZP, quando comparado ao grupo controle (sem exposição ao vírus).

Guerin et al. (1990) estudaram o efeito do BoHV-1 em grupos de oócitos que foram expostos ao vírus durante a maturação e fertilização. O vírus pareceu não afetar a maturação dos oócitos, porém, reduziu significativamente a taxa de fertilização de 85% (controle) para 65%. Os autores concluíram que, o BoHV-1 não somente foi adsorvido pelo gameta como também prejudicou sua habilidade de fertilizar o oócito, possivelmente devido ao fato de alterar a penetração ou afetar o mecanismo de interação intracelular de fusão.

Segundo Vanroose et al. (1997), os blastocistos expandidos, expostos ao BoHV-1, expressaram antígenos virais em aproximadamente 13% de suas células e tornaram-se degenerados. Makarevich et al. (2007), concluíram que os embriões com ZP intactas foram protegidos contra a infecção, contudo, embriões eclodidos, após a exposição ao vírus, apresentaram degeneração celular.

Bielanski e Dubuc (1994), observaram que a infecção de embriões produzidos *in vitro* com BoHV-1 não diminuiu significativamente as taxas de desenvolvimento embrionário de oócitos para o estágio de blastocisto, quando

comparadas ao grupo não infectado. Em contrapartida, Vanroose et al. (1999) encontraram taxas de clivagem e de formação de blastocistos significativamente reduzidas, após a exposição ao vírus durante a etapa de FIV.

Ainda não existem evidências de que o vírus apenas se fixe na ZP ou penetre infectando as células embrionárias (BIELANSKI; DUBUC, 1994). Para Vanroose et al. (1999), a replicação do BoHV-1 ocorreu somente em blastômeros de embriões produzidos *in vitro* na ausência de ZP.

Silva et al. (2008), após utilizar oócitos bovinos imaturos previamente incubados com BoHV-5, na maturação *in vitro* (MIV), verificaram através do teste de TUNEL, que estes apresentaram maior incidência de fragmentações de DNA (apoptose) do que os não infectados, demonstrando uma afinidade do BoHV-5 com os oócitos bovinos.

Embora exista a possibilidade do BoHV-5 ser encontrado no sêmen bovino, nenhum relato tem sido descrito na literatura sobre sua possível interferência na cinética espermática, viabilidade das membranas espermáticas e, conseqüentemente, sua influência na produção de embriões *in vitro*. Desta forma, este estudo foi delineado com objetivo de analisar os efeitos da exposição experimental do sêmen fresco bovino ao BoHV-5, previamente à congelação, avaliando-se a motilidade e tipo de movimento espermático, a integridade da membrana plasmática e acrossomal, e a função mitocondrial, a transposição da fosfatidilserina na membrana do espermatozóide, a produção *in vitro* de embriões, além da detecção viral nos espermatozóides e embriões.

A hipótese a ser testada é de que a infecção experimental do sêmen fresco bovino com BoHV-5 causará danos aos espermatozóides, que o vírus seja carregado para o embrião e a produção de embriões *in vitro* será reduzida.

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, n.1, p.242-253, 1995.

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

BEHLING-KELLY, E.; SCHULTZ-CHERRY, S.; KOCI, M.; KELLEY, L.; LARSEN, D.; BROWN, C. Localization of astrovirus in experimentally infected turkeys as determined by in situ hybridization. **Veterinary Pathology**, v.39, n.5, p.597-598, 2002.

BIELANSKI, A.; DUBUC, C. In vitro fertilization and culture of ova from heifers infected with bovine herpesvirus-1 (BHV-1). **Theriogenology**, v.41, n.6, p.1211-1217, 1994.

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, n.1/2, p.1-8, 1997.

BIELANSKI, A.; NADIN-DAVIS, S.; SAPP, T.; LUTZE-WALLACE, C. Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. **Cryobiology**, v.40, n.2, p.110-116, 2000.

CARDOSO, T.C.; FERRARI, H.F.; LUVIZOTTO, M.C.R.; ARNS, C.W. Bio-safety technology in production of Bovine Herpesvirus type 5 (BoHV-5) using an alternative serum-free medium. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v.3, n.3, p.125-130, 2007.

CARILLO, B.J.; POSPISCHIL, A.; DAHME, E. Pathology of a bovine viral necrotizing encephalitis in Argentina, **Zentralbl Veterinarmed B**, v.30, n.3, p, 161-168, 1983.

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

D'ANGELO, M.; GALUPPO, A.G.; PIATTI, R.M.; MELO, G.M.; ZERIO, N.M.C.; SOUZA, R.J. Avaliação da sensibilidade de zigotos murinos ao herpesvírus bovino-1: um modelo experimental para estudos de interações embrião-vírus. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.2, p.141-145, 2005.

DIALLO, I.S.; HEWITSON, G.R.; HOAD, J.; TURNER, S.; CORNEY, B.G.; RODWELL, B.J. Isolation of bovine herpesvirus type 5 from the semen of a healthy bull in Australia. **Australian Veterinary Journal**, n.3, v.88, p.93-95, 2010.

D'OFFAY, J.M.; MOCK, R.E.; FULTON, R.W. Isolation and characterization of encephalitic bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle in North America. **American Journal of Veterinary Research**, v.54, n.4, p.534-539, 1993.

EAGLESOME, M.D.; GARCIA, M.M. Disease risks to animal health from artificial insemination with bovine semen. **Revue Scientifique et Technique**, v.16, n.1, p.215-225, 1997.

GARD, J.A.; GIVENS, M.D.; STRINGFELLOW, D.A. Bovine viral diarrhea virus (BVDV): epidemiologic concerns relative to semen and embryos. **Theriogenology**, v.68, n.3, p.434-442, 2007.

GOMES, L.I.; ROCHA, M.A.; SOUZA, J.G.; COSTA, E.A.; BARBOSA-STANCIOLO, E.F. Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) in bull semen: amplification and sequence analysis of the US4 gene. **Veterinary Research Communications**, v.27, n.6, p.495-504, 2003.

GOSSELIN, J.; FLAMAND, L.; D'ADDARIO, M.; HISCOTT, J.; STEFANESCU, I.; ABLASHI, D.V.; GALLO, R.C.; MENEZES, J. Modulatory effects of Epstein-Barr, herpes simplex and human herpes-6 viral infection and co-infections on cytokine synthesis: a comparative study. **Journal of Immunology**, v.149, n.1, p.181-187, 1992.

GUERIN, B.; Le GUIENNE, B.; ALLEITTE, M.; HARLEY, T.; THIBIER, M. Effets de la contamination par le BHV-1 sur la maturation et fecundation in vitro des ovocytes des bovines. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v.166, n.10, p.911-917, 1990.

KIRKLAND, P.D.; MACKINTOSH, S.G.; MOYLE, A. The outcome of widespread use of semen from bull persistently infected with pestivirus. **Veterinary Record**, v.135, n.22, p.527-529, 1994.

KIRKLAND, P.D.; POYNTING, A.J.; GU, X.; DAVIS, R.J. Infertility and venereal disease in cattle inseminated with semen containing bovine herpesvirus type 5. **Veterinary Record**, v.165, n.4, p.111-113, 2009.

KUPFERSCHMIED, H.U.; KIHLM, U.; BACHMANN, P.; MULLER, K.H.; ACKERMANN, M. Transmission of IBR/IPV virus in bovine semen: a case report. **Theriogenology**, v.25, n.3, p.439-443, 1986.

LOVATO, L.T. BHV-1-1 e BHV-1-5, isolamentos e sorologia no Rio Grande do Sul. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE HERPESVÍRUS BOVINO (TIPO 1 E

5) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA, 1998, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1998. p.97-101.

MAKAREVICH, A.V.; PIVKO, J.; KUBOVICOVA, E.; CHRENEK, P.; SLEZAKOVÁ, 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, n.4, p.307-315, 2007.

MARTINS JÚNIOR, A.; BRACKETT, B.G. Effects of recombinant gonadotropins on bovine embryo development in chemically defined media. In: SCIENTIFIC MEETING OF THE EUROPEAN EMBRYO TRANSFER ASSOCIATION, 14., 1998, Veneza. **Anais...** Veneza, Itália, 1998. v.14, p.214.

NUSSBAUM, O.; LASTER, J.; LOYTER, A. Fusion of enveloped viruses with sperm cells: interaction of Sendai, Influenza and Semliki Forest viruses with bull spermatozoa. **Experimental Cell Research**, v.206, n.1, p.11-15, 1993.

OLIVEIRA, M.T.; CAMPOS, F.S.; DIAS, M.M.; VELHO, F.A.; FRENEAU, G.E.; BRITO, W.M.E.D.; RIJSEWIJK, F.A.M.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. Detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in semen from Brazilian bulls. **Theriogenology**, v.75, n.6, p. 1139-1145, 2011.

OSÓRIO, F.A. Latency of bovine herpesvirus-1. In. SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE HERPESVÍRUS BOVINO (TIPO 1 E 5) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA, 1998, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1998. p. 117-126.

PARSONSON, I.M.; SNOWDON, W.A. The effect of natural and artificial breeding using bulls infected with, or semen contaminated with, infectious

bovine rhinotracheitis virus. **Australian Veterinary Journal**, v.51, n.8, p.365-369, 1975.

PHILPOTT, M. The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfers. **British Veterinary Journal**, v.149, n.4, p.339-369, 1993.

ROEHE, P.M.; TEIXEIRA, M.B.; ESTEVES, P.A ; MELO, S.V. ; ALMEIDA, R.S.; D'ARCE, R.C.F. ; SILVA, T.C. ; OLIVEIRA, L.G. ; LEMOS, R.A. Situação do BoHV-1 e BoHV-5 no Brasil. In. SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE HERPESVÍRUS BOVINO E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA, 1998, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1998. p. 89-96.

SANCHES, A.W.D.; LANGOHR, I.M.; STIGGER, A.L.; BARROS, C.S.L. Doenças do sistema nervoso central em bovinos no Sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.20, n.3, p.113-118, 2000.

SILVA C.; MARTINS JÚNIOR, A.; BORSANELLI, A.C.; CALEGARI, R.S.; CARDOSO, T.C. A adição de PVA no meio de maturação in vitro aumenta a apoptose de oócitos após a infecção com Herpesvírus Bovino-5. In: SEMANA DE DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA, 8., 2008, Araçatuba. **Anais...** Araçatuba: Universidade Estadual Paulista, 2008. p. 46.

SILVA-FRADE, C.; MARTINS JÚNIOR, A.; BORSANELLI, A.C.; CARDOSO, T.C. Effects of bovine Herpesvirus type 5 on development of in vitro produced bovine embryos. **Theriogenology**, v.73, n.3, p.324-331, 2010a.

SILVA-FRADE, C.; GAMEIRO, R.; MARTINS JÚNIOR, A.; CARDOSO, T.C. Apoptotic and developmental effects of bovine *Herpesvirus* type-5 infection on *in vitro*-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v.74, n.7, p.1296-1303, 2010b.

STRINGFELLOW, D.A; GIVENS M.D. Preventing disease transmission through the transfer of in-vivo-derived bovine embryos. **Livestock Science**, v.62, n.3, p.237-251, 2000.

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M.; INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY. Manual of the international embryos transfer society: a procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology, emphasizing sanitary procedures. 3rd ed. Savory: IETS, 1998.

STUDDERT, M.J. Bovine encephalitis herpesvirus. **The Veterinary Record**, v.125, n.23, p.584, 1989.

THIBIER, M. Data retrieval committee annual report. **Embryo Transfer Newsletter**, v.25, p.12-19, 2004.

TIKOO, S.K.; CAMPOS, M.; BABIUK, L.A. Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis and control. **Advances in Virus Research**, v.45, p.191-223, 1995.

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. (Abstract).

VANROOSE, G.; NAUWYNCK, H.; VAN SOOM, A.; VANOPDESBOSCH, E.; DE KRUIF, A. Effect of bovine herpesvirus-1 or bovine diarrhea viral on development of in vitro-produced bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.54, n.3, p.255-263, 1999.

VANROOSE, G.; NAUWYNCK, H.; VAN SOOM, A.; VANOPDESBOSCH, E.; DE KRUIF, A. Susceptibility of zona-intact and zona-free in vitro-produced bovine embryos at different stages of development to infection with bovine herpesvirus-1. **Theriogenology**, v.47, n.7, p.1389-1402, 1997.

WEIBLEIN, R.; BARROS, C.S.; CANABARRO, T.F.; FLORES, I.E. Bovine meningoencephalitis from IBR virus. **The Veterinary Record**, v.124, n.25, p.666-667, 1989.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. Terrestrial animal health code. 2007. Disponível em: < <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-code/> >. Acesso em: 9 dez. 2010.

WRATHALL, A.E.; SIMMONS, H.A.; VAN SOOM, A. Evaluation of risks of viral transmission to recipient of bovine embryos arising from fertilization with virus-infected semen. **Theriogenology**, v.65, n.2, p.247-274, 2006.

CAPÍTULO 2 - ARTIGO

Avaliação do Sêmen de Touro Após Infecção Experimental com *Herpesvirus* Bovino Tipo 5

RESUMO – A influência da infecção do sêmen fresco bovino, antes da congelação, pelo *Herpesvirus* bovino tipo 5 (BoHV-5), foi investigada, com base na avaliação dos parâmetros espermáticos e viabilidade *in vitro*. Ejaculados de três touros foram misturados e divididos em dois grupos: Grupo I, sêmen não exposto ao vírus e, Grupo II, sêmen exposto a $10^{2,3}$ TCID₅₀/50µL do BoHV-5. Após a infecção experimental, o sêmen foi congelado e descongelado para a realização das análises de cinética espermática (CASA), translocação da fosfatidilserina (PS) na membrana do espermatozóide, integridade das membranas plasmática/acrossomal (IMPA) e função mitocondrial (FM). Não houve diferença estatística entre os grupos para IMPA e FM. A hibridização *in situ* revelou o DNA viral na cabeça e na cauda dos espermatozoides infectados. A anexina-V evidenciou diferença significativa na translocação da PS ($P=0,00005$) no Grupo II. Valores maiores ($P < 0,05$) para a velocidade média de trajeto (VAP), velocidade curvilínea (VCL) e amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), foram encontrados no Grupo II, bem como menores valores para a retilinearidade (STR) e linearidade (LIN) quando comparados com Grupo I, sugerindo que a exposição do sêmen ao BoHV-5 altera o padrão de movimento progressivo e retilíneo dos espermatozoides. Concluindo, o BoHV-5 foi detectado nos espermatozoides, mesmo após o processo de congelação e descongelação, afetando funcional e morfológicamente os espermatozoides. Assim, a propagação do vírus durante os procedimentos *in vitro* e/ou *in vivo*, empregados na área de biotecnologia da reprodução, pode ser de importância.

Palavras-chave: BoHV-5; preservação do sêmen; apoptose; anexina; motilidade espermática.

Evaluation of Frozen Bull Semen after Experimental Exposure with Bovine *Herpesvirus Type 5*

SUMMARY – The influence of exposure of fresh bull semen to bovine *herpesvirus* type 5 (BoHV-5) before freezing was investigated base on the evaluation of in vitro sperm parameters and viability. Three ejaculates of different bulls were mixed and then divided into two groups, as follows: group I, semen not exposed to virus, and group II, semen exposed to $10^{2.3}$ TCID₅₀/50µL BoHV-5 virus. After experimental infection, semen was frozen and stored. The seminal samples were thawed and sperm assessed for kinetics parameters, membrane phosphatidylserine (PS) translocation, plasma and acrosomal membrane integrity (PAMI), mitochondrial function (MF), and for the presence of viral DNA through in situ hybridization (ISH) assay. The ISH assay showed the presence of US9 gene in the head and tail of infected spermatozoa. There was no statistical difference between groups for PAMI and MF. The Annexin-V staining revealed a significant difference ($p=0.00005$) for PS translocation in group II. Higher values ($p<0.05$) for mean velocity (VAP), curvilinear velocity (VCL) and lateral head displacement (ALH) were found in group II, as well as lower values for straightness (STR) and linearity (LIN) when compared to those obtained in group I, suggesting that the exposure of semen to BoHV-5 can alter the progressive and straight spermatozoa movement. In conclusion, BoHV-5 was detected in spermatozoa even after the freeze/thawing process and induced functional and morphological damages to the sperm cells. Thus, the spread of BoHV-5 during in vitro and/or in vivo reproductive biotechnonology procedures might be of significant importance.

Keywords: BoHV-5; semen preservation; apoptosis; annexin; sperm motility.

2.1 Introdução

O *Herpesvirus* bovino tipo 5 (BoHV-5) é um α -herpesvírus neurovirulento, geralmente associado à encefalite necrosante em bovinos (DEL MÉDICO ZAYAC et al., 2010). A infecção com BoHV-5 tem sido ocasionalmente descrita em diversos países, incluindo a Austrália (KIRKLAND et al., 2009), Estados Unidos e países europeus, no entanto, a doença foi descrita como sendo prevalente na América do Sul, especialmente no Brasil e Argentina (DEL MÉDICO ZAYAC et al. 2010; ESTEVES et al., 2008; PEREZ et al., 2003). O *Herpesvirus* bovino tipo 1 (BoHV-1) e BoHV-5 estão relacionados genética e antigenicamente (DELHON et al., 2003). Ambos estabelecem latência nos neurônios sensoriais, onde seus genomas permanecem em latência no hospedeiro, aguardando a reativação de um novo ciclo lítico (MEYER et al. 2001, PÉREZ et al., 2002; RISSI et al., 2007; VALERA et al., 2008; VARELA et al., 2010).

Ao contrário do BoHV-5, o BoHV-1 provoca problemas respiratórios e reprodutivos, os quais são economicamente importantes, tais como: vulvovaginite, endometrite, aborto e balanopostite. Além disso, no touro, o vírus replica inicialmente na mucosa do prepúcio, pênis e uretra, sendo o sêmen provavelmente contaminado pelo vírus durante a passagem pela mucosa infectada durante a ejaculação (MUYLKENS et al., 2007; WRATHALL et al., 2006). A transmissão natural do BoHV-5, em sêmen contaminado foi descrita na Austrália (KIRKLAND et al., 2009) e isolado em amostras de sêmen obtidas de touros saudáveis (DIALLO et al., 2010).

Em contraste aos conhecimentos e reais riscos da transmissão da doença, através do uso de sêmen contaminado na inseminação artificial (IA), há pouca evidência de que o uso de sêmen contaminado para produzir embriões possa oferecer risco à viabilidade dos mesmos (WRATHALL et al., 2006). No entanto, tem sido demonstrado que a infecção experimental *in vitro* de gametas bovinos com BoHV-5 produz embriões infectados, sem que ocorra prejuízo no desenvolvimento embrionário (SILVA-FRADE et al., 2010a, 2010b).

Em relação ao sêmen, usado para produzir embriões para comércio internacional, na maioria dos casos este é selecionado a partir de lotes de sêmen processados em centrais de inseminação artificial credenciadas. Tais touros, normalmente, apresentam certificados negativos para doenças agudas e epidêmicas, como a febre aftosa e, também, para doenças crônicas como brucelose, tuberculose, leptospirose, campilobacteriose e tricomonose (WRATHALL et al., 2006). Um número crescente de centrais de inseminação também asseguram que seus touros são negativos para a leucose enzoótica bovina, BoHV-1 e para a diarreia viral bovina (BVDV) (WRATHALL et al., 2006).

O presente estudo foi conduzido com finalidade de avaliar os efeitos da exposição experimental do sêmen fresco bovino ao BoHV-5, previamente ao processo de criopreservação. As amostras de sêmen foram examinadas através da análise computadorizada (CASA) quanto à motilidade e movimento, bem como para integridade da membrana acrossomal, função mitocondrial e integridade da membrana plasmática. Além disso, os espermatozoides infectados e não infectados foram submetidos a análise de translocação da fosfatidilserina serina na membrana e detecção viral através do emprego da técnica de hibridização *in situ*.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Preparo dos meios

Todos os reagentes químicos e meios foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, EUA) e da Invitrogen™, Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA). O tampão HEPES Tyrode modificado (HEPES-TALP) consistiu de 3,1 mM KCl, 114 mM NaCl, 2 mM NaHCO₃, 0,3 mM NaH₂PO₄, 2,1 mM CaCl₂, 0,4 mM MgCl₂, 10 mM de lactato de sódio, 0,2 mM de piruvato de sódio, 10 µg/mL de sulfato de gentamicina, 10 mM HEPES e 3 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA). O TALP-SPERM constitui de HEPES Tyrode modificado, suplementado com 25 mM NaHCO₃, 10 mM de lactato de sódio, 0,2 mM de piruvato de sódio, 10 µg/mL de sulfato de gentamicina e 10 mM HEPES. Para a

realização da cultura de células foi utilizado o meio mínimo essencial (MEM), acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB).

2.2.2 Preparação do vírus e da amostra de sêmen

Estoques de BoHV-5 (GenBank GU9457818), isolado em 2007, a partir de focos na região de Araçatuba, São Paulo, Brasil (FERRARI et al., 2007), foram propagadas em células “Madin Darby bovine kidney” (MDBK, ATCC CCL-2), as quais foram cultivadas em MEM. A dose infectante, em cultura de tecido por 50 µL (TCID₅₀) do estoque do vírus, foi determinada pela titulação em monocamadas confluentes de células MDBK (CARDOSO et al., 2010; DIALLO et al., 2010). Alíquotas do estoque viral (100 µL) com 10^{3,3} TCID₅₀/50 µL foram congeladas a -86°C até o momento do uso.

Ejaculados de três touros da raça Nelore, com fertilidade comprovada e livre de contaminação viral, foram obtidos através de vagina artificial, de acordo com os procedimentos rotineiros da central de inseminação artificial. As amostras de sêmen foram avaliadas quanto à motilidade, vigor, concentração e morfologia. A seguir, o “pool” de ejaculados foi dividido em duas alíquotas, de igual volume, sendo uma delas submetida ao processo de coincubação com o vírus. Apenas as amostras que apresentaram motilidade progressiva (MP) ≥ 60% e morfologia normal (≥ 70%), foram utilizadas. O teste de hibridização *in situ* foi utilizado para detectar o gene US9 do BoHV-5, segundo protocolo descrito por Silva-Frade et al. (2010 a, 2010b).

2.2.3 Coincubação vírus e sêmen e congelação das amostras seminais

O BoHV-5 com título de 10^{3,3} TCID₅₀/50 µl foi co-incubado com o sêmen, durante 15 min à temperatura ambiente (25°C), ao abrigo da luz. Em seguida, o sêmen foi diluído em Tris-ácido cítrico-frutose (pH 6,8; pressão osmótica ~ 300 mOsm/kg) contendo gema de ovo (20% v/v) e glicerol (7% v/v), resultando numa concentração final de 60x10⁶ espermatozóides/mL. As amostras foram envasadas manualmente em palhetas de 0,5 mL e mantidas no refrigerador à

temperatura constante de 4°C por 4 h. A curva de congelamento foi realizada em vapor de nitrogênio líquido, utilizando uma caixa de isopor para o procedimento. As palhetas de sêmen foram mantidas a uma distância de 5 cm acima do nível do nitrogênio líquido por 20 min. Após este período de congelamento, as palhetas foram imersas diretamente em nitrogênio líquido e armazenadas em botijão criobiológico.

Antes do processo de criopreservação, as amostras de sêmen fresco foram divididas em dois grupos: I (controle) e II (infectado). O grupo controle foi incubado com 100 µL de MEM para cada 1 mL de ejaculado, enquanto que o grupo II foi incubado com 100 µL do estoque de BoHV-5, na mesma diluição usada para o grupo controle (1:10). Os dois grupos foram submetidos aos mesmos testes.

2.2.4 Recuperação e detecção do vírus

2.2.4.1 Recuperação do vírus

Monocamadas de cultura de células MDBK com 80% de confluência foram preparadas de acordo com o procedimento padrão e livre de BoHV-1 e BVDV; outros patógenos potenciais, como leptospira, campilobacter e tricomonas, foram pesquisados (SILVA-FRADE et al., 2010a). Adsorção foi permitida por 1 h a 38,5°C. Posteriormente, meio fresco foi adicionado e as culturas observadas durante sete dias para evidências de efeito citopático (ECP). Depois de uma nova passagem, culturas ECP foram consideradas negativas. Quando ECP foi observado e descrito como uma formação sincicial, as respectivas células foram removidas, submetidas à titulação viral e identificação molecular.

A titulação do vírus foi realizada com suspensões de embriões infectados em placa de 96 poços previamente cultivada com células MDBK. Diluições seriadas de 10^{-2} a 10^{-8} , das suspensões de embriões infectados, foram preparadas e utilizadas para a titulação de BoHV-5, em um único poço, em triplicata. A placa foi incubada por 1 h a 38,5°C antes da adição de 100 µL

do suplemento MEM. Em seguida, as mesmas foram incubadas por sete dias, sendo examinadas a cada 24 h para observação do ECP. A infectividade do vírus foi calculada de acordo com o método de Spearman-Kärber, como descrito previamente (Silva Frade et al., 2010b).

2.2.4.2 Detecção do ácido nucléico viral

O DNA viral foi obtido por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), a partir de espermatozóides infectados oriundos da coincubação e das células MDBK infectadas com tais espermatozóides, assim como com espermatozóides não infectados (SILVA-FRADE et al., 2010a). Para realização desta etapa, células inoculadas foram recuperadas quando o ECP atingiu cerca de 80% das monocamadas de células MDBK. O DNA total foi extraído das células infectadas usando o RNA/DNA PureLink Kit (Invitrogen®). A PCR foi realizada utilizando 12,5 µL de 2 X Platinum® Taq Polymerase High Fidelity master mix (Invitrogen®), 10 pmoles de cada primer (US9-For: 5'-AGAGTCCACACAGCGTCGTCAA-3' e US9-Rev: 5'-CTACAGCGAGAGCGACAGCGAGA-3').

O primer reverso US9-Rev foi comercialmente preparado, ligado à biotina (Invitrogen®). Além disso, 2,5 µL de água livre de nuclease e 8 µL da amostra de DNA (3 µL de DMSO acrescido de 5 µL de DNA) foram adicionados à mistura principal, com a reação realizada em um termociclador automático (Eppendorf®, Hamburg, DE). A amostra de DNA viral foi incubada a 98°C por 5 min para desnaturação e, a seguir, por uma sequência de 34 ciclos, a saber: 94°C/30s para desnaturação, 60°C/1 min para a hibridação do primer, 72°C/2 min para extensão e uma extensão separada final a 72°C/5 min. Os produtos da PCR foram visualizadas em 1,5% (w/v) em gel de agarose, após coloração com brometo de etídio (0,5 µg/mL). Após confirmado o produto com 237-bp, outro gel puro foi utilizado para separar o produto da PCR para ser purificada utilizando as colunas do GenElute agarose spin (Sigma-Aldrich®) para o sequenciamento dos nucleotídeos em sequenciador MEGABACE (Amersham

Biosciences). As sequências foram alinhadas utilizando Lasergene DNA STAR (versão 7, Lasergene Corp Madison, WI). O grau de identidade entre as sequências de nucleotídeos e os níveis de aminoácidos foram determinados utilizando o BioEdit v.7.0.5. Os números de adesão para as sequências foram adquiridos a partir do banco de dados público GenBank.

2.2.5 Hibridização *in situ*

Para realizar a hibridização *in situ*, a sonda de DNA foi preparada a partir dos produtos da PCR para o gene da glicoproteína C do BoHV-5 (SILVA-FRADE et al., 2010a). Os produtos com 159 pares de base (pb) foram amplificados pelo primer sense gl+ (5'- GTG CTC TTC TCC ATC GCC-3') e primer reverso gl- (5'-GCG GAG GAGGAG TTG TCG G-3') (InvitrogenTM, Brasil). Após a purificação do DNA, em gel de agarose, o produto da PCR foi ligado ao vetor TA (pGEMTEasy, Promega, Madison, WI, EUA) com a ligação dos produtos introduzidos em *E. coli*, através de choque térmico. As colônias positivas foram confirmadas pelo sequenciamento do DNA. A colônia positiva confirmada foi cultivada e o DNA do plasmídeo foi preparado usando um kit disponível comercialmente (Promega Mini-Prep, Promega, Madison, WI, EUA). A sonda foi gerada pela reação de PCR, tendo como alvo o gene da gC localizado no plasmídeo, utilizando a biotina conjugada ao primer reverso (InvitrogenTM).

Para a realização da hibridização *in situ*, os espermatozóides (grupo I e II), foram colocados em lâminas de vidro (EasyPath[®]) pré-tratadas com poli-L-lisina pura (Sigma-Aldrich[®]) e fixados com 4% (w/v) de paraformaldeído (Sigma-Aldrich[®]), em solução tamponada de fosfato salina (PBS), por 24 h a 4°C. Os espermatozóides viáveis foram selecionados através de centrifugação (20 min a 700 x g) em gradiente de Percoll (Nutricell[®], Campinas, SP, Brasil), composto de 1 mL de Percoll 90% e 45% e, em seguida, lavados em meio TALP-SPERM, antes da fixação. As lâminas foram pré-tratadas com proteinase K (10 mg/mL, InvitrogenTM) por 10 minutos em temperatura ambiente e lavadas em PBS. A sonda de 159 pb desnaturada, conjugada à biotina foi aplicada

sobre as lâminas pré-tratadas. A solução foi constituída de 2 µL (2 ng/mL) da sonda e 98 µL do tampão pré-hibridização (50% de formamida, 5% BSA, 1% de N-laurylsarcosine e 0,02% de dodecil sulfato de sódio, Sigma-Aldrich®).

As lâminas foram incubadas à temperatura de 37°C, e em câmara úmida, por 18 h. Em seguida, as lâminas foram lavadas e o excesso da sonda foi removido por lavagens sucessivas em soluções compostas por 1 x SSC (citrato de sódio salina) e 0,1 x SSC, por 10 min a 42°C. O sistema de detecção consistiu da incubação das lâminas com estreptoavidina conjugada a FITC (Sigma-Aldrich®), por 2 h a 37°C. As lâminas foram cobertas com solução de Faramount® (Sigma-Aldrich®) e observadas em microscópio UV. As imagens foram obtidas em microscópio Axio Imager A.1 conectado a AxioCam MRc (Carl Zeiss Oberkochen, Alemanha) e as micrografias processadas no Axiovision software 4.7 (Carl Zeiss).

2.2.6 Análises do sêmen

2.2.6.1 Transposição da fosfatidilserina (PS) em espermatozóides

A detecção da apoptose através da Anexina-V (AN)-FITC *in situ* foi feita de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen™, Molecular Probes®). As amostras de sêmen (grupo I e II) foram diluídas em 1 mL de TALP-sêmen e centrifugadas a 300 x g por 5 min; o sobrenadante foi removido e o “pellet” de espermatozóides ressuspensionado em 1 x Anexina-V à temperatura ambiente, na concentração de 1×10^6 espermatozóides/100 µL. Alíquotas (100 µL cada) da suspensão de espermatozóides foram transferidas para tubos de 1,5 mL. Cinco microlitros da Anexina-V FITC, 5 µL de PI ou nenhum dos dois corantes foram adicionado às amostras. A seguir, as suspensões foram transferidas para lâminas de vidro pré-tratadas com poli-L-lisina e 100 µL de cada solução (1x) foi adicionado à lâmina. As diferentes porcentagens de Anexina-V/PI observadas foram classificadas como se segue: vivo (AN negativa/PI positiva); vivo, mas com translocação da PS (AN positiva/PI negativa); mortos e com translocação da PS (AN positiva/PI positiva) e mortos com necrose (AN negativa/PI positiva) (RICCI et al., 2002).

A diferença entre Anexina-V positiva foi documentada utilizando a estreptoavidina conjugada ao fluorocromo Cy3 (Sigma-Aldrich®) por 2 h a 37°C, seguido da adição do DAPI para contra coloração. As lâminas foram cobertas com lamínulas utilizando a solução de Faramount® (Sigma-Aldrich®), observadas em microscópio de luz UV e documentadas como descrito acima.

2.2.6.2 Análise computadorizada da motilidade e movimento espermático

Amostras de sêmen bovino dos Grupos I e II foram descongeladas em banho-maria a 46°C por 20s e avaliadas quanto aos parâmetros cinéticos no equipamento CASA (Hamilton Thorne Research® Ivos-12/EUA). Para cada amostra de sêmen (n=10) foram observados cinco campos aleatórios, contando um mínimo de 100 células por campo. Os dados dos parâmetros espermáticos são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros espermáticos avaliados através de análise computadorizada da motilidade e do movimento

Motilidade total (MT)	%	células apresentando motilidade
Motilidade Progressiva (MP)	%	células movendo-se progressivamente
Velocidade curvilinear (VCL)	µm/s	velocidade média mensurada de ponto a ponto do trajeto percorrido
Velocidade linear (VSL)	µm/s	velocidade média percorrida em linha reta entre os pontos inicial e final do trajeto
Velocidade média (VAP)	µm/s	velocidade média da célula ininterrupta no trajeto
Linearidade (LIN)	%	VSL/VCL x 100
Retilinearidade (STR)	%	VSL/VAP x 100
Deslocamento lateral de cabeça (AHL)	µm	Oscilação da cabeça espermática ao longo do movimento
Frequência de batimento cruzado (BCF)	Hz	número de vezes que a cabeça do espermatozóide cruza a linha reta da trajetória

2.2.7 Avaliação da integridade das membranas plasmática, e acrossomal, e função mitocondrial

A fim de avaliar a integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial, os espermatozoides foram classificados em oito categorias, de acordo com a fluorescência emitida pela associação das sondas PI, FITC-PSA e JC-1, respectivamente, conforme o protocolo descrito por Celeghine (2005).

- 1) Membrana plasmática intacta, acrossoma intacto e com função mitocondrial;
- 2) Membrana plasmática intacta, acrossoma intacto e sem função mitocondrial;
- 3) Membrana plasmática lesada, acrossoma intacto e com função mitocondrial;
- 4) Membrana plasmática lesada, acrossoma intacto e sem função mitocondrial;
- 5) Membrana plasmática intacta, acrossoma lesado e com função mitocondrial;
- 6) Membrana plasmática intacta, acrossoma lesado e sem função mitocondrial;
- 7) Membrana plasmática lesada, acrossoma lesado e com função mitocondrial;
- 8) Membrana plasmática lesada, acrossoma lesado e sem função mitocondrial;

Uma amostra de 200 μL de sêmen, pós-descongelamento (infectada e não infectada) foi adicionada a 1000 μL de meio TALP-SPERM. Um volume de 150 μL desta solução foi colocado em microtubos e adicionados 3 μL de PI (0,5 mg/mL em PBS), 6 μL de JC-1 (153 mM em DMSO) e 50 μL de FITC-PSA (100 $\mu\text{g/mL}$ em PBS). As amostras foram incubadas por 8 min a 37°C. Após a incubação, 7 μL da amostra foi colocada entre lâmina e lamínula (pré-aquecidas a 37°C) e a leitura realizada sob microscopia de epi-fluorescência (aumento 1000x).

2.2.8 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prism[®] V.5.01. As médias obtidas para cada variável analisada no CASA foram comparadas entre os dois grupos pelo teste-*t* de Student e as médias observadas para a integridade membrana plasmática e acrossomal, e função mitocondrial foram analisadas através do teste de Mann-Whitney. A significância estatística foi fixada em $P < 0,05$.

2.3 Resultados

As partículas viáveis de BoHV-5 foram recuperadas a partir dos espermatozoides infectados, por três infecções consecutivas em monocamadas MDBK, semi-confluentes. Além disso, o DNA do BoHV-5 foi detectado pela hibridização *in situ*, conforme a marcação fluorescente positiva

observada nos espermatozoides infectados quando comparados com o grupo controle (Figura 1A e B).

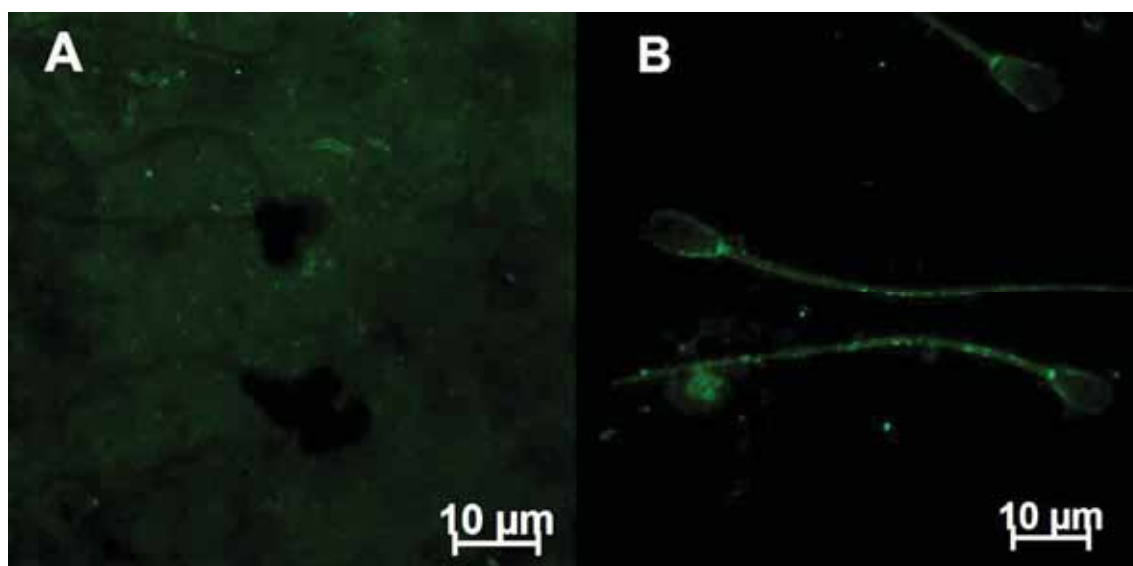


FIGURA 1 - Fotomicrografia da reação de hibridização *"in situ"*. A) grupo I, espermatozoides não infectados. Escala de 10µm. B) grupo II, espermatozoides infectado com BoHV-5 visualizado com fluorescência (425 nm), revelando principalmente na região pós-acrossomal e cauda reativas ao gene viral US9.

Os dados da mobilidade e movimento dos espermatozoides são mostrados na Tabela 2. Não foram encontradas diferenças significativas para os valores médios da motilidade espermática ($58,9 \pm 12,74$ vs $63,2 \pm 12,64$; $p=0,6145$), motilidade progressiva ($42,92 \pm 9,47$ vs $38,46 \pm 11,47$; $p=0,5089$), velocidade linear ($77,08 \pm 1,41$ vs $75,1 \pm 1,99$; $p=0,1106$), respectivamente, para os grupos I e II. No entanto, os valores de VAP, VCL, ALH, BCF, STR e LIN foram significativamente diferentes entre os grupos.

Tabela 2 - Valores da média ($\pm$ desvio padrão) da motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), parâmetros da cinética espermática (VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN, RAP) em sêmen bovino não infectado (grupo I) e infectado (grupo II) com BoHV-5.

Parâmetros espermáticos	Grupo I	Grupo II	p-valores
MT (%)	58,90 $\pm$ 12,74	63,20 $\pm$ 12,64	0,6145
MP (%)	42,92 $\pm$ 9,47	38,46 $\pm$ 11,47	0,5089
VAP (μ m/s)	96,40 $\pm$ 2,01 ^a	101,7 $\pm$ 3,29 ^b	0,0145
VSL (μ m/s)	77,08 $\pm$ 1,41	75,10 $\pm$ 1,99	0,1106
VCL (μ m/s)	158,08 $\pm$ 3,38 ^a	175,42 $\pm$ 9,80 ^b	0,0057
ALH (μ m)	6,00 $\pm$ 0,12 ^a	6,92 $\pm$ 0,49 ^b	0,0036
BCF (Hz)	29,82 $\pm$ 0,60 ^a	26,18 $\pm$ 2,70 ^b	0,0188
STR (%)	80,66 $\pm$ 0,85 ^a	74,40 $\pm$ 3,44 ^b	0,0045
LIN (%)	52,2 $\pm$ 0,84 ^a	45,40 $\pm$ 3,21 ^b	0,0018
RAP (%)	56,46 $\pm$ 12,36	60,40 $\pm$ 12,90	0,6303

Os valores seguidos de letras diferentes, na mesma linha, diferem estatisticamente entre si (a e b, $p < 0,05$).

Não houve diferença estatística entre os grupos I e II em relação à integridade da membrana plasmática ($P=0,2462$), acrossomal ($P=0,6089$) e função mitocondrial ($P=0,64$) (Tabela 3), assim como para os oito padrões combinados, a partir da coloração simultânea das membranas.

Tabela 3 - Valores médios da integridade do acrossoma (%), função mitocondrial (%) e membrana plasmática (%) de espermatozóides livre do vírus (grupo I) e expostos ao BoHV-5 (grupo II)

	Integridade acrossomal %	Função mitocondrial %	Integridade da membrana plasmática %
Grupo I	3,3 $\pm$ 0,6	13,3 $\pm$ 5,8	46,3 $\pm$ 9,3
Grupo II	3,7 $\pm$ 1,2	15,3 $\pm$ 8,7	55,0 $\pm$ 6,0

Não houve diferença estatística entre os tratamentos ($P > 0,05$).

Como mostrado na Tabela 4, a coloração para Anexina-V revelou diferença significativa na translocação da PS; o BoHV-5 aumentou a porcentagem de espermatozóides classificados como Anexina-V positiva/PI negativa ($P=0,0005$). A coloração da Anexina-V positiva está ilustrada na Figura 2B e da Anexina-V negativa na Figura 2A.

Tabela 4 - Média ($\pm$ desvio padrão) dos valores para apoptose nos grupos I (controle) e II (infectado) após coloração dos espermatozoides com Anexina-V e iodeto de propídeo

Valores	Grupo I	Grupo II
Anexina V-/PI - (%) (vivos e sem translocação da PS)	41,62 $\pm$ 4,56	37,43 $\pm$ 5,30
Anexina V+/PI - (%) (vivos e com translocação da PS)	22,69 ^a $\pm$ 2,30	42,69 ^b $\pm$ 2,30
Anexina V+/PI + (%) (mortos e translocação da PS)	33,09 $\pm$ 2,00	15,98 $\pm$ 1,30
Anexina V-/PI + (%) (mortos e com necrose)	2,60 $\pm$ 0,30	3,90 $\pm$ 0,30

Na linha, valores de letras diferentes diferem estatisticamente entre si (a e b, $P < 0,05$).

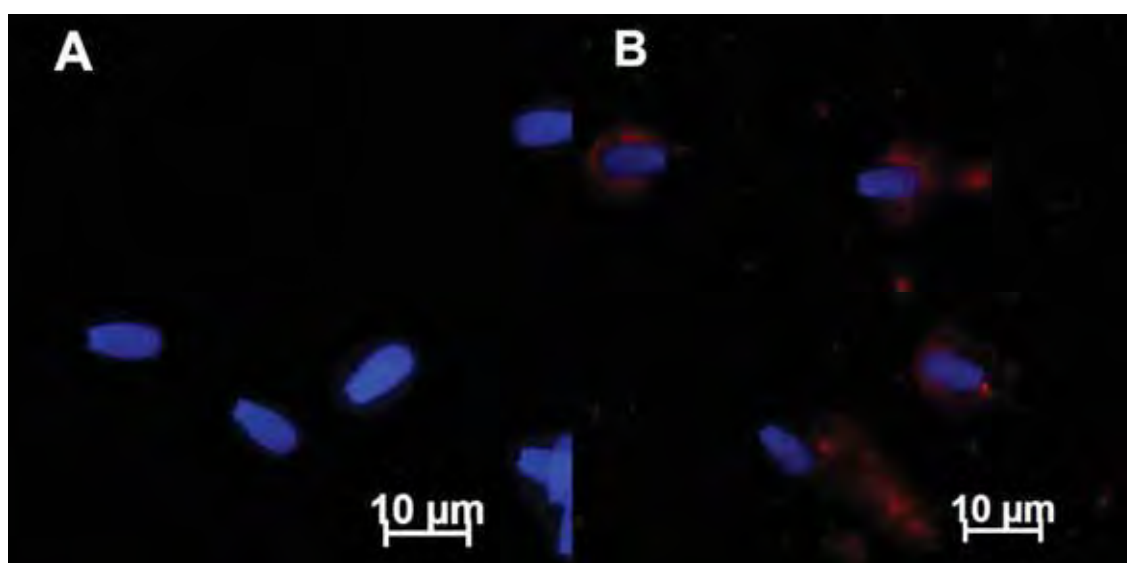


FIGURA 2 - Fotomicrografia da reação de Anexina-V dos espermatozoides de ambos os grupos. A) Espermatozoides revelando marcação negativa para Anexina-V; B) Espermatozoides com o acrossoma positivamente marcado pelo cromógeno Cy3 (538 nm), revelando resultado positivo para Anexina-V.

2.4 Discussão

A inseminação artificial tem revolucionado a pecuária mundial. O sêmen congelado é uma ferramenta importante na reprodução assistida, pois pode ser transportado ao redor do mundo, a fim de melhorar geneticamente o rebanho. A rotina de utilização do sêmen criopreservado pode favorecer a disseminação de vírus envolvidos com doenças venéreas, como o BoHV-1 (TANGHE et al., 2005; WRATHALL et al., 2006). Apesar de outros vírus terem sido isolados no sêmen bovino, o conhecimento sobre a presença e disseminação do BoHV-5 no sêmen comercial precisa ser investigada (DIALLO et al. 2010, ESTEVES et al., 2003; GOMES et al., 2003; KIRKLAND et al., 2009; WRATHALL et al., 2006).

Neste trabalho, partículas viáveis de BoHV-5 foram recuperadas após o isolamento do vírus, similar aos resultados obtidos por Silva-Frade et al. (2010b) e de Diallo et al. (2010), sendo que estes últimos autores relataram recentemente a presença do BoHV-5 no sêmen de touros saudáveis, na Austrália. Além disso, o DNA viral foi observado principalmente na região pós-acrossomal e na cauda dos espermatozóides. Estes achados estão de acordo com a localização descrita para o BoHV-1 (TANGHE et al., 2005). O BoHV-5 provavelmente interage com os espermatozóides, sugerindo que o vírus não somente possa interferir na ligação espermatozóide-zona pelúcida, mas, também, com a etapa posterior à fertilização, semelhante ao que ocorre com o BoHV-1 (TANGHE et al., 2005). Apesar da localização do BoHV-5, Silva-Frade et al. (2010a) demonstraram que a infecção experimental do sêmen com o este vírus não interferiu na fertilização *in vitro* e no subsequente desenvolvimento embrionário. No entanto, Tanghe et al. (2005) observaram uma diminuição na FIV quando o agente etiológico foi o BoHV-1.

A transmissão do BoHV-5, após a inseminação em bovinos com sêmen contaminado, ainda, é desconhecida. Estudos desenvolvidos com o BoHV-1, têm demonstrado que certas cepas virais possuem mais afinidade pelo aparelho reprodutor do que outras (WRATHALL et al., 2006). Este fenômeno ainda não foi estudado para o BoHV-5, provavelmente porque sua principal afecção clínica está caracterizada por sintomas neurológicos e, também, por serem recentes as descobertas envolvendo a reprodução (DIALLO et al., 2010; KIRKLAND et al., 2009). Teoricamente, o BoHV-5 pode ser carregado para o oócito durante a fertilização *in vitro* ou *in vivo*, embora não existam informações suficientes confirmando que o BoHV-5 está presente no interior do espermatozóide e/ou ligado à sua membrana.

A criopreservação do sêmen é parte integrante dos programas de reprodução animal e sua aplicação, em muitas circunstâncias, depende da qualidade espermática, após o processo de congelação-descongelação. Contudo, devido aos danos naturais associados à congelação, os aspectos

funcionais dos espermatozóides criopreservados são significativamente alterados em relação às amostras frescas (WATSON, 2000).

Nenhum relato foi encontrado na literatura consultada visando a comparação de resultados de análises *in vitro* (CASA, integridade das membranas espermáticas e apoptose) com amostras contaminadas e não contaminadas com vírus.

No presente estudo, demonstramos pela primeira vez a influência negativa do BoHV-5 sobre alguns parâmetros da cinética espermática, bem como a utilização de análise computadorizada para avaliação de tais características de movimento, a partir de amostras expostas ao BoHV-5.

Assim, não foram observadas diferenças significativas para a motilidade total, motilidade progressiva, VSL e RAP entre os espermatozóides infectados e não infectados. Porém, os maiores valores obtidos para VAP, VCL e ALH, bem como os menores para STR e LIN, no grupo infectado, foram estatisticamente diferentes do grupo não infectado, significando que a exposição ao BoHV-5 alterou o padrão de movimento do espermatozóides, tornando-o menos progressivo e retilíneo. A linearidade do movimento espermático tem sido relacionada significativamente com a fertilidade em nível de campo (FARREL et al., 1998). Segundo Verstegen et al. (2002), os índices de VCL, LIN e ALH, obtidos através de análise computadorizada, correspondem às características de movimento frequentemente utilizadas para definir o estado de hiperativação espermática em uma amostra de sêmen. Desta forma, a presença do BoHV-5 pode estar promovendo o início do processo de capacitação dos espermatozóides.

A motilidade é um dos parâmetros mais importantes utilizados na avaliação da qualidade do sêmen. Além disso, a avaliação da motilidade espermática fornece informações importantes sobre a reserva energética dos espermatozóides de mamíferos (MUINO et al., 2008). A avaliação das características seminais através do CASA melhora a objetividade e precisão, além da obtenção de outros parâmetros, como a velocidade do espermatozóide e tipo de movimento (KRAUSE, 1995), entretanto, existem poucos relatos

sobre a metodologia em animais domésticos, especialmente na espécie bovina (CONTRI et al., 2010), além da falta de padronização dos resultados para se caracterizar efetivamente a qualidade de uma amostra, tornando-se questionável seu potencial para fertilização *in vitro* e *in vivo*.

As sondas fluorescentes têm sido utilizadas para detectar a integridade estrutural das membranas espermáticas, assim como a conjugação destas para avaliar os vários compartimentos celulares ao mesmo tempo (CELEGHINI et al., 2005). Na prática, têm sido empregadas, principalmente, em estudos relacionados com diferentes diluidores de congelamento de sêmen (AIRES et al., 2003; AMIRAT et al., 2004; MOUSSA et al., 2002), obtendo uma boa correlação com a fertilidade (GIL et al., 2001; JANUSKAUSKAS et al., 2000), porém, no presente trabalho, os mesmos foram empregados pela primeira vez, com a finalidade de analisar amostras de sêmen contaminadas com o BoHV-5.

A avaliação da relação Anexina-V/PI tem sido destacada por muitos pesquisadores. No presente estudo, a porcentagem de espermatozóides com Anexina-V positiva/PI negativa foi superior no sêmen infectado quando comparado ao não infectado. A utilização da Anexina-V em combinação com o PI, permite distinguir células apoptóticas e necróticas de células viáveis (ANZAR et al., 2002). Durante a apoptose inicial, a célula perde sua assimetria de membrana e a fosfatidilserina, que estava restrita ao lado citosólico da membrana, é translocada e exposta na camada externa (MARTIN et al., 1995). No sêmen humano, a translocação da PS pode ocorrer devido à deterioração das funções da membrana, processo apoptótico e/ou uma mudança da membrana plasmática, a qual ocorre durante o processo de capacitação (MARTIN et al., 2005). Thomas et al. (2006), mostraram a ocorrência de translocação da PS em resposta à capacitação induzida em espermatozóides de garanhão, através do uso da Anexina-V. Com base nesses achados, podemos inferir que, após a infecção pelo BoHV-5 ocorra uma desestabilização da membrana plasmática do espermatozóide e/ou o estabelecimento da fase inicial da apoptose.

Assim, tem sido recomendado, após a primeira descrição do BoHV-5 no sêmen de touros, na Austrália, que as amostras de sêmen bovino sejam testadas para o isolamento do vírus e, que, as amostras positivas sejam submetidas às técnicas moleculares para identificar o genoma do BoHV-5; da mesma forma, o sêmen positivo ao vírus deve ser considerado inadequado (DIALLO et al., 2010).

2.5 Conclusão

A infecção experimental do sêmen bovino com BoHV-5 interferiu no tipo de movimento, bem como na estabilidade da membrana plasmática, evidenciando que as partículas virais permanecem ligadas aos espermatozóides, mesmo após a congelação/descongelação.

2.6 Referências

AIRES, V.A.; HINSCH, K.; MUELLER-SCHLOESSER, F.; BOGNER, K.; MUELLER-SCHLOESSER, S.; HINSCH, E. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. **Theriogenology**, v. 60, n.2, p. 269-279, 2003.

AMIRAT, L.; TAINURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C.; GÉRARD, O.; COURTENS, J.L.; ANTON, M. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**, v.61, n.5, p.895-907, 2004.

ANZAR, M.; HE, L.; BUHR, M.M.; KROETSCH, T.G.; PAULS, K.P. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. **Biology of Reproduction**, v. 66, n.2, p. 354-360, 2002.

CARDOSO, T.C.; GOMES, D.E.; FERRARI, H.F.; SILVA-FRADE, C.; ROSA, A.C.G.; ANDRADE, A.L.; LUVIZOTTO, M.C.R. A novel in situ polymerase chain reaction hybridisation assay for the direct detection of bovine herpesvirus type 5 in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Journal of Virological Methods**, v.163, n.2, p. 509-512, 2010.

CELEGHINI, E.C.C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes**. 2005. 186f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2005.

CONTRI, A.; VALORZ, C.; FAUSTINI, M.; WEGHER, L.; CARLUCCIO, A. Effect of sêmen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. **Theriogenology**, v. 74, n.3, p. 424-335, 2010.

DELHON, G.; MORAES, M.P.; LU, Z.; AFONSO, C.L.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; KUTISH, G.F.; ROCK, D.L.; Genome of bovine Herpesvirus 5. **Journal of Virology**, v. 77, N.19, p. 10339-10347, 2003.

DEL MÉDICO ZAYAC, M.P.; LADELFA, M.F.; KOTSIA, F.; MUYLKENS, B.; THIRY, E.; ROMERA, S.A. Biology of bovine herpesvirus 5. **Veterinary Journal**, v.184, n.2, p.138-145, 2010.

DIALLO, I.S.; HEWITSON, G.R.; HOAD, J.; TURNER, S.; CORNEY, B.G.; RODWELL, B.J.; Isolation of bovine herpesvirus type 5 from the semen of a healthy bull in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 88, n.3, p. 93-95, mar. 2010.

ESTEVES, P.A.; DALLAGOSTIN, O.A.; PINTO, L.S.; SILVA, A.D.; SPILKI, F.R.; CIACCI-ZANELLOA, J.R.; HÜBNER, S.O.; PUENTES, R.; MAISONNAVE, J.;

FRANCO, A.C.; RIJSEWIJK, F.A.M.; BATISTA, H.B.C.R.; TEIXEIRA, T.F.; DEZEN, D.; OLIVEIRA, A.P.; DAVID, C.; ARNS, C.W.; ROEHE, P.M. Phylogenetic comparison of carboxy-terminal region of glycoprotein C (gC) of bovine herpesviruses (BoHV) 1.1, 1.2 and 5 from South America (SA). **Virus Research**, v. 131, n.1, p. 16-22, 2008.

ESTEVEES, P.A.; SPILKI, F.R.; FRANCO, A.C.; SILVA, T.C.; OLIVEIRA, E.A.S.; MOOJEN, A.M.; ESMERALDINO, A.M.; ROEHE, P.M. Bovine herpesvirus type 5 in the semen of a bull not exhibiting clinical signs. **Veterinary Record**, v. 152, n.21, p.658-659, 2003.

FARRELL, P.B.; PRESICCE, G.A.; BROCKETT, C.C.; FOOTE, R.H. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. **Theriogenology**, v. 49, n.4, p. 871-879, 1998.

FERRARI, H.F.; LUVIZOTTO, M.C.R.; RAHAL, P.; CARDOSO, T.C. Detection of bovine *Hespesvirus type 5* in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine brain by PCR: a useful adjunct to conventional tissue based diagnostic test of bovine encephalitis. **Journal of Virological Methods**, v. 146, n,1/2, p. 335-340, 2007.

GIL, J.; JANUSKAUSKAS, A.; HAARD, M.C.; HAARD, M.G.M.; JOHANISSON, A; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos-Plus® and Trilady®. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 35, n.2, p. 69-77, 2001.

GOMES, L.I.; ROCHA, M.A.; SOUZA, J.G.; COSTA, E.A.; BARBOSA-STANCIOLO, E.F. Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) in bull semen: amplification and sequence analysis of the US4 gene. **Veterinary Research Communications**, v.27, n.6, p.495-504, 2003.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANISSON, A.; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. **Theriogenology**, v. 53, n.4, p. 859-875, 2000.

KIM, S.H.; YU, D.H.; KIM, Y.J. Apoptosis-like change, ROS, and DNA status in cryopreserved canine sperm recovered by glass wool filtration and Percoll gradient centrifugation techniques. **Animal Reproduction Science**, v. 119, n.1/2, p. 106-114, 2010.

KIRKLAND, P.D.; POYNTING, A.J.; GU, X.; DAVIS, R.J. Infertility and venereal disease in cattle inseminated with semen containing bovine herpesvirus type 5. **The Veterinary Record**, v. 165, n.4, p. 111-113, 2009.

KRAUSE, W. The significance of computer-assisted semen analysis (CASA) for diagnosis in andrology and fertility prognosis. **International Journal of Andrology**, v.18, suppl. 2, p.32-35. 1995.

MARTIN, G.; SABIDO, O.; DURAND, P.; LEVY, R. Phosphatidylserine externalization in human sperm induced by calcium ionophore A23187: relationship with apoptosis, membrane scrambling and the acrosome reaction. **Human Reproduction**, v. 20, n.12, p. 3459-3468, 2005.

MARTIN, S.J.; REUTELINGSPERGER, C.P.M.; MCGAHON, A.J.; RADER, J.A.; VAN SCHIE, R.C.; LAFACE, D.M.; GREEN D.R. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition of overexpression of Bcl-2 and AB1. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 182, n.5, p.1545-1556, 1995.

MAYER, G.; LEMAIRE, M.; ROS, C.; BELÁK, K.; GABRIEL, A.; CASSART, D.; COIGNOUL, E.; BELÁK, S.; THIRY, E. Comparative pathogenesis of acute and

latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. **Archives of Virology**, v.146, n.4, p.633-652. 2001.

McCLURE, R.D.; NUNES, L.; TOM, R. Semen manipulation: improved sperm recovery and function with a two-layer Percoll gradient. **Fertility and Sterility**, v. 51, n.5, p. 874-877, 1989.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M.; Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 57, n.6, p. 1695-1706, 2002.

MUINO, R.; RIVIERA, M.M.; RIGAU, T.; RODRIGUEZ-GILO, J.E.; PENA, A.I. Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. **Animal Reproduction Science**, v. 109, n.1/4, p. 50-64, 2008.

MUYLKENS, B.; THIRY, J.; KIRTEN, P.; SCHYBTS, F.; THIRY, E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Research**, v. 38, n.2, p. 181-209, 2007.

PEREZ, S.E.; BRETSCHNEIDER, G.; LEUNDA, M. R.; OSORIO, F.A.; FLORES, E.F.; ODEÓN, A.C. Primary infection, latency, and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. **Veterinary Pathology**, v. 39, n.4, p. 437-444, 2002.

PEREZ, S.E.; VAGNOZZI, A.; SUR, J.H.; ODRIÓZOLA, E.; CAMPERO, C.M.; ODEÓN, A.C. Retrospective analysis of cases with diagnosis of cerebrocortical necrosis and its relation with type 5 bovine herpesvirus. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 35, n.2, p. 69-73, 2003.

RICCI, G.; PERTICARATI, S.; FRAGONAS, E.; GIOLO, E.; CASANOVA, S.; POZZOBON, C.; GUASCHINO, S.; PRESANI, G. Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. **Human Reproduction**, v. 17, n.10, p. 2665-2672, 2002.

SILVA-FRADE, C.; MARTINS JÚNIOR, A.; BORSANELLI, A.C.; CARDOSO, T.C. Effects of bovine Herpesvirus type 5 on development of in vitro produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 73, n.3, p. 324-331, 2010a.

SILVA-FRADE, C.; GAMEIRO, R.; MARTINS JÚNIOR, A.; CARDOSO, T.C. Apoptotic and developmental effects of bovine *Herpesvirus* type-5 infection on *in vitro*-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v.74, n.7, p.1296-1303, 2010b.

TANGHE, S.; VANROOSE, G.; VAN SOOM, A.; DUCHATEAU, L.; YSEBAERT, M.T.; KERKHOF, P.; THIRY, E.; VAN DRUNEN LITTLE-VAN DEN HURK, S.; OOSTVELDT, P.; NAUWYNCK, H. Inhibition of bovine sperm-zona binding by bovine herpesvirus-1. **Reproduction**, v. 130, n.2, p. 251-259, 2005.

THOMAS, A.D.; MEYERS, S.A.; BALL, B.A. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. **Theriogenology**, v. 65, n.8, p. 1531-1550, 2006.

TRENTALANCE, G.M.; BEORLEGUI, N.M. Sperm evaluation in cryopreserved bovine semen recovered by two selection methods. **Andrologia**, v. 34, n.6, p. 397-403, 2002.

VALERA, A.R.; PIDONE, C.L.; MASSONE, A.R.; QUIROGA, M.A.; RIGANTI, J.G.; CORVA, S.G.; GALOSI, C.M. A simple method of infecting rabbits with Bovine herpesvirus 1 and 5. **Journal of Virological Methods**, v. 150, n.1/2, p. 77-79, 2008.

VARELA, A.P.M.; HOLZ, C.L.; CIBULSKI, S.P.; TEIXEIRA, T.F.; ANTUNES, A.C.; FRANCO, A.C.; ROEHE, L.R.; OLIVEIRA, M.T.; CAMPOS, F.S.; DEZEN, D.; CENCI, A.; BRITO, W.D.; ROEHE, P.M. Neutralizing antibodies to bovine herpesvirus types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) and its subtypes. **Veterinary Microbiology**, v. 142, n.3/4, p. 254-260, 2010.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; OCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, n.1, p. 149-179, 2002.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, n.2, p. 481-492, 2000.

WRATHALL, A.E.; SIMMONS, H.A.; VAN SOOM, A. Evaluation of risks of viral transmission of recipients of bovine embryos arising from fertilization with virus-infected semen. **Theriogenology**, v. 65, n.2 p. 247-274, 2006.

YUE, Z.; MENG, F.J.; JORGENSEN, N.; ZIEBE, S.; NYBOE ANDERSEN, A. Sperm morphology using strict criteria after Percoll density separation: influence on cleavage and pregnancy rates after-in vitro fertilization. **Human Reproduction**, v. 10, n.7, p. 1781-1785, 1995.

CAPÍTULO 3 – ARTIGO

Produção *In Vitro* de Embriões Bovinos com Sêmen Congelado Após Prévia Infecção com Herpesvirus Bovino Tipo 5

RESUMO – O *Herpesvirus* bovino tipo 5 (BoHV-5) é conhecido como o agente etiológico da encefalite em bovinos, tendo sua transmissão natural descrita, recentemente através de sêmen contaminado. Apesar de ter sido identificado no sêmen bovino, sua influência na produção de embriões *in vitro* não foi ainda relatada. O presente estudo teve como objetivo verificar a susceptibilidade de oócitos bovinos maturados e fertilizados *in vitro*, com sêmen congelado, infectado experimentalmente com BoHV-5, antes da congelação, avaliando-se o desenvolvimento embrionário subsequente e o possível carreamento do vírus para o embrião via espermatozóide. Três ejaculados de touro da raça Nelore foram misturados e divididos em dois grupos: Grupo I, sêmen não exposto ao vírus e, Grupo II, sêmen exposto a $10^{2,3}$ TCID₅₀/50µL da cepa brasileira do BoHV-5. A presença do BoHV-5 foi investigada através de PCR e teste de hibridização *in situ* (ISH). Os dados foram analisados através de Teste-*t* de Student com $P < 0,05$ considerado como significativo. A taxa de fertilização e o subsequente desenvolvimento dos embriões foram monitorados às 72, 144 e 168 h pós-inseminação (h pi). O vírus foi detectado em embriões avaliados com 168 h pi. Não houve diferença significativa entre os diferentes grupos de tratamento para as taxas de produção *in vitro* de embriões para os respectivos estágios de desenvolvimento. Assim, conclui-se que, o sêmen contaminado com o BoHV-5 pode infectar os oócitos durante a fertilização *in vitro*, com carreamento do vírus para os embriões, não afetando, porém, o seu desenvolvimento *in vitro*.

Palavras-chave: BoHV-5; preservação do sêmen; hibridização *in situ* fluorescente; desenvolvimento embrionário.

In Vitro Embryo Production Using Frozen Semen Previously Infected with Bovine Herpesvirus Type 5

SUMMARY – Bovine *herpesvirus* type 5 (BoHV-5) is recognized as the ethiological agent of bovine encephalitis and its natural transmission has been recently described via contaminated semen. Despite it has been detected in bull semen, no reports were found in the literature with regard to its influence on in vitro embryo production. The aim of this study was to verify the susceptibility of in vitro matured bovine oocytes fertilized with frozen semen, which was experimentally infected with BoHV-5 before freezing process. The endpoints assessed were the subsequent embryonic development and the possible contamination of zygotes via infected spermatozoa. The ejaculates of three Nelore bulls were mixed and then divided into two groups, as follows: group I, semen not exposed to virus, and group II, semen exposed to $10^{2,3}$ TCID₅₀/50µL of a Brazilian strain of BoHV-5 virus. The presence of BoHV-5 was investigated by PCR and in situ hybridization (ISH) assay. Data were analyzed through use of Student's *t* test with $P < 0.05$ considered as significant. The fertilization rates and embryo development were monitored at 72, 144 and 168 h post-insemination (h pi). The virus was detected in embryos evaluated at 168 h pi. There was no significant difference between groups for the percentages of yielded embryos at any stage of development. Thus, it can be conclude that, sperm that was infected with BoHV-5 can fertilize oocytes during IVF, and zygotes became contaminated by these viruses without compromising their development.

Keywords: BoHV-5; semen preservation; fluorescent in situ hybridization; embryonic development.

2.1 Introdução

A transmissão natural do *Hepesvirus* bovino tipo 5 (BoHV-5), em sêmen contaminado, foi descrita na Austrália (KIRKLAND et al., 2009) e isolado em amostras de sêmen obtidas de touros saudáveis (DIALLO et al., 2010). O *Hepesvirus* tipo 1 (BoHV-1) é o mais investigado, tendo grande impacto econômico na pecuária (MUYLKENS et al., 2007; WRATHALL et al., 2006). Sua ocorrência foi relacionada à rinotraqueíte infecciosa bovina, endometrite, aborto, vulvovaginite pustulosa infecciosa, balanopostite e infecção sistêmica em neonatos. Animais acometidos que sobrevivem ao BoHV-1, e não apresentam sintomas clínicos da doença, albergam o vírus de forma latente nos gânglios sensoriais do sistema nervoso (WRATHALL et al., 2006). Oliveira et al. (2011) detectaram a presença de DNA viral para o BoHV-5 (100%) e BoHV-1 (44,7%) em amostras de sêmen fresco e congelado de touros de centrais de inseminação, em dois estados do Brasil, através da técnica de nPCR.

O sêmen apresenta um risco potencial para a transmissão do BoHV-1, visto que o vírus pode ser carreado por animais clinicamente sadios (WRENZYCKY et al., 2007). Este vírus pode ser encontrado no líquido folicular e em células epiteliais do oviduto bovino, podendo ser liberado no sêmen, após reativação viral, desencadeada por fatores estressantes (D'ANGELO et al., 2009; VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 2000). O vírus replica inicialmente na mucosa do prepúcio, pênis e uretra. Desta forma, o vírus presente nas mucosas infectadas contamina o sêmen no momento da ejaculação (MUYLKENS et al., 2007; WRENZYCKI et al., 2007).

O sêmen utilizado para produzir embriões *in vitro* é selecionado a partir de partidas de sêmen processada em centrais de inseminação artificial credenciadas. Touros lotados nesses centros apresentam certificados negativos para doenças agudas e epidêmicas, como a febre aftosa e, também, para doenças crônicas como a brucelose, tuberculose, leptospirose, campilobacteriose e tricomonose (WRATHALL et al., 2006). Um número crescente de centrais de inseminação também asseguram que seus touros são

negativos para leucose enzoótica bovina, BoHV-1 e para a diarreia viral bovina (BVDV) (WRATHALL et al., 2006).

O BoHV-5 e o BoHV-1 são *alfa-herpesvirus* e possuem 85% de similaridade genômica (CHOWDHURY, 1995). Assim, apesar das escassas informações disponíveis a respeito do BoHV-5, relacionados com o sistema reprodutivo, supõe-se que após a reativação e replicação viral o mesmo possa causar distúrbios reprodutivos em bovinos. O BoHV-5 é caracterizado por uma rápida replicação lítica em cultura de células e, como o BoHV-1, estabelece latência nos gânglios sensoriais do sistema nervoso do hospedeiro (RISSI et al., 2007). A encefalite herpética, considerada a segunda mais importante doença infecciosa cerebral, é causada pelo BoHV-5, afetando grande parte do rebanho bovino na América Latina. Este vírus foi detectado no sêmen bovino (GOMES et al., 2003; KIRKLAND et al., 2009) e em fetos abortados, mas nenhum relato tem mencionado sua presença em oócitos e embriões bovino.

Há pouca evidência de que o uso de sêmen contaminado, por diferentes tipos de vírus, para produzir embriões possa oferecer risco à viabilidade desses embriões (WRATHALL et al., 2006). No entanto, tem sido demonstrado que a infecção experimental de gametas bovinos, no momento da fertilização *in vitro*, com o BoHV-5, produz embriões infectados, sem que ocorra prejuízo para o desenvolvimento embrionário (SILVA-FRADE et al., 2010).

O presente estudo teve como objetivo investigar a susceptibilidade de oócitos bovinos maturados e fertilizados *in vitro*, com sêmen congelado, infectado experimentalmente com BoHV-5, antes da congelação, avaliando-se o desenvolvimento embrionário subsequente e o possível carreamento do vírus para o embrião.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Preparação do vírus e da amostra de sêmen

Estoque do BoHV-5, isolado de bovinos acometidos pela infecção na região de Araçatuba, São Paulo, Brasil, em 2007 (FERRARI et al., 2007) foi propagado em células “Madin Darby Bovine Kidney” (MDBK, ATCC CCL-2) e

cultivado em “minimum essential medium” (MEM). A dose infectante da cultura de tecidos por 50 μ L (TCID₅₀) do estoque do vírus foi determinada por vírus neutralização em células MDBK (CARDOSO et al., 2007). Alíquotas do estoque viral (100 μ L), com $10^{3,3}$ TCID₅₀/50 μ L, foram mantidas em freezer a -86°C até o uso.

Ejaculados de três touros da raça Nelore, com fertilidade comprovada e livre de contaminação viral, foram obtidos através da vagina artificial, de acordo com os procedimentos rotineiros da central de inseminação artificial. As amostras de sêmen foram avaliadas quanto à motilidade, vigor, concentração e morfologia. A seguir, o “pool” de ejaculados foi dividido em duas alíquotas, de igual volume, sendo uma delas submetida ao processo de coincubação com o vírus. Apenas as amostras que apresentaram motilidade progressiva (MP) $\geq$ 60% e morfologia normal ($\geq$ 70%) foram utilizadas.

2.2.2 Coincubação vírus e sêmen e congelação das amostras seminais

O BoHV-5, na titulação de $10^{3,3}$ TCID₅₀/50 μ L foi coincubado com o sêmen, durante 15 min à temperatura ambiente (25°C), ao abrigo da luz. Em seguida, o sêmen foi diluído em Tris-ácido cítrico-frutose (pH 6,8; pressão osmótica $\sim$ 300 mOsm/kg) contendo gema de ovo (20% v/v) e glicerol (7% v/v), resultando numa concentração final de 60×10^6 espermatozóides/mL. A amostra foi envasada manualmente em palhetas de 0,5 mL e mantidas no refrigerador à temperatura constante de 4°C por 4 h. A curva de congelação foi realizada em vapor de nitrogênio líquido, utilizando uma caixa de isopor para o procedimento. As palhetas de sêmen foram mantidas a uma distância de 5 cm acima do nível do nitrogênio líquido por 20 min. Após este período de congelação, as palhetas foram imersas diretamente em nitrogênio líquido e armazenadas em botijão criobiológico.

Antes do processo de criopreservação, as amostras de sêmen fresco foram divididas em dois grupos: I (controle) e II (infectado). O grupo controle foi incubado com 100 μ L de MEM para cada 1 mL de ejaculado, enquanto que o

grupo II foi incubado com 100 µL do estoque de BoHV-5, na mesma diluição usada para o grupo controle (1:10).

2.2.3 Produção *in vitro* de embriões bovinos

Os oócitos foram obtidos a partir de ovários de animais mestiços abatidos no frigorífico Brasfrigo, localizado em Birigui - SP. Os ovários foram transportados para o laboratório no dentro de 1 h *post mortem*, em solução fisiológica a temperatura de 31 a 33°C. Os complexos *cumulus*-oócitos (CCO) foram recuperados através de punção dos folículos com diâmetro de 2 a 6 mm.

A maturação dos oócitos foi realizada de acordo com Martins Júnior e Brackett (1998), com modificações. Oócitos contendo citoplasma homogêneo e pelo menos 3-4 camadas de células do *cumulus* foram lavados (três vezes) e selecionados em meio de maturação base (MM-b), constituído de meio 199 (Sigma Co., St. Louis, EUA), 2,2 mg/mL de bicarbonato de sódio, 50 µg/mL de piruvato de sódio, 50 µg/mL de sulfato de gentamicina e 10% de SFB.

Após a seleção, os oócitos foram transferidos para gotas de 100 µL, dispersas em placa de Petri (35x10mm), sob óleo mineral, contendo MM-b suplementado com 1 µg/mL de FSH (Folltropin-V[®], Bioniche Inc, Canadá), 50 µg/mL de LH (Lutropin[®], Bioniche Inc., Canadá). A incubação foi conduzida em estufa de cultura (Forma Scientific, EUA), em atmosfera úmida, a 5% CO₂, em ar, a 38,7°C, por 24 h.

Após 24 h de maturação, os oócitos foram divididos em dois grupos, transferidos para gotas contendo meio de fertilização *in vitro* (FIV) e inseminadas com sêmen dos Grupos I e II.

Para a realização da FIV, uma dose de sêmen foi descongelada a 37°C por 30 s e centrifugada em gradiente Percoll (45% e 90%; Nutricell[®], Campinas, Brasil) a 700 x g, durante 20 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido, os espermatozóides re-suspendidos em 3 mL de meio TALP e centrifugados (250 x g), por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” diluído em 50 µL de meio FIV (TALP + PHE + heparina). Posteriormente, foi realizada a contagem espermática em câmara de Neubauer (5 µL da

suspensão de espermatozóides em 95 µL de solução formol-salina), bem como avaliada a motilidade e o vigor (microscopia de óptica de luz). Grupos de 20 oócitos foram coincubados com espermatozóides (concentração final de $2,0 \times 10^6/\text{mL}$ x motilidade), em gotas de meio FIV, sob óleo mineral, em atmosfera úmida a 5% de CO_2 , em ar, a $38,7^\circ\text{C}$, por 20 h.

Ao término da etapa de inseminação, as células do *cumulus* foram removidas parcialmente, através de sucessivas pipetagens e os prováveis zigotos, em grupos de 20, transferidos para gotas (100 µL) de meio de cultura SOF-m (modificado). Decorridas 72 horas pós-inseminação (hpi), a clivagem foi verificada e 50% do meio de cultura foi substituído por meio fresco, sendo o procedimento repetido novamente às 120 hpi. A etapa de cultura foi realizada sob as mesmas condições descritas para MIV e FIV.

O desenvolvimento embrionário foi monitorado para verificar os oócitos maturados que fertilizaram e alcançaram os estágios de mórula/blastocisto (Mo/BI) e blastocisto/blastocisto expandido (BI/Bx) às 72, 144 e 168 hpi, respectivamente.

2.2.4 Detecção do vírus

A presença do BoHV-5 e BoHV-1 foi avaliada em todos os reagentes, soro fetal bovino (SFB, Nutricell[®]), hormônio folículo estimulante (FSH, Pluset[®], Calier, Espanha), hormônio luteinizante (LH, Lutropin-V[®], Bioniche Inc., Canadá), sêmen, células (gametas e embriões) e células MDBK, através de PCR, visando o gene da glicoproteína-C. A presença viral em embriões produzidos *in vitro*, em estágio de blastocisto, foi determinada pela técnica de PCR e ISH.

2.2.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O DNA dos embriões foram extraídos com uso de Mini Kit PureLink[™] Viral RNA/DNA (Invitrogen[™], cat # 12280-050), seguindo as recomendações do fabricante. A reação de PCR foi realizada utilizando o sistema GeneAmp[®] High Fidelity (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), resultando um volume final

de 25 µL, composto por 10 µL da amostra de DNA, 2,5 µL de DMSO (dimetilsulfóxido), 10 pmol de cada primer, 10 mM de dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 2,5 µL do tampão 10X GeneAmp® *High Fidelity* e 1,0 µL da enzima GeneAmp® *High Fidelity*. O conjunto de "primers" escolhido foi o B5, específico para o BoHV-5 (5'-CGG ACG AGA CGC CCT TGG-3' nt 322-339) e o consenso, denominado Bcon (5'-AGT GCA CGT ACA GCG GCT CG-3' nt 519-538), capaz de amplificar 159 bp do BoHV-5 (gene da gC).

A reação de PCR seguiu as seguintes condições:

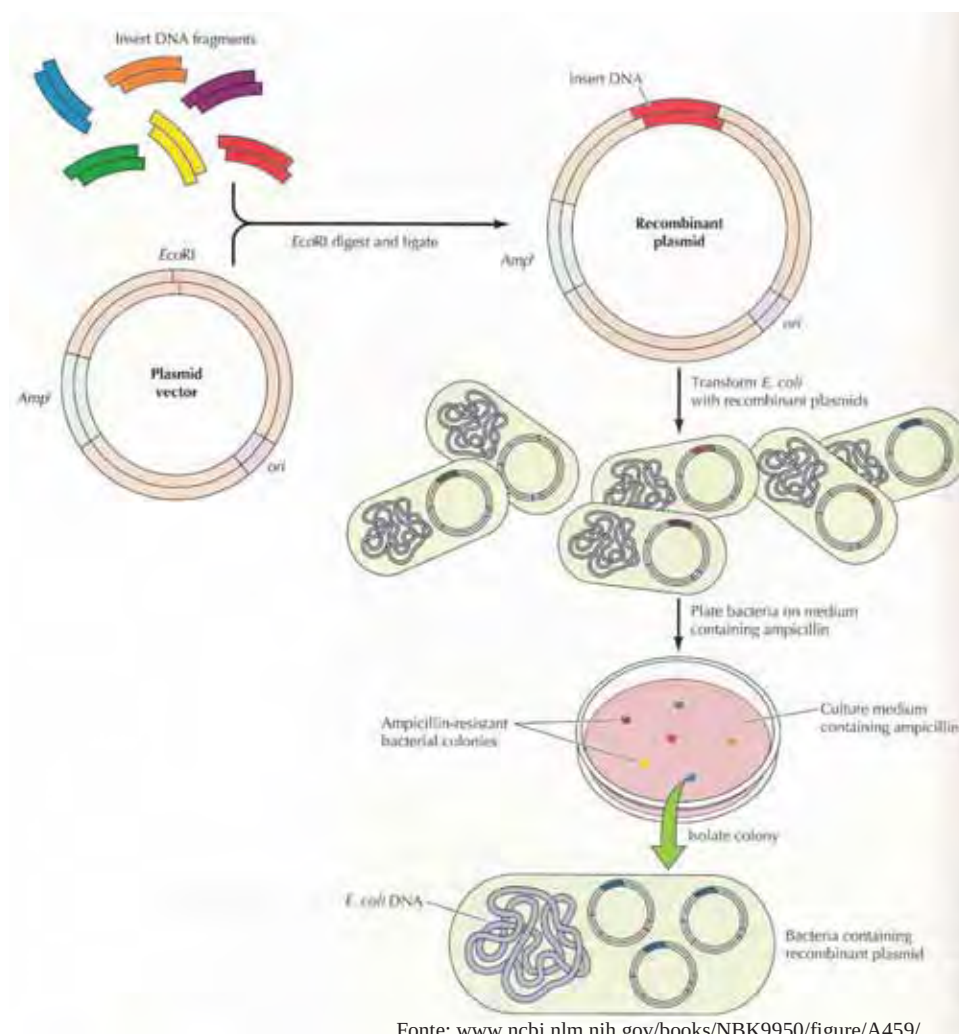
- | | |
|---|-------------|
| 1º. - 94°C durante 5 minutos – desnaturação inicial | |
| 2º. - 94°C durante 15 segundos | |
| 3º. - 55°C durante 30 segundos – anelamento | } 40 ciclos |
| 4º. - 68°C por 1 minuto – extensão | |
| 5º. - Extensão final a 72°C por 5 minutos | |

Os produtos amplificados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1,2%, corados com brometo de etídio (0,5 mg/mL), em tampão TBE pH 8,4, e visualizados sob luz ultravioleta (white/ultraviolet transilluminator – UVP®). As imagens do gel foram captadas pela câmara digital Canon Imagem Quant 150 - Power Shot A640 (GE) e transportadas para o "software" ADOBE 8.0.

2.2.6 Hibridização *in situ*

Para a realização da hibridização *in situ*, a sonda de DNA foi preparada a partir dos produtos da PCR do gene da gC (CHOWDHURI et al., 2000) do DNA viral (FERRARI et al., 2007). Produtos de 159 pares de base (pb) foram produzidos pela técnica de PCR pelos "primers" senso gl + (5` - GTG CTC TTC TCC ATC CCG-3") e anti-senso gl-(5` -GCG GAG GAGGAG TCG TTG G-3") (Invitrogen™, Brasil). Após a purificação do DNA, em gel de agarose, o produto da PCR foi ligado ao TA-vetor (pGEMTEasy, Promega, Madison, WI, EUA) com a ligação dos produtos introduzida em *E. coli*, através de choque térmico.

Colônias positivas foram confirmadas pelo sequenciamento do DNA (Figura 1). A colônia positiva foi cultivada e o DNA do plasmídio foi preparado utilizando um kit disponível comercialmente (Promega Mini-Prep, Promega, Madison, WI, E.U.A.). A sonda foi gerada pela reação de PCR, visando o gene da gC localizado no plasmídio, como descrito anteriormente, com a biotina conjugada ao primer reverso (InvitrogenTM).



Fonte: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9950/figure/A459/

FIGURA 1 - Representação esquemática da técnica utilizada para reprodução do fragmento de DNA (sonda).

Para a realização da técnica de ISH os embriões foram colocados em lâminas de vidro, pré-tratadas com poli-L-lisina pura (Sigma-Aldrich[®]) e fixados com 4% (w/v) de paraformaldeído (Sigma -Aldrich[®]), diluído em tampão fosfato

salina (PBS), por 24 h a 4°C. Os embriões foram lavados (três vezes) antes da fixação em gotas contendo 500 µL de PBS. Antes de iniciar o procedimento de ISH, as lâminas foram tratadas com proteinase K (10 mg/mL, Invitrogen™), durante 10 min. à temperatura ambiente, seguida de lavagem em PBS. A sonda denaturada de 159-pb, ligada à biotina, foi diluída na proporção de 2 µL (2 ng/mL) para 98 µL de tampão pré-hibridação (formamida 50%, 5% soroalbumina bovina, 1% N-lauroilsarcosina e sulfato dodecil de sódio 0,02%). As lâminas com a sonda foram incubadas por 12 h a 37°C, em câmara úmida. Em seguida, foram lavadas em soluções de concentração decrescentes: 1 x SSC (solução salina - citrato de sódio) e 0,1 x SSC, por 10 min. a 42°C. O sistema de detecção consistiu de estreptavidina conjugada à Cy3 (Sigma-Aldrich®, cat # E4142), por 2 h a 37°C, por 20 min., à temperatura ambiente. As lâminas foram cobertas com lamínulas, usando glicerol em solução tamponada (pH 7,0) e, posteriormente, analisadas em microscópio de fluorescência (Axio Image A1, Zeiss), conectado a AxioCam MRc (Carl Zeiss Oberkochen, Alemanha), sendo as micrografias processadas no Axiovision software 4.8.1 (Carl Zeiss).

2.2.7 Análise estatística

As variáveis estudadas foram: infecção pelo BoHV-5 (variável independente, categórica nominal) e produção *in vitro* de embriões bovino (variável dependente, numérica discreta).

As taxas de fertilização e desenvolvimento embrionário foram analisadas utilizando o teste-*t* de Student. $P < 0,05$ foi considerado como diferença estatística.

2.3 Resultados

2.3.1 Infecção experimental com BoHV-5

O gene da gC foi amplificado pela técnica de PCR em embriões oriundos da fertilização *in vitro* com sêmen co-incubado com BoHV-5, sendo possível a visualização dos produtos com 159 pb.

O DNA do BoHV-5 foi detectado pela hibridização *in situ*, conforme a marcação fluorescente positiva nos embriões infectados (Figura 2A). A amplificação do gene e a marcação fluorescente nas células não foram detectadas em nenhuma estrutura do grupo controle (Figura 2B).

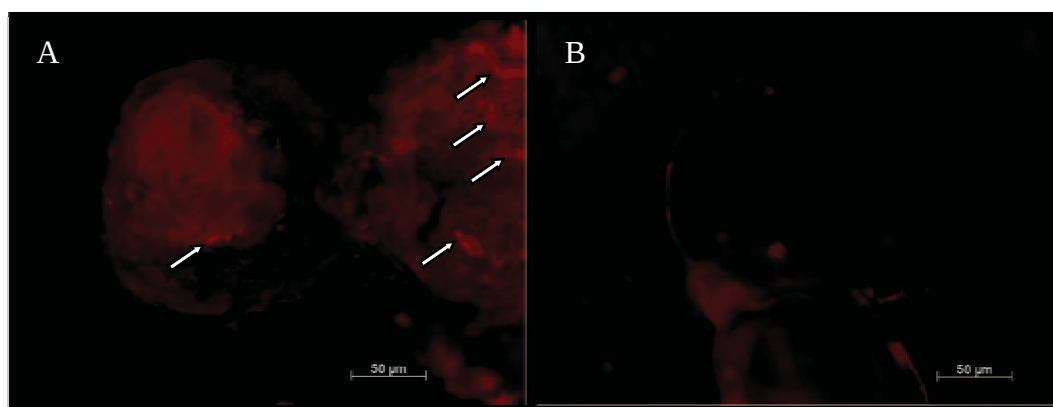


FIGURA 2 - Embriões bovinos oriundos de (A) fertilização com espermatozoides infectados com BoHV-5 e (B) não infectados, às 168 hpi. Os sinais positivos obtidos através de ISH são representados pela marcação fluorescente (setas) (488nm) nos embriões.

2.3.2 Desenvolvimento e produção *in vitro* de embrião

Não houve diferença estatística entre os diferentes grupos de tratamento para o desenvolvimento embrionário ($P>0,05$) (Tabela 1, Figura 3).

Tabela 1 – Resultado (n/%) de desenvolvimento embrionário com sêmen congelado infectado previamente com BoHV-5

Grupos	Número de oócitos	Desenvolvimento embrionário - n (%)		
		Fertilização	Mo/BI/Bx*	BI/Bx/Be*
Grupo I	88	76 (86,4)	39 (44,3)	30 (34,1)
Grupo II	93	75 (80,6)	37 (39,8)	29 (31,2)

*mórula (Mo), blastocisto (BI), blastocisto expandido (Bx) e blastocisto eclodido (Be)
n° de replicatas = 6

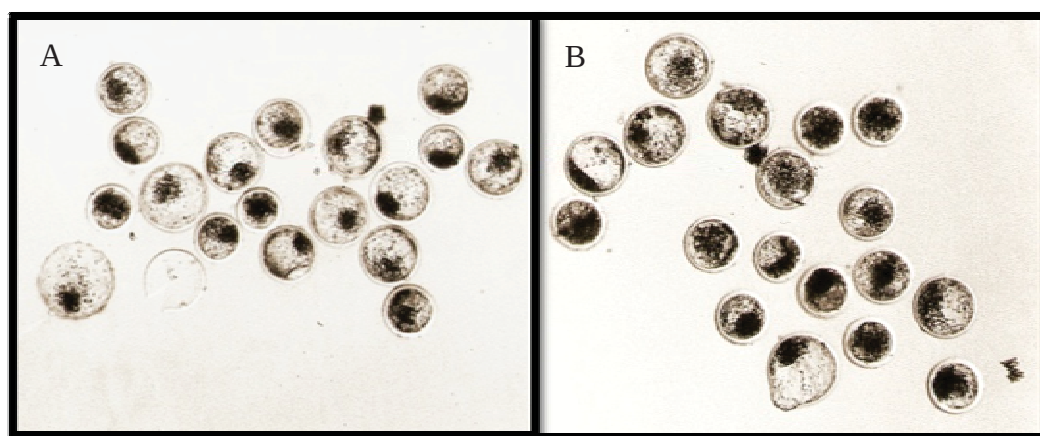


FIGURA 3 - Embriões bovinos 180 hpi, fertilizados com sêmen criopreservado após prévia infecção de BoHV-5, sendo A: controle; B: infectado (25x)

2.4 Discussão

A criopreservação de sêmen é parte integrante dos programas de reprodução animal e sua aplicação em muitas circunstâncias, depende da qualidade espermática após o processo de congelação-descongelação. A utilização do sêmen criopreservado pode favorecer a disseminação de vírus envolvidos com doenças venéreas, como o BoHV-1 (TANGHE et al., 2005; WRATHALL et al., 2006). Apesar de outros vírus terem sido isolados no sêmen bovino, o conhecimento sobre a presença e disseminação do BoHV-5 no sêmen comercial precisa ser investigada (DIALLO et al. 2010; ESTEVES et al.,

2003; GOMES et al., 2003; KIRKLAND et al., 2009; OLIVEIRA et al. 2011; WRATHALL et al., 2006).

De acordo com os resultados de ISH, oócitos fertilizados com espermatozóides infectados experimentalmente foram contaminados também, uma vez que os embriões apresentaram marcação fluorescente, confirmando a presença do DNA do BoHV-5. Silva-Frade et al. (2010) verificaram que a ISH de oócitos, espermatozóides e embriões expostos previamente ao BoHV-5, mostrou-se superior à técnica de PCR, a qual é sensível, mas não possibilita identificar com precisão as células positivas *in situ*.

Devido ao fato de ser o agente viral mais conhecido na esfera reprodutiva, o BoHV-1 tem sido foco dos recentes estudos sobre causas de alterações reprodutivas no rebanho bovino (BROCK, 1998). Apesar da grande similaridade genômica com o BoHV-1, o BoHV-5 encontra-se restrito às enfermidades do sistema nervoso central. Assim, o BoHV-1 pode estar mais adaptado ao sistema reprodutivo do que o tipo 5, o que explicaria as diferenças observadas para o tipo 5 e os dados encontrados na literatura para o tipo 1. Segundo Tanghe et al. (2005) os resultados podem ser influenciados pelo título viral, uma vez que a ligação do espermatozóide à zona pelúcida (ZP), no caso do BoHV-1, diminui concomitante ao aumento do título viral.

Além da adsorção aos gametas, o BoHV-1 pode interferir de forma negativa na fertilização *in vitro*, possivelmente devido ao efeito sobre a penetração espermática ou interação com mecanismos intracelulares de fusão (GUERIN et al., 1990). Na verdade, o BoHV-1 pode reduzir até 60% da ligação do espermatozóide à zona pelúcida (VANROOSE et al., 2000). Guerin et al. (1990) utilizando espermatozóides infectados com BoHV-1, para a produção *in vitro* de embrião, demonstraram uma redução significativa na taxa de fertilização (85% vs 65%). Choi et al. (2008), afirmaram, em estudos com humanos, que modificações nas propriedades elétricas da membrana plasmática podem ser provocadas pelo HIV-1, através de alterações nos gradientes de cátions ou interações com as proteínas da membrana, que modulam os canais iônicos. Entretanto, no presente estudo, os

espermatozóides coíncubados com o BoHV-5 não comprometeram o desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Os espermatozóides prontamente servem como carreadores do gene viral, especialmente para os envelopados, como o *Herpesvirus*, durante a fertilização (NUSSBAUM et al., 1993). Tal fato foi confirmado com o BoHV-5, o qual foi transmitido verticalmente para os embriões através de espermatozóides infectados (Figura 2). A presença do BoHV-5 no sêmen, mostrou que o gradiente de Percoll, nas concentrações adotadas, não possibilitou a remoção do vírus. Esta técnica normalmente é utilizada para reduzir ou eliminar a carga viral no sêmen (MAKAREVICH et al., 2007) .

Contudo, os embriões produzidos a partir de espermatozóides infectados apresentaram desenvolvimento semelhante ao grupo controle, sendo obtidas porcentagens similares às 144 e 168 hpi, em conformidade com os relatos de Silva-Frade et al. (2010), após infecção experimental de gametas bovinos, no momento da fertilização *in vitro*. Espermatozóides expostos ao BoHV-1, durante a FIV, levaram ao comprometimento do desenvolvimento embrionário (MAKAREVICH et al., 2007), além de reduzirem a taxa de clivagem e de formação de blastocistos (VANROOSE et al., 1999).

Os resultados obtidos através da ISH confirmam que a ZP não é uma barreira eficaz para proteger oócitos da infecção pelo BoHV-5, cujo vírus foi carregado pelo espermatozóide no momento da fertilização. A ZP é comumente conhecida pelo seu importante papel na proteção de oócitos e embriões, na etapa pré-implantacional, contra a infecção viral, no entanto, mostrou-se ineficaz na proteção contra o BoHV-1 (MAKAREVICH et al., 2007) o qual pode transpor os grandes poros externos da ZP(180 a 200 nm) (VANROOSE et al., 2000), sendo possível, neste caso, prevenir a infecção das células embrionárias através de sucessivas lavagens com tripsina (MAKAREVICH et al., 2007).

No presente estudo encontramos evidências de que os embriões bovinos são susceptíveis à infecção pelo BoHV-5, a partir do sêmen congelado

previamente contaminado, porém, a infecção dos espermatozóides não comprometeu a produção *in vitro* de embriões.

2.5 Conclusão

O BoHV-5 pode ser carreado para oócitos maturados *in vitro*, a partir do sêmen congelado previamente contaminado, como evidenciado pela técnica de ISH, sem, contudo interferir no desenvolvimento embrionário.

2.6 Referências

BIELANSKI, A.; DUBUC, C. In vitro fertilization and culture of ova from heifers infected with bovine herpesvirus-1 (BHV-1). **Theriogenology**, v.41, n.6, p.1211-1217, 1994.

BROCK, K.V. Quality control for materials of animal origin used in embryo production and transfer. In: STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M.; INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY, **Manual of the International Embryo Transfer Society**. Savoy, I.L.: IETS, 1998. p.151-163.

CARDOSO, T.C.; FERRARI, H.F.; LUVIZOTTO, M.C.R.; ARNS, C.W. Bio-safety technology in production of Bovine Herpesvirus type 5 (BoHV-5) using an alternative serum-free medium. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v.3, n.3, p.125-130, 2007.

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

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, n.2, p.558-568, 1995.

CHOWDHURY, S.I.; LEE, B.J.; ONDERCI, M.; WEISS, M.L.; MOSIER, D. Neurovirulence of glycoprotein C (gC)-deleted bovine herpesvirus type-5 (BHV-5) and BHV-5 expressing BHV-1 gC in a rabbit seizure model. **Journal of Neurovirology**, v.6, n.4, p.284-295, 2000.

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 pre-implantation embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, n.3, p.536-539, 2009.

DIALLO, I.S.; HEWITSON, G.R.; HOAD, J.; TURNER, S.; CORNEY, B.G.; RODWELL, B.J. Isolation of bovine herpesvirus type 5 from the semen of a healthy bull in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v.88, n.3, p.93-95, 2010.

ESTEVEZ, P.A.; SPILKI, F.R.; FRANCO, A.C.; SILVA, T.C.; OLIVEIRA, E.A.S.; MOOJEN, A.M.; ESMERALDINO, A.M.; ROEHE, P.M. Bovine herpesvirus type 5 in the semen of a bull not exhibiting clinical signs. **The Veterinary Record**, v. 152, n.21, p.658-659, 2003.

FERRARI, H.F.; LUVIZOTTO, M.C.R.; RAHAL, P.; CARDOSO, T.C. Detection of bovine *Herpesvirus type 5* in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine brain by PCR: a useful adjunct to conventional tissue based diagnostic test of bovine encephalitis. **Journal of Virological Methods**, v. 146, n.1/2, p. 335-340, 2007.

GOMES, L.I.; ROCHA, M.A.; SOUZA, J.G.; COSTA, E.A.; BARBOSA-STANCIOLO, E.F. Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) in bull semen: amplification and sequence analysis of the US4 gene. **Veterinary Research Communications**, v.27, n.6, p.495-504, 2003.

GUERIN, B.; Le GUIENNE, B.; ALLEITTE, M.; HARLEY, T.; THIBIER, M. Effets de la contamination par le BHV-1 sur la maturation et fécondation in vitro des ovocytes des bovines. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v.166, n.10, p.911-917, 1990.

KIRKLAND, P.D.; POYNTING, A.J.; GU, X.; DAVIS, R.J. Infertility and venereal disease in cattle inseminated with semen containing bovine herpesvirus type 5. **The Veterinary Record**, v.165, n.4, p.111-113, 2009.

MAKAREVICH, A.V.; PIVKO, J.; KUBOVICOVA, E.; CHRENEK, P.; SLEZAKOVÁ, 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, n.4, p.307-315, 2007.

MARTINS JÚNIOR, A.; BRACKETT, B.G. Effects of recombinant gonadotropins on bovine embryo development in chemically defined media. In: SCIENTIFIC MEETING OF THE EUROPEAN EMBRYO TRANSFER ASSOCIATION, 14., 1998, Veneza. **Anais...** Veneza, Itália, 1998. v.14, p.214.

MUYLKENS, B.; THIRY, J.; KIRTEN, P.; SCHYNTS, F.; THIRY, E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Research**, v. 38, n.2, p. 181-209, 2007.

NUSSBAUM, O.; LASTER, J.; LOYTER, A. Fusion of enveloped viruses with sperm cells: interaction of Sendai, Influenza and Semliki Forest viruses with bull spermatozoa. **Experimental Cell Research**, v.206, n.1, p.11-15, 1993.

OLIVEIRA, M.T.; CAMPOS, F.S.; DIAS, M.M.; VELHO, F.A.; FRENEAU, G.E.; BRITO, W.M.E.D.; RIJSEWIJK, F.A.M.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M.

Detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in semen from Brazilian bulls. **Theriogenology**, v.75, n.6, p. 1139-1145, 2011.

RISSI, D.R.; RECH, R.R.; FLORES, E.F.; KOMMERS, G.D.; BARROS, C.S.L. Meningoencefalite por herpesvirus bovinos-5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n.7, p.251-260, 2007.

SEGALÉS, J.; RAMOS-VARA, J.A.; DURAN, C.O.; PORTER, A.; DOMINGO, M. Diagnosing infectious diseases using in situ hybridization. **Swine Health and Production**, v.7, n.3, p.125-128, 1999.

SILVA-FRADE, C.; MARTINS JÚNIOR, A.; BORSANELLI, A.C.; CARDOSO, T.C. Effects of bovine Herpesvirus type 5 on development of in vitro produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 73, n.3, p. 324-331, 2010.

TANGHE, S.; VANROOSE, G.; VAN SOOM, A.; DUCHATEAU, L.; YSEBAERT, M.T.; KERKHOFS, P.; THIRY, E.; VAN DRUNEN LITTLE-VAN DEN HURK, S.; VAN OOSTVELDT, P.; NAUWYNCK, H. Inhibition of bovine sperm-zona binding by bovine herpesvirus-1. **Reproduction**, v. 130, n.2, p. 251-259, 2005.

VANROOSE, G.; NAUWYNCK, H.; VAN SOOM, A.; VANOPDESBOSCH, E.; DE KRUIF, A. Effect of bovine herpesvirus-1 or bovine diarrhea viral on development of in vitro-produced bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.54, n.3, p.255-263, 1999.

VANROOSE, G.; NAUWYNCK, H.; VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M.T.; CHARLIER, G.; OOSTVELDT, P.V.; DE KRUIF, A. Structural aspects of the zona pellucida of in vitro-produced bovine embryos: a scanning electron and confocal laser scanning microscopic study. **Biology of Reproduction**, v.62, n.2, p.463-469, 2000.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M.; MULLAART, E.; DE ROSS, A.P.; MERTON, J.S.; DEN DAAS, J.H.; KEMP, B.; DE RUIGH, L. Effects of different reproduction techniques: AI, MOET, or IVP, on health and welfare of bovine offspring. **Theriogenology**, v.53, n.2, p.575–597, 2000.

WRATHALL, A.E.; SIMMONS, H.A.; VAN SOOM, A. Evaluation of risks of viral transmission of recipients of bovine embryos arising from fertilization with virus-infected semen. **Theriogenology**, v. 65, n.2, p. 247-274, 2006.

WRENZYCKI, C; HERRMANN, D; NIEMANN, H. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. **Theriogenology**, v.68, suppl 1, p.577-583, 2007.

APÊNDICES

Tabela 1 – Diluidor Tris: Meio I

Componentes	Quantidade
Tris	2,42 g
Ácido Cítrico	1,38 g
Frutose	1,00 g
Penicilina GK	0,1000 g
Sulfato de Estreptomicina	0,0500 g
Água Ultra-pura	100 mL/qsp
Volume Final	100 mL

Tabela 2 – Diluidor Tris: Meio II

Componentes	Quantidade
Meio I	73,0 mL
Gema de Ovo	20 mL
Glicerol	7 mL
Volume Final	100 mL

Tabela 3 – Padrões adotados para a análise computadorizada do movimento espermático bovino através do aparelho Hamilton Thorn Research® Ivos-10/EUA

<i>Padrão CASA</i>	
Número de Frames por segundo (Hz)	60
Número de Frames Glicerol	50
Contraste celular mínimo para detecção	60
Tamanho mínimo da célula para detecção (pixels)	6
Intensidade de luz	90
Velocidade mínima de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$)	30
Velocidade progressiva mínima (STR, $\mu\text{m/s}$)	20

Tabela 4 – Iodeto de Propídio (28,707-5, sigma): Solução Trabalho (500 µg/mL)

Componentes	Quantidade
Iodeto de Propídio	5 mg
PBS	10 µL

Tabela 5 – FITC-PSA (L-0770, sigma): Solução de Azida de Na

Componentes	Quantidade
Azida de Na	200 mg
PBS	20,0 µL

Tabela 6 – FITC-PSA (L-0770, sigma): Solução Trabalho (100 µg/mL)

Componentes	Quantidade
Solução de Azida De Na	20,0 mL
FITC-PSA	2 mg

Tabela 7 – JC-1 (T3168, molecular probes): Solução Estoque (7650 µM)

Componentes	Quantidade
JC-1	5 mg
DMSO	1,0 mL

Tabela 8 – JC-1 (T3168, molecular probes): Solução Trabalho (76,5 µM).

Componentes	Quantidade
Solução Estoque de JC-1	50 µL
DMSO	4950 µL

Tabela 9 – Protocolo de Trabalho das Sondas Fluorescentes

Componentes	Quantidade
Sêmen – 50×10^6 espermatozoides/mL	150 μ L
Iodeto de Propídio	3 μ L
JC-1	6-10 μ L (aguardar 15 min.)
FITC-PSA	25-50 μ L

Tabela 10 – Componentes utilizadas na produção *in vitro* de embriões

Componentes	Laboratório	Código
SFB	Gibco	BRL 1043-028
Penicilina	Sigma	P7794
Gentamicina	Sigma	G1264
17- β estradiol	Sigma	E2758
Piruvato	Sigma	P3662
Óleo Mineral	Sigma	M8410
Glicina	Sigma	G6388
Alanina	Sigma	A7627
BSA	Sigma	A6003
Percoll (90% e 45%)	Nutricell	-
Heparina	Sigma	H3149
Penicilamina	Sigma	P4875
Hipotaurina	Sigma	H1364
Epinefrina	Sigma	E4250
CaCl ₂ .2H ₂ O	Sigma	C7902
KCl	Sigma	P5405
KH ₂ PO ₄	Sigma	P5655
MgCl ₂	Sigma	M2393

MgSO ₄ .7H ₂ O	Sigma	M2643
NaCl	Sigma	S5886
NaHCO ₃	Sigma	S4019
NaH ₂ PO ₄	Sigma	S5011
Fenol Red	Sigma	P5530
Meio 199	Sigma	M3769
Ácido láctico 60%	Sigma	L4263

Tabela 11 – Meios para lavagem dos oócitos (ML)

Componentes	50 mL
PBS	45 mL
SFB	5 mL

Tabela 12 - Meio para lavagem espermática (TALP sperm)

Componentes	g/50 mL
Água Mili-Q	50,0 mL
NaCl	0,2920
KCl	0,0116
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,0040
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,0020
NaHCO ₃	0,1050
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,0150
Ácido Láctico	155,0 µL
Phenol red	0,0005
Hepes	0,1190

Tabela 13 - Meio de fertilização (TALP stock).

Componentes	g/50 mL
Água Mili-Q	50,0 mL
NaCl	0,3330
KCl	0,0120
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,0050
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,0023
NaHCO ₃	0,1050
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,0150
Ácido láctico	72,0 µL
Phenol red	0,0005

Tabela 14 – Meio de cultivo (SOF).

Componentes	1 mL
Meio SOF estoque	968 µL
Piruvato	2,0 µL
Gentamicina	5,0 µL
SFB	25 µL