

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CÂMPUS ARAÇATUBA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO
EXPERIMENTAL AO *HERPESVIRUS* BOVINO TIPO 5 EM
EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*.**

Mariana P. C. Brenner

Médica Veterinária

Araçatuba – SP
2012

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

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO
EXPERIMENTAL AO *HERPESVIRUS* BOVINO TIPO 5 EM
EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*.**

Mariana Pontes Carvalho Brenner
Orientadora: Profa. Dra. Tereza Cristina Cardoso

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

Araçatuba – SP
2012

Catálogo na Publicação
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - FOA / UNESP

B838a	Brenner, Mariana Pontes Carvalho Avaliação dos efeitos da exposição experimental ao herpesvirus bovino tipo 5 em embriões bovinos produzidos in vitro / Mariana Pontes Carvalho Brenner. -- Araçatuba: [s.n.], 2012. 063 f.; tab.; il. + CD ROM Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba, 2012. Orientadora: Profa. Dra. Tereza Cristina Cardoso 1. Apoptose. 2. Estresse oxidativo. 3. Atividade mitocondrial. I. T. CDD 636.2
-------	---

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARIANA PONTES CARVALHO BRENNER – nascida em 21 de fevereiro de 1981, na cidade de São Paulo – SP, formada em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – Araçatuba – SP, em 2007. Possui iniciação científica, trabalhou três anos com biotecnologias da reprodução animal na Brenner Biotécnicas Aplicadas à Reprodução LTDA. e no Grupo TOPFIV.

“A esperar pela gente
O futuro está

E o futuro é uma astronave
Que tentamos pilotar
Não tem tempo, nem piedade
Nem tem hora de chegar
Sem pedir licença
Muda a nossa vida
E depois convida
A rir ou chorar...

Nessa estrada não nos cabe
Conhecer ou ver o que virá
O fim dela ninguém sabe
Bem ao certo onde vai dar”

(Toquinho e Vinicius de Moraes)

SUMÁRIO

	Página
I. INTRODUÇÃO.....	8
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	9
Exposição Experimental de Oócitos ao BoHV-5 e Produção <i>in Vitro</i> de Embriões bovinos.....	9
Apoptose – Morte Celular Programada.....	15
III. MATERIAL E MÉTODO.....	23
Reagentes e Meios.....	23
Coleta de Oócitos.....	23
Exposição Experimental <i>in Vitro</i> ao BoHV-5.....	24
Maturação de Oócitos <i>in Vitro</i>	25
Avaliação da Taxa de Maturação Oocitária.....	25
Fecundação e Cultura <i>in Vitro</i>	26
Detecção Molecular do BoHV-5.....	27
Recuperação Viral.....	28
Coloração com MitoTracker Green FM, Jc-1 e Hoechst 33342.....	28
Imunofluorescência Indireta para <i>SOD1</i> , <i>AOP-1</i> , <i>Hsp70.1</i> e Antígenos do BoHV-5.....	29
Determinação dos Genes Transcritos para Superóxido Desmutase (<i>SOD1</i>), Proteína Anti-oxidativa 1 (<i>AOP-1</i>) e Proteína de Resposta ao Choque Térmico (<i>HSP 70.1</i>).....	30
Semi-quantificação e Análise dos Dados.....	31
IV. RESULTADOS.....	32
Avaliação da Taxa de Maturação Oocitária.....	32
Desenvolvimento Embrionário e Detecção Viral.....	32
Expressão da Marcação pelos Corantes MitoTracker Green FM, Jc-1 e Hoechst 33342.....	33

Imunofluorescência Indireta e Determinação dos Genes Transcritos para <i>SOD1</i> , <i>AOP-1</i> , <i>Hsp 70.1</i>	37
V. DISCUSSÃO.....	40
VI. CONCLUSÃO.....	45
VII. REFERÊNCIAS.....	45
APÊNDICES.....	59

ABREVIATURAS

AOP-1 – *antioxidant-like protein 1*

BL – blastocisto

BE – blastocisto eclodido

BoHV-5 – *Herpesvirus* bovino tipo 5

BoHV-1 – *Herpesvirus* bovino tipo 1

BVDV – vírus da diarreia viral bovina

BX – blastocisto expandido

CIV – cultura *in vitro*

COC – complexo *cumulus* oócito

CO₂ – gás carbônico

FIV – fecundação *in vitro*

FSH – hormônio folículo estimulante

IETS – *International Embryo Transfer Society*

LH – hormônio luteinizante

MDBK – *Madin Darby Bovine Kidney*

MEM – meio essencial mínimo

MM-b – meio base de maturação

MIV – meio de maturação

pb – pares de base

PBS – tampão fosfato salina

PCR – *polimerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

PHE – penicilamina, hipotaurina e epinefrina

PIVE– produção *in vitro* de embriões

p/v – peso/volume

PZ – prováveis zigotos

RIFI – reação de imunofluorescência indireta

SFB – soro fetal bovino

SOD – superóxido desmutase

SOF – *synthetic oviduct fluid*

TALP – *tyrode* albumina lactato e piruvato

TCID – *tissue culture infective dose*

TCM – *tissue culture médium*

TE – transferência de embriões

ZP – zona pelúcida

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO EXPERIMENTAL AO HERPESVIRUS BOVINO TIPO 5 EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN VITRO

RESUMO - A produção *in vitro* de embriões é uma biotecnologia da reprodução aplicada rotineiramente no melhoramento genético da espécie bovina. No entanto, ainda não está determinado até que ponto sua utilização pode implicar na disseminação de patógenos, como por exemplo, do *Herpesvirus* bovino tipo 5 (BoHV-5), considerado um α -herpesvirus neurovirulento, potencialmente patogênico em bovinos. Para avaliar o impacto da exposição de oócitos bovinos ao BoHV-5 este estudo avaliou as taxas de desenvolvimento dos embriões bovinos produzidos *in vitro*, a atividade mitocondrial, a ação antioxidante e a resposta ao estresse em dois grupos distintos; grupo controle e grupo expostos ao BoHV-5. A qualidade dos embriões bovinos produzidos *in vitro*, não foi afetada pela exposição ao BoHV-5, a taxa de produção foi de 54,6 % no controle e 49,7% no exposto. O DNA viral correspondente ao gene US9 foi identificado em embriões bovinos no D7 após a fecundação *in vitro* e confirmado por reação imunofluorescência indireta. Os resultados revelaram diferenças ($p < 0,05$) entre embrião do grupo de expostos e controle pelo MitoTracker Green FM, e pelo Jc-1. Não existiu diferença significativa nos índices de Hoechst 33342. Os embriões expostos produziram proteína antioxidante tipo 1 (AOP-1). Nenhum dos grupos produziram a proteína do choque térmico *heat shock protein* (Hsp 70.1). Ambos os grupos produziram a superóxido desmutase (SOD1), revelando atividade mitocondrial intensa, sem interferir na quantidade e qualidade dos embriões produzidos. Esses achados podem ajudar a entender a habilidade do α -herpesvirus em prevenir a apoptose.

Palavras-Chave: Apoptose, Mitocôndria, Estresse Oxidativo

ASSESSMENT OF THE EFFECTS OF EXPERIMENTAL EXPOSURE TO BOVINE HERPESVIRUS TYPE 5 IN BOVINE EMBRYOS *IN VITRO* PRODUCED

SUMMARY - The *in vitro* production of embryos is a biotechnology of reproduction routinely applied in the improvement of the bovine specie. However, it is not yet determined the extent to which its use may result in the spread of pathogens, such as the bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5), considered an α -herpesvirus neuro-virulent, potentially pathogenic in cattle. To assess the impact of exposure of bovine oocytes to BoHV-5 we studied the developmental rates of bovine *in vitro* produced, mitochondrial activity, antioxidant effects, stress response into two distinct groups, control group and group exposed to BoHV-5. The quality of bovine embryos produced *in vitro* was not affected by exposure to BoHV-5, the production rate was 54.6% in the control and 49.7% in the exposure. The viral DNA corresponding to the US9 gene was identified in the D7 bovine embryos after *in vitro* fertilization and confirmed by indirect immunofluorescence reaction. The results revealed differences ($p < 0.05$) between embryo exposed group and control by MitoTracker Green FM, and the Jc-1. There was no significant difference in rates of Hoechst 33342. The exposed embryos produced antioxidant protein type 1 (AOP-1). None of them produced heat shock protein (Hsp 70.1). Both groups produced the superoxide dismutase (*SOD1*), revealing intense mitochondrial activity, without interfering in the quantity and quality of embryos produced. These findings may help understand the ability of α -herpesvirus in preventing apoptosis.

Keywords: Apoptosis, Mitochondria, Oxidative Stress

I. INTRODUÇÃO

Diversas biotécnicas ligadas à reprodução animal têm sido desenvolvidas e aprimoradas no sentido de aumentar a eficiência reprodutiva e, conseqüentemente, maximizar a produção de animais geneticamente superiores (RENESTO, 2004).

A melhoria destas biotécnicas assim como seu maior emprego, possibilitou um aumento na comercialização de embriões, e, portanto, o aspecto sanitário dos mesmos tornou-se uma preocupação crescente. As biotécnicas representam um desafio para o controle da transmissão de patógenos, pois a manipulação excessiva do material, a exposição ao ambiente externo, mudanças no ambiente de cultivo, uso de meios contendo produtos de origem animal e outras variáveis proporcionam um maior risco de contaminação e disseminação de patógenos (STRINGFELLOW et al., 2004). Sendo assim, os procedimentos de transferência de embriões (TE) e de produção *in vitro* de embriões (PIVE) podem facilitar a disseminação de alguns patógenos, os quais podem ser transmitidos ocasionalmente pelo sêmen ou embriões (GARD et al., 2007).

Embora, anualmente seja alto o número de transferência de embriões produzidos *in vitro* em todo o mundo, há uma escassez literária no que se refere à transmissão viral através desta técnica. Alguns investigadores têm demonstrado a transmissão do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) através desta técnica (LINDBERG et al., 2000; DREW et al., 2002; BIELANSKI et al. 2009; LALONDE; BIELANSKI, 2011). Dentre os relatos, o uso de soro fetal bovino (SFB) contaminado foi mencionado como possível origem do vírus, sendo que Xia et al. (2011) identificaram BVDV e outros pestivírus bovinos. Makarevich et al. (2007) observaram comprometimento no desenvolvimento embrionário pré-implantação após exposição ao *Herpesvirus* bovino tipo 1

(BoHV-1) e concluíram que a consequência da infecção viral na viabilidade dos embriões está diretamente relacionada com o título viral.

O *Herpesvirus* bovino tipo 5 (BoHV-5) tem grande analogia genômica com o BoHV-1 (ABDELMAGID et al., 1995, ENGELHARDT; KEIL, 1996), sendo que este afeta a esfera reprodutiva. Devido a esta similaridade é possível que o BoHV-5 tenha tropismo pelo aparelho reprodutivo.

A infecção viral geralmente resulta na alteração dos processos celulares que podem desencadear a morte celular pela via mitocondrial. O sucesso na replicação de muitos vírus depende, portanto, da habilidade em prevenir a indução da apoptose pela via mitocondrial (SCOTT, 2010).

O estresse oxidativo durante a cultura celular tem sido considerado como um dos principais fatores responsáveis por uma produção reduzida e baixa qualidade de embriões *in vitro* (CORRÊA et al., 2008). Porém, ainda pouco se sabe sobre a produção de espécies reativa de oxigênio (ERO) no desenvolvimento de embriões *in vitro*, expostos a vírus durante o cultivo embrionário.

II. REVISÃO DE LITERATURA

Exposição Experimental de Oócitos ao BoHV-5 e Produção *in Vitro* de Embriões bovinos

O contexto atual da evolução na produtividade da pecuária nacional favorece o uso de várias biotecnologias ligadas à reprodução animal. Estas vêm sendo desenvolvidas e aprimoradas no sentido de aumentar a eficiência reprodutiva, maximizando a produção de animais geneticamente superiores,

visando o aproveitamento deste material genético para obtenção do maior número de descendentes em um curto período de tempo (RENESTO, 2004).

Dentre as principais biotécnicas adotadas no Brasil, destaca-se, inicialmente, o emprego da inseminação artificial (IA), utilizada para o melhoramento genético de espécies animais (AX et al., 2000), sendo a primeira biotecnologia adotada no sistema de produção pecuário brasileiro. A introdução de esquemas de ovulações múltiplas, recuperação embrionária e TE, conhecida como *Multiple Ovulation and Embryo Transfer* (MOET), associada à criopreservação de embriões na década de 80, possibilitou à bovinocultura aumentar o número de gestações provenientes de fêmeas de alto mérito genético, aumentando em mais de três vezes o número de descendentes na sua vida reprodutiva (BOLS et al., 1995; RODRIGUES, 2001). A produção embrionária através do protocolo MOET é uma biotécnica mundialmente difundida e vem apresentando um crescimento acentuado onde mais de 500.000 embriões são coletados e transferidos ou congelados anualmente (THIBIER, 2010).

A produção *in vitro* de embriões é considerada a terceira geração de biotecnologia aplicada ao melhoramento genético após a IA e ao protocolo MOET (BOLS et al., 1997; SENEDA et al., 2002). A PIVE foi inicialmente desenvolvida apenas como uma ferramenta de pesquisa, porém, no início da década de 90, com a incorporação da técnica de punção folicular *in vivo* (OPU - *Ovum Pick Up*) tornou-se possível a recuperação de oócitos de animais vivos. Esta tecnologia passou a ser empregada comercialmente, e utilizada para acelerar a multiplicação de animais geneticamente superiores, para impedir o descarte precoce de fêmeas portadoras de alterações adquiridas ou congênitas que impossibilitam a fecundação e para a conservação de germoplasma (GONÇALVES et al., 2007). Na bovinocultura brasileira, essas tecnologias também vêm sendo amplamente utilizadas e adaptadas ao nosso sistema de produção e, ao longo da sua evolução, tem revelado bons índices reprodutivos, confirmando ser um processo economicamente viável (RENESTO, 2004).

O uso de embriões tornou-se amplamente aceito como forma segura, prática e eficiente para transferência de germoplasma, o que proporcionou um aumento na comercialização de embriões. Entretanto, os procedimentos de PIVE e TE podem facilitar a disseminação de alguns patógenos, os quais podem ser transmitidos ocasionalmente pelo sêmen ou embriões (GARD et al., 2007). Portanto, o aspecto sanitário dos mesmos passou a ser uma preocupação crescente. Os métodos de prevenção utilizados para obtenção de embriões livres de patógenos específicos incluem o controle da sanidade desde a doadora até a receptora, controle do sêmen e das etapas envolvidas no processo de congelamento, o emprego de meios livres de patógenos, bem como tratamentos com tripsina dos embriões para reduzir a carga de patógenos. No entanto, as biotécnicas representam um desafio para o controle da transmissão de patógenos, pois a manipulação excessiva do material, a exposição ao ambiente externo, mudanças no ambiente de cultivo, uso de meios contendo produtos de origem animal e outras variáveis proporcionam um maior risco de contaminação e disseminação de patógenos (STRINGFELLOW et al., 2004).

A Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) apresentou dados de 2008, mostrando que aproximadamente 800.000 embriões bovinos foram produzidos e transferidos para receptoras em todo o mundo. Destes, dois terços foram produzidos *in vivo* e um terço *in vitro*. Esses números têm aumentado de forma gradual ao longo dos últimos anos, mas se mantiveram na mesma ordem de grandeza para os últimos 10 anos ou mais, o que resulta, na primeira década do século 21, em aproximadamente 10 milhões de embriões bovinos transferidos de um rebanho de origem para outro rebanho, que pode estar localizado na mesma fazenda que os animais doadores ou fazendas, cidades, estados, regiões e até países ou continentes diferentes (THIBIER, 2010).

Apesar do elevado número de transferência de embriões produzidos *in vitro* em todo o mundo não há relatos de surtos de doenças associados à PIVE-

TE (THIBIER, 2010), embora alguns investigadores já tenham demonstrado a transmissão do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) através desta técnica (BIELANSKI et al. 2009; DREW et al., 2002; LINDBERG et al., 2000; LALONDE; BIELANSKI, 2011). Dentre os relatos, o uso de soro fetal bovino (SFB) contaminado foi mencionado como possível origem do vírus, sendo que Xia et al. (2011) identificaram BVDV e outros pestivírus bovinos. Makarevich et al. (2007) observaram comprometimento no desenvolvimento embrionário pré-implantação após exposição ao *Herpesvirus* bovino tipo 1 (BoHV-1) e concluíram que a consequência da infecção viral na viabilidade dos embriões pode estar diretamente relacionada ao título viral.

Como descrito por Bielanski no artigo 3 do manual da IETS (1998), os embriões de PIVE apresentam maior susceptibilidade para infecções virais quando comparados com os embriões produzidos *in vivo*. Bielanski et al. (1997) concluíram que, comparado com os embriões obtidos *in vivo*, os embriões PIVE possuem uma maior tendência a carrear o BoHV-1, após exposição experimental ao vírus, sendo mais difícil de removê-los por meio do protocolo de tratamento com tripsina recomendado pela IETS (1998). Lavagens e tratamentos com tripsina são utilizados de maneira empírica e seguem o mesmo protocolo utilizado para os embriões produzidos *in vivo*, mas eles não são eficientes para os embriões produzidos *in vitro* (STRINGFELLOW; GIVENS, 2000a), levando a redução na taxa de prenhez, após a transferência (IETS, 1998).

Nos últimos anos foi demonstrado que o BoHV-1 e o BVDV podem estar presentes no soro (KNIAZEFF et al., 1975), fluido folicular (STRINGFELLOW; GIVENS, 2000a) ou células da granulosa de oócitos bovinos (BIELANSKI et al., 1997), assim como nas células da tuba uterina (BIELANSKI; DUBUC, 1994; GIVENS et al. 2002) e nos espermatozoides de touros infectados (GOMES et al., 2003), indicando que animais infectados tem potencial chance de transmitir a doença. Segundo Bielanski et al. (2009) a exposição experimental de embriões bovinos produzidos *in vitro* ao BVDV resultou em baixa taxa de

prenhez após TE e soro-conversão de receptoras. Portanto, o risco de transmissão de patógeno durante o procedimento de PIVE deve ser considerado, uma vez que o vírus pode estar presente em animais aparentemente saudáveis.

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

Em bovinos, o BoHV-1 causa uma diversidade de problemas respiratórios e reprodutivos (vulvovaginites, endometrites, aborto e balanopostite). Em touros, o vírus geralmente replica na mucosa do prepúcio, pênis e uretra. O sêmen é provavelmente contaminado pelo vírus presente na mucosa durante a ejaculação (WRATHALL et al., 2006).

Nussbaum et al. (1993) concluíram que espermatozoides podem facilmente carrear genes virais, especialmente de vírus envelopados como o *Herpesvirus*. Além disso, Bacceti et al. (1994) encontraram partículas virais em zigotos, morfológicamente similares às encontradas nos espermatozoides, demonstrando que, o vírus foi carreado pelos espermatozoides infectados para dentro dos oócitos durante a fecundação.

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 parece não ter efeito na maturação dos oócitos, porém reduziu significativamente a taxa de fertilização. Segundo Bielanski e Dubuc (1994) a proporção de blastocistos morfológicamente normais foi reduzida quando estes foram produzidos no sistema de PIVE, infectado com BoHV-1

Alguns patógenos parecem aderir mais facilmente à zona pelúcida de embriões bovinos produzidos *in vitro* e essas interações podem diferir de um tipo ou subtipo de patógeno (STRINGFELLOW et al. 2004). Isto talvez se deva

a diferenças morfológicas que existem na zona pelúcida (ZP) de embriões bovinos produzidos *in vitro* e *in vivo* (VANROOSE et al., 2000). Sendo que um estudo detalhado dos poros externos da ZP realizado por Vanroose et al. (1999), demonstraram que estes são largos o suficiente para permitir a passagem do BoHV-1 (180 – 200 nm). Também observaram em alguns zigotos fertilizados a formação de escavações e fissuras na zona pelúcida com dimensão exata da cabeça espermática, podendo proporcionar ponto de entrada para o vírus durante a fecundação, além de servir como um potencial local de ligação para o vírus. Nesta localidade o vírus encontra-se protegido contra eventuais medidas sanitárias recomendadas para a PIVE, como por exemplo, lavagens e tratamento com tripsina (KUBOVICOVA, 2008). Desta forma, o procedimento de lavagem com tripsina recomendado pela IETS pode não ser efetivo na remoção de alguns patógenos dos embriões, tais como o BoHV-1 (BIELANSKI; DUBUC, 1994; BIELANSKI et al., 1997; D'ANGELO et al., 2002; D'ANGELO et al., 2008; EDENS et al., 2003; STRINGFELLOW; GIVENS, 2000b; WALDROP et al., 2004).

O BoHV-1 está dentre os vírus que afetam a esfera reprodutiva, o qual apresenta grande similaridade genômica com o BoHV-5, observada por Abdelmagid et al. (1995) e Engelhardt e Keil (1996). Ambos BoHV-1 e BoHV-5 são vírus neurotrópicos que estabelecem latência no gânglio trigeminal (CHOWDHURY et al., 2000). Desta forma, é possível que o BoHV-5, após a reativação viral, tenha tropismo pelo aparelho genital, levando a comprometimentos do aparelho reprodutivo, assim como observado para o BoHV-1. Existem descrições de infecção causada pelo BoHV-5 na Argentina (CARILLO et al., 1983), Brasil (WEIBLEIN et al., 1989), Austrália (STUDDERT, 1989), Estados Unidos (D'OFFAY et al., 1993) e Hungria (ABDELMAGID et al., 1995).

O BoHV-5, vírus DNA de dupla fita, membro da família Herpesviridae e subfamília Alphaherpesvirinae, é o agente etiológico de uma meningoencefalite nos bovinos (RISSI et al., 2007), causador de perdas econômicas significantes

para o gado de corte no sul da América (CARDOSO et al., 2007). Enfermidade que acomete principalmente animais jovens e é geralmente de curso fatal (LOVATO, 1998; ROEHE et al., 1998). Recentemente, o BoHV-5 foi classificado como a segunda maior causa de encefalite letal, em bovinos (SANCHES et al., 2000).

A infecção persistente é a marca da família *Herpesviridae* (PAROLI et al. 2000). Portanto é importante ressaltar que o BoHV-5 pode ser reativado do seu estado de latência e excretado sem sinais clínicos, consistente com uma baixa incidência de embriões apoptóticos derivado de oócitos exposto ao vírus, como demonstrado em estudo prévios (SILVA-FRADE et al. 2010 a e b). Bovinos são considerados hospedeiros naturais de BoHV-5 e animais com infecção latente são reservatórios naturais do vírus, os quais representam uma potencial fonte de infecção para os procedimentos de cultura *in vitro*.

Diversos autores têm relatado a detecção do BoHV-1 no sêmen bovino, pelo o emprego da técnica de reação em cadeia da polimerase ("polymerase chain reaction" - PCR) mas a detecção do BoHV-5 foi descrita pela primeira vez por Gomes et al. (2003). Schudel et al. (1986) e Esteves et al. (2003) isolaram o BoHV-5 de fetos abortados e do sêmen de touros assintomáticos, respectivamente. Recentemente, foi descrito ocorrência de doença venérea após a inseminação artificial, e o BoHV-5 foi isolado a partir do sêmen de touros saudáveis na Austrália (DIALLO I. 2010; KIRKLAND et al., 2009).

Segundo Silva-Frade et al. (2010a) embriões bovinos produzidos *in vitro* a partir de oócitos ou espermatozoides expostos ao BoHV-5 não tiveram a viabilidade afetada e parecem inibir as vias da apoptose. Entretanto os mecanismos responsáveis por esses fenômenos não são bem compreendidos. Souza et al., (2011) expuseram experimentalmente espermatozoides bovinos ao BoHV-5 e realizaram o congelamento do sêmen. Após o descongelamento fizeram análises computadorizada de motilidade e tipo de movimento, avaliaram integridade de acrossomo e de membrana, função mitocondrial, e

expressão da anexina-V e verificaram que não houveram danos funcionais ou morfológicos, portanto este sêmen poderia ser fonte de disseminação de BoHV-5 através de inseminação artificial, MOET-TE e PIVE-TE.

Embriões livres de patógenos podem ser produzidos, porém, não estão estabelecidos os melhores métodos que podem prover tal condição. Para a IETS (1998) são necessárias mais pesquisas sobre a interação de patógenos com a produção *in vitro* de embriões.

Apoptose – Morte Celular Programada

Em meados do século 19, muitas observações indicavam que a morte celular tinha um papel importante durante os processos fisiológicos dos organismos multicelulares, particularmente durante a embriogênese e a metamorfose (LOCKSHIN e ZAKER, 2001). O termo morte celular programada (MCP) foi introduzido em 1964, propondo que a morte celular durante o desenvolvimento não é um acidente da natureza e sim uma sequência de passos programados (LOCKSHIN; WILLIMS, 1965 a, b). O termo apoptose refere-se a características morfológicas e bioquímicas do processo de eliminação celular (FABIAN et al., 2005).

Apoptose é considerada como morte celular autodirigida, baseada num mecanismo genético que caracteristicamente afeta células individuais. Os sinais típicos de apoptose são resultados finais de uma complexa cascata de eventos bioquímicos. É um processo fisiológico ativo no qual há condensação do citoplasma, redução do volume celular, marginação, condensação e fragmentação da cromatina, importantes enzimas são degradadas e o DNA nuclear é fragmentado. Ocorre a formação de vesículas na membrana, denominadas corpos apoptóticos que são submetidas à fagocitose pelas células vizinhas sem processo inflamatório associado (FABIAN et al., 2005; SCHWARTZMAN; CIDLOWSKI, 1993).

A MCP envolve dois mecanismos: intrínseco, dependente da mitocôndria, deflagrado por sinais intra-celulares pró-apoptóticos levando à liberação do citocromo c e ativação das caspases, e extrínseco, no qual ocorre a ligação receptor-ligante levando à ativação das caspases.

A apoptose nos mamíferos tem um importante papel no controle da qualidade do desenvolvimento embrionário, uma vez que, através desse mecanismo são eliminadas células danificadas, não funcionais e anormais (BETTS; MADAN, 2008; PAULA-LOPES; HANSEN, 2002a). Ultimamente a apoptose de células embrionárias tem recebido maior atenção por provavelmente ser a resposta celular a condições sub-ótimas de cultura *in vitro* e ao estresse, sendo que um aumento na incidência de morte celular é um importante indicador de condições inadequadas para o embrião (BETTS; KING, 2001).

Embora a MCP pareça um processo de autodestruição iniciado internamente, atualmente reconhece-se que a cascata de eventos intracelulares que levam à eliminação celular, raramente ocorre em um contexto estritamente endógeno. Dentre as causas de apoptose em embriões (pré-implantação), podemos citar: anormalidades cromossômicas e nucleares, desequilíbrio nos fatores de crescimento e hormônios, exposição a fatores prejudiciais tais como espécies reativas de oxigênio (ERO), radiação ultravioleta e choque térmico (FABIAN et al., 2005; PAULA-LOPES; HANSEN, 2002b). Segundo Vandaele e Van Soom (2011) a qualidade de embriões produzidos *in vitro* é claramente afetada pela qualidade dos gametas e das condições de cultura *in vitro*, mas não há consenso sobre qual fator é mais importante na incidência de apoptose durante o início do desenvolvimento embrionário.

Entre os fatores que podem alterar os padrões fisiológicos de apoptose, a hipertermia tem sido indicada como indutora de teratogênias, pela ativação do processo apoptótico em tecidos embrionários (Brill et al., 1999). Geralmente o estresse celular ativa a via mitocondrial, provocando a

despolarização da membrana da mitocôndria e alterando a razão entre as proteínas pró-apoptóticas e as anti-apoptóticas (HANSEN; FEAR, 2011). A habilidade do embrião de sobreviver a este tipo de injúria pode estar relacionada ao aumento na taxa de apoptose (PAULA-LOPES; HANSEN, 2002), a resposta adaptativa em resposta ao dano celular induzido pelo estresse térmico, ao desenvolvimento de mecanismos termoprotetores bioquímicos, como as proteínas do choque térmico (“Heat Shock Proteins”), antioxidantes (EDWARDS et al., 1997; MALAYER; HANSEN, 1990) e fatores de crescimento como o IGF-I (JOUSAN; HANSEN, 2004).

As proteínas do choque térmico estão presente em todos os organismos, da bactéria ao homem. Alguns membros desta família são estritamente induzidos pelo estresse, designadas HSP, enquanto outras são expressas de forma constitutiva, denominadas HSC. As proteínas do choque térmico têm duas funções principais: primeiramente, sob condições fisiológicas, atua como chaperona, ou seja, participa do enovelamento de proteínas sem fazer parte da estrutura final das mesmas, repara ou promove a degradação de proteínas alteradas. Secundariamente, a produção de HSP é induzida em resposta à injúrias celulares, incluindo a hipertermia, presença de espécies reativas de oxigênio, metais pesados, inflamação e infecção bacteriana ou viral.

Considerando que a resposta ao choque térmico é um mecanismo celular vital de sobrevivência, é compreensível que o interesse nas HSP tenha aumentado em diversos ramos da medicina, como na reprodução e enfermidades infecciosas. Existem quatro famílias de HSP, classificadas conforme o peso molecular em kDa, são elas: 27, 60 70 e 90 kDa. Na reprodução as HSP 60 e 70 são as mais importantes (NEUER et al., 2000).

A produção de HSP aumenta durante a cultura *in vitro* de embriões e estão entre as primeiras proteínas produzidas durante o crescimento de embriões de mamíferos. As HSC são expressas em embriões de duas células, e as HSP, a partir do estágio de blastocisto, sendo que uma progressiva

expressão de HSP está associada com a diferenciação embrionária. A produção de HSP e a apoptose estão intimamente relacionadas uma a outra, ambas são similares como sistemas de suporte responsáveis pelo bom funcionamento dos organismos, bem como resposta celular as injúrias (AI-KATANANI; HANSEN 2002; NEUER et al., 2000).

Os organismos vivos produzem espécies reativas de oxigênio (ERO) durante processos fisiológicos e em resposta a estímulos exógenos, sendo que a cadeia respiratória mitocondrial é a principal fonte consumidora de oxigênio no sistema celular, assim com também é a maior fonte de ERO. A produção de ERO é controlada pelo equilíbrio nas reações de oxidação e redução (*status redox*), um desequilíbrio no *status redox*, promove uma produção em excesso de ERO. Os organismos possuem mecanismos para protegê-los dos danos causados pelas ERO e que atuam para manter o equilíbrio redox. Estes sistemas de defesa antioxidantes incluem antioxidantes não enzimáticos, como as vitaminas A, C, e ácido úrico; enzimas com propriedades antioxidantes, como as catalases, glutathione peroxidase, p.e. AOP-1, superóxido desmutase e tioredoxinas (KNOOPS et al., 1999; TAKAHASHI, 2012).

O estresse oxidativo durante a cultura celular tem sido considerado um dos principais fatores responsável por uma produção reduzida e baixa qualidade de embriões *in vitro*. O desenvolvimento embrionário de mamíferos é negativamente afetado pelo aumento do estresse oxidativo devido provavelmente a lesões resultantes de elevados níveis de ERO, como danos celulares/embrionários por meio da peroxidação de lipídeos, oxidação de proteínas e rupturas do DNA (CORRÊA et al., 2008). Sendo que altos níveis de ERO foram encontrados em embriões não competentes quando comparados a embriões competentes, correlacionado a danos mitocondriais (VELEZ-PARDO et al., 2007).

As ERO também são implicadas como indutoras de apoptose em embriões, na alteração de expressão de genes envolvidos nas vias

metabólicas, no reconhecimento da gestação e de fatores de crescimento (BETTS; MADAN, 2008; FABIAN et al., 2005; PAULA-LOPES; HANSEN, 2002b; STONE; YANG, 2006; TAKAHASHI, 2012). Diversas condições de cultura e fatores externos podem favorecer um aumento na produção de ERO, como temperatura de cultura, traços de cátions metálicos, incidência de luz (visível), tensão de oxigênio (GUÉRIN et al., 2001), composição do meio, suplementação com proteínas, número de embriões presentes na gota e co-cultura com células somáticas (CORRÊA et al., 2008).

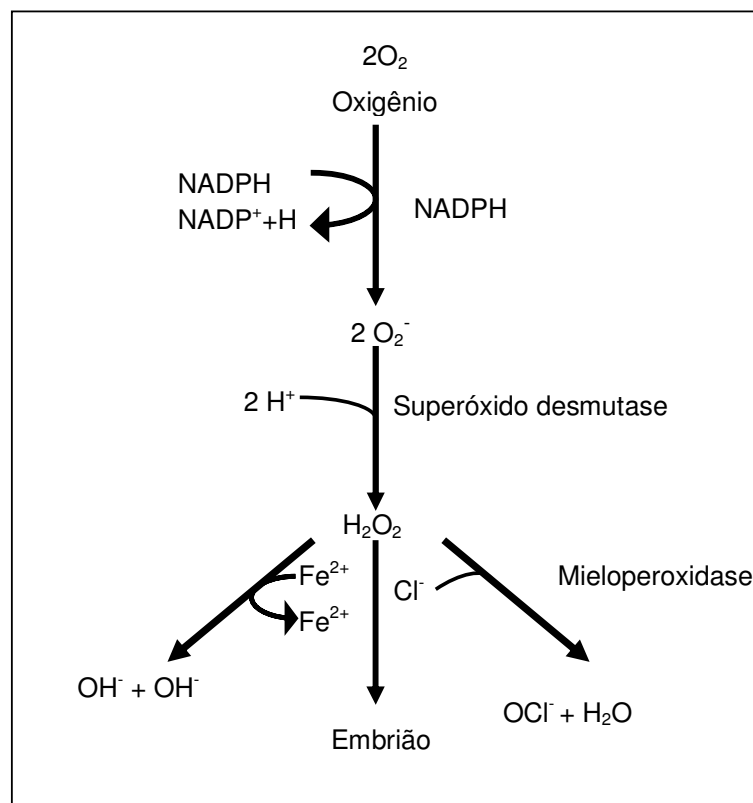


FIGURA 1 - Esquema da reação bioquímica que envolve a produção de espécies reativas de oxigênio (radicais livres).

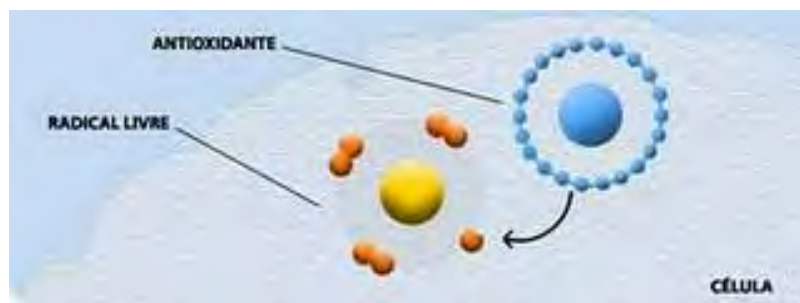


FIGURA 2 - Esquema demonstrando a interação da proteína antioxidante como mecanismo nato do hospedeiro às ERO.

As funções das mitocôndrias nos sistemas de todas as células aeróbicas têm sido amplamente estudadas. Estas organelas são responsáveis pela produção de energia, na forma de ATP, resultante da fosforilação oxidativa, atuam na homeostase redox e do Ca^{2+} , participam das vias metabólicas de ácidos graxos, da ureia e de alguns hormônios e armazenam fatores pró-apoptóticos. É a via intrínseca da MCP (DUMOLLARD et al., 2007; SCOTT, 2010; TARAZONA et al., 2006).

As mitocôndrias têm um comportamento particular durante o desenvolvimento embrionário. Elas são maternalmente transmitidas com ínfima contribuição paterna, quando há, e não se multiplicam até a eclosão embrionária. Durante o desenvolvimento inicial a mitocôndria paterna é degradada pela ubiquitina (ubiquitinação) e eliminada quando o espermatozoide entra no ooplasma. Manter um perfeito funcionamento das mitocôndrias de origem materna é vital para o embrião, pois uma disfunção mitocondrial pode comprometer processos de desenvolvimento e/ou desencadear a apoptose do embrião (DUMOLLARD et al., 2007; JANSEN; DE BOER, 1998; JANSEN; BURTONS, 2004).

Tarazona et al. (2006) observaram que a competência do embrião para se desenvolver nos primeiros estágios é dependente da produção de ATP pela

mitocôndria, e que embriões não competentes tem uma baixa atividade mitocondrial sendo a clivagem bloqueada antes da ativação do genoma.

Segundo Crocco et al. (2011) as mitocôndrias conferem competência a oócitos e embriões, e são portanto, responsáveis por uma reprodução adequada do indivíduo. Embora diferentes padrões de distribuição e atividade mitocondrial sejam descritos em diferentes estágios do desenvolvimento embrionário bovino, este é um parâmetro importante para avaliar a potencial competência de oócitos e embriões (TARAZONA et al., 2006).

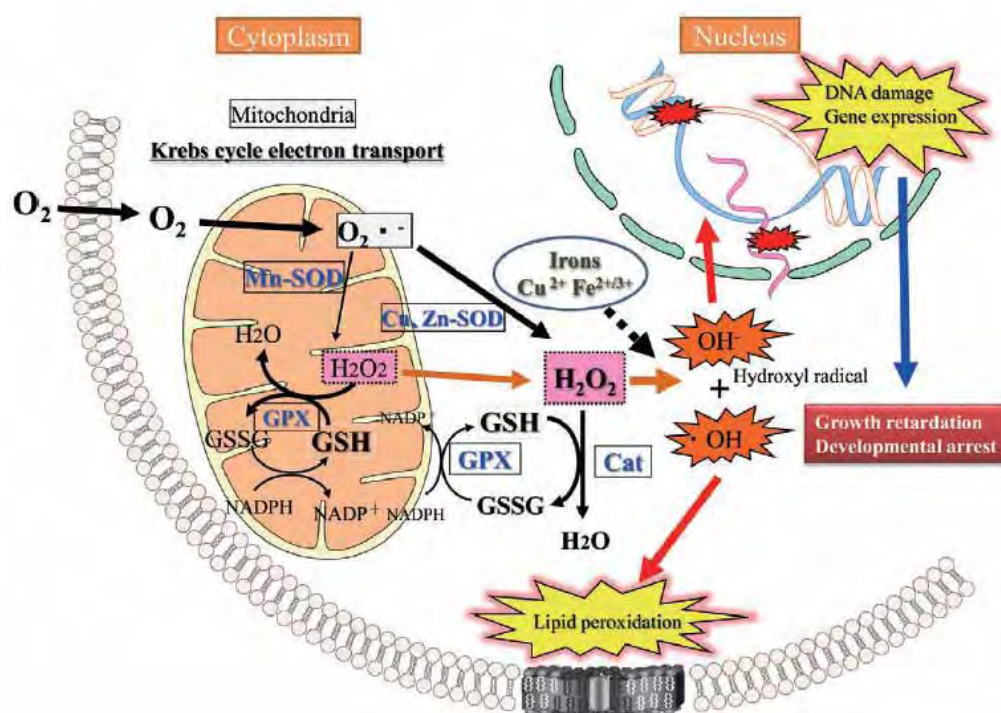


FIGURA 3 - Representação da produção de ERO, reações oxirredução, e atuação da enzima SOD como antioxidante(TAKAHASHI, 2012).

A infecção viral geralmente resulta na alteração dos processos celulares que podem desencadear a MCP pela via mitocondrial. O sucesso na replicação de muitos vírus depende, portanto, da habilidade em prevenir a indução da apoptose pela via mitocondrial (SCOTT, 2010). A manutenção da respiração mitocondrial durante a infecção é essencial para garantir um aporte de ATP que viabilize a replicação viral, enquanto concomitantemente inibe a apoptose induzida pelo estresse oxidativo (TIEDE et al., 2011). A exposição experimental de gametas bovinos ao BoHV-5 levou a infecção de embriões bovinos produzidos *in vitro* sem interferir no desenvolvimento embrionário e provavelmente suprimindo algumas vias da apoptose. Ainda é desconhecido como o BoHV-5 inibe a apoptose ou induz disfunção mitocondrial em embriões bovinos expostos experimentalmente (HAY; KANNOURAKIS, 2002; SILVA-FRADE et al., 2010 a, b).

O objetivo do presente estudo foi avaliar de forma comparativa entre os grupos de oócitos expostos ao BoHV-5 e não expostos (controle), a taxa de maturação oocitária e o percentual de produção *in vitro* de embriões bovinos, detectar a presença do BoHV-5 em embriões bovinos produzidos *in vitro*, avaliar as funções da atividade mitocondrial, ação antioxidante e a resposta ao estresse, na tentativa de elucidar a forma de interação do vírus com o oócito/embrião.

A hipótese é de que a exposição experimental ao BoHV-5 não interfere no desenvolvimento e na viabilidade embrionária, e provavelmente atua no processo de morte celular programada.

Estabelecer como o BoHV-5 interfere nas vias da morte celular não apenas melhora nosso entendimento da patogênese viral, como também representa um potencial avanço do nosso conhecimento no processo normal que controla as vias da apoptose, além de trazer significativa contribuição para a área da PIVE e TE.

III. MATERIAL E MÉTODO

Reagentes e Meios

Exceto indicação contrária todos os produtos químicos foram obtidos da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA) e Invitrogen™ (Grand Island, NY, USA), sempre seguindo as recomendações de uso dos fabricantes. As diluições básicas e os meios de cultura utilizados no presente estudo estão detalhados no apêndice.

Coleta de Oócitos

O estudo foi realizado com dois grupos de embriões produzidos *in vitro* a partir de oócitos não expostos ao BoHV-5 (denominado grupo controle) e oócitos expostos ao BoHV-5 (denominado grupo exposto).

Os oócitos utilizados no experimento foram obtidos de ovários colhidos de fêmeas abatidas em frigorífico, no máximo 30 minutos *post mortem*. O transporte dos ovários foi realizado em garrafa térmica contendo solução fisiológica à 37°C. Os complexos *cumulus*-oócitos (CCO) foram recuperados de folículos com 2 a 8 mm de diâmetro, aspirados com agulha calibre 18G e seringa de 10 mL. O líquido folicular resultante da aspiração foi colocado em tubo cônico de polipropileno de 15 mL e mantido em banho-maria a 37°C, por até 15 minutos, para que ocorresse a sedimentação dos CCO. O tempo transcorrido entre o início e o fim da coleta foi de 30 minutos.

Oócitos que apresentaram citoplasma homogêneo e três ou mais camadas compactas de células do *cumulus* foram lavados por três vezes em

solução PBS (tampão fosfato salina) acrescida de 50µg/mL de sulfato de gentamicina e 10% de soro fetal bovino (SFB).

Após a coleta, grupos de até 100 oócitos foram colocados em criotubos contendo 400 µL de meio base de maturação (MM-b), constituído de TCM-199; 2,2 mg/mL de bicarbonato de sódio, 50 µg/ml de piruvato de sódio, 50 µg/mL de sulfato de gentamicina, suplementado com 1 µg/mL de FSH (Folltropin®-V, Bioniche Inc., Canadá), 5 µg/mL de LH (Lutropin® Bioniche Inc., Canadá) e 10% de SFB (Nutricell Ltda, Brasil), por uma hora.

Exposição Experimental *in Vitro* ao BoHV-5

Foram utilizadas amostras de BoHV-5 isoladas em 2007 a partir de animais acometidos durante um surto em Araçatuba, SP, Brasil (CARDOSO et al., 2007), e propagado em células “Madin Darby Bovine Kidney” (MDBK, ATCC CCL-2), as quais foram cultivadas em meio essencial mínimo (MEM). A dose infectante da cultura de tecidos por 50 µL (TCID₅₀) foi realizada após o cultivo *in vitro* do vírus, na sequência 0,1 m.o.i. (“multiplicity of infection dose” – 10² TCID₅₀/mL) (FERRARI, et al., 2007; MÉDICO-ZAJAC, et al., 2011). Alíquotas do estoque do vírus (100 µL) com 10^{3.3} TCID₅₀/50 µL foram congeladas a -86 °C até o momento do uso.

Aos criotubos contendo os oócitos pré-selecionados, foram adicionados 40 µL de TCM-199, grupo controle, e 40 µL de suspensão viral, oriundas do estoque de vírus, ao grupo exposto. Os criotubos foram incubados por uma hora em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO₂, para permitir a adsorção viral. Encerrado este período, os oócitos foram lavados três vezes em MM-b.

Maturação de Oócitos *in Vitro*

Após as lavagens em MM-b grupos de 15 a 20 oócitos foram colocados em gotas de 50 µL de MM-b, distribuídas em placa de Petri (35x10mm), sob óleo mineral. A gota de cultura foi a unidade experimental do trabalho, foram realizadas 26 repetições, unidades experimentais, para cada grupo em três momentos diferentes. Em cada ocasião foram feitas o mesmo número de gotas para cada grupo, e as placas de cultura foram mantidas na mesma estufa de cultura, sendo assim a mesma situação de cultura era empregada, e se repetiu nas demais ocasiões.

Durante o período de maturação, os oócitos foram mantidos em estufa de cultura, com atmosfera úmida, a 5% CO₂, 38,8°C, por um período de 23 horas, que somados à uma hora da exposição experimental ao BoHV-5, totalizaram 24 horas.

Avaliação da Taxa de Maturação Oocitária

Foram realizados os processos de coleta de oócitos, maturação *in vitro* (MIV) e exposição experimental ao BoHV-5, como descrito anteriormente. Decorridas as 24 horas da etapa de maturação, 100 oócitos de cada grupo, exposto e controle, foram lavados três vezes em gotas de 400 µL de solução de PBS com hialuronidase a 5 µg/mL. A cada lavagem foram realizadas pipetagens sucessivas dos oócitos para promover a remoção das células do *cumulus*, seguidas por três lavagens sucessivas em gotas de 400 µL de PBS. Após as lavagens e a completa remoção das células do *cumulus* os oócitos foram analisados individualmente em microscopia invertida com aumento de 40X, foi avaliada a extrusão do primeiro corpúsculo polar, já que a maturação é caracterizada por este evento.

Fecundação e Cultura *in Vitro*

Foi utilizado na fecundação *in vitro*, sêmen congelado de bovino (*Bos indicus*) em palhetas 0,5 mL, de um único touro. O sêmen foi centrifugado em gradiente de Percoll a 700 x g por 20 minutos. O “pellet” de espermatozoides resultante da centrifugação foi lavado em meio TALP-FERT (“Tyrode” albumina, lactato e piruvato), suplementado com 6 mg BSA por mL, 3 mg/mL de heparina e solução de PHE (2 mM de penicilamina, 1 mM de hipotaurina e 250 mM de epinefrina) e novamente centrifugado a 200X g por 5 minutos. O “pellet” foi diluído em meio TALP-FERT para uma concentração final de 1×10^5 espermatozoide/mL em gotas de 100 μ L. Após 24 horas de maturação, os ooócitos foram transferido para gotas com 100 μ L de meio TALP-FERT. Na fecundação *in vitro* (FIV), oócitos e espermatozoides foram co-incubados por 20 horas. Transcorrido este período, os prováveis zigotos (pz) foram desnudados através de pipetagens sucessivas e colocados em gotas (100 μ L) de meio de cultura *in vitro* SOF (“Synthetic Oviduct Fluid”) até o dia 7 (D7), sendo considerado dia 0 (D0) o dia da fecundação. A taxa de clivagem foi avaliada no dia 3, e o “feeding” realizado, ou seja, de cada gota de cultivo foi removido o volume de 40 μ L e acrescentado 40 μ L de meio fresco de mesma composição. O procedimento de “feeding” foi repetido no dia 5. A FIV e a cultura foram realizadas sob as mesmas condições descritas para a MIV.

O desenvolvimento embrionário foi monitorado, os oócitos fecundados e os estágios blastocisto (BL), blastocisto expandido (BX) e blastocisto eclodido (BE), foram avaliados respectivamente nos dia 3 e 7.

No dia 7 apenas os embriões grau 1 (excelente ou bom) ou grau 2 (bom ou razoável) segundo as instruções da IETS (1998) foram armazenados para análises posteriores. Todas as células não infectadas e reagentes utilizados neste estudo foram testadas para a presença do BoHV-1 e 5 (SILVA-FRADE,

et al., 2010a), a fim de garantir a ausência da contaminação viral de caráter não experimental.

Deteção Molecular do BoHV-5

A detecção do DNA viral foi feita através da técnica de PCR, aplicada para localizar o gene US9 nos embriões do grupo exposto e controle, no líquido folicular, nos oócitos e no sêmen, e em todos os reagentes como descrito previamente (FERRARI et al., 2007). A amplificação correspondente a 250 pares de base (pb) foi gerada com base na sequência da região do US9 (GenBank acesso número AY064172). Procedimentos para purificação do DNA e PCR foram realizados como descrito por (PAROLI et al., 2000). A PCR foi realizado usando 12,5 µL de 2×*Platinum*TaqPolymerase High Fidelity Master Mix, e 10 pmols de cada primer (US9-senso: 5'-AGAGTCCACACAGCGTCGTCAA-3' e US9-consenso: 5'-CTACAGCGAGAGCGACAGCGAGA-3'). Também foram adicionados, 2,5 µL de nucleotídeos e 8 µL de amostra de DNA adicionados ao Master Mix. Para todas as corridas realizadas as amostra foram confrontadas com a referencia positiva (AY064172) e usado controle negativo (água ultra pura) para garantir a fidelidade das reações.

Em um termociclador automático (Eppendorf®, Hamburg, Germany) as reações foram incubadas a 98 °C por 5 minutos, 34 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 60 °C por 1 min, e 72 °C por 2 min, e finalmente 72 °C por 5 min. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,5% (p/v) após coloração com Sybergreen a 0,5 µg/mL de concentração.

Recuperação Viral

Os embriões derivados do grupo exposto e observados durante a produção *in vitro* foram coletados, congelados e descongelados três vezes, para prover a lise celular e permitir a recuperação viral. Monocamadas de cultura de células MDBK com 80% de confluência foram preparadas conforme o procedimento padrão livre de patógenos (SILVA-FRADE et al., 2010b). O período de adsorção foi de 90 min a 38,5°C, quando então meio fresco foi adicionado por sete dias consecutivos às culturas, estas foram examinadas para verificar o efeito citopático, classificado como formação sincicial (CPE). Depois de pelo menos 3 passagens, culturas sem efeitos citopáticos foram consideradas negativas. Quando CPE foi observado, as respectivas células foram removidas e submetidas à titulação e identificação viral. A titulação viral foi conduzida com suspensão de células do grupo exposto em placas de 96 poços previamente semeado com células MDBK. Diluições seriais, de 10^{-2} a 10^{-8} , da suspensão de células do grupo exposto foram preparadas e utilizadas para a titulação do BoHV-5, sendo a análise realizada em triplicata. As placas foram incubadas por uma hora a 38,5°C antes da adição de 100 µL de MEM. As placas foram incubadas por sete dias e examinadas a cada 24 horas para a avaliação de CPE. A infectividade foi calculada de acordo com o método de Spearman-Kärber, como descrito por Ferrari et al. (2010).

Coloração com MitoTracker Green FM, Jc-1 e Hoechst 33342

Para as análises de coloração 30 embriões, por tratamento, foram selecionados aleatoriamente dos grupos controle e exposto, lavados em PBS e fixados com 4% (p/v) de paraformaldeído em lâmina. Foi usado 1 µg/mL de Hoechst 33342 a 38,5°C por 30 minutos para avaliar a qualidade dos embriões.

Os embriões fixados eram novamente lavados com PBS para remover o excesso de Hoechst 33342 e em seguida montado em lâmina com lamínula para contagem do número de núcleos por embrião

O MitoTracker Green FM foi utilizado para localizar e identificar as mitocôndrias, portanto, para avaliar o padrão e a distribuição mitocondrial. O MitoTracker Green FM foi diluído em DMSO a 10 nM por lâmina, aplicado diretamente sobre os embriões fixados, incubado por 10 minutos a 38,5°C. A coloração de Jc-1 (“5,5’, 6,6’-tetrachloro-1,1’, 3,3’-tetraethyl-benzimidazolyl-carbocyanine iodide”), pela emissão de fluorescência verde/vermelha permitiu avaliar atividade, bem como a localização e abundância mitocondrial. Os monômeros Jc-1 foram detectados com filtro verde, enquanto os dímeros de Jc-1 formados na membrana mitocondrial com alto potencial foram detectados com filtro vermelho.

A intensidade de fluorescência foi avaliada em filtro com comprimento de onda de 500 nm, 515 nm, 488 nm e 488 nm para MitoTracker Green FM, Jc-1 filtro vermelho, Jc-1 filtro verde e Hoechst 33342, respectivamente. Para medir a intensidade de fluorescência, as lâminas coradas foram observadas sob luz AxioImager A.1 e microscópio ultravioleta conectado ao AxioCamMRc (Carl Zeiss®, Oberkochen, Germany) e micrografias foram processadas com AxioVision 4.8 software (Carl Zeiss®).

Imunofluorescência Indireta para *SOD1*, *AOP-1*, *Hsp70.1* e Antígenos do BoHV-5

Os embriões (10 por grupos para cada análise) foram lavados três vezes em PBS e fixados em lâminas com 4% de paraformaldeído (p/v em PBS) por 24 h a 4°C. Em seguida as amostras foram lavadas com PBS e permeabilizadas com proteinase K (10 µg/mL) por 15 minutos a temperatura ambiente. Após este tratamento as lâminas foram incubada por 12 h com os anticorpos primários contra o BoHV-5, a superóxido desmutase, proteína anti-

oxidativa 1 e proteína de resposta ao choque térmico (anti-BoHV-5, anti-*SOD1*, anti-*AOP-1* e anti-*Hsp70.1*, respectivamente) diluído em diluente para anticorpo DAKO (S 3022, DAKO®) nas concentrações de 1:2, 1:400, 1:100 e 1:100 respectivamente. As lâminas foram incubadas por 24 h a 4°C com anticorpo secundário (FITC- IgG anti-mouse; Zymed, South San Francisco, CA, USA), na diluição de 1:100 com DAKO®. No controle negativo o anticorpo primário foi omitido. Posteriormente os conjuntos de lâminas e lamínulas foram montadas com 20 µL de solução Faramount Aqueous Mounting Medium (53025, América do Norte Dako®) acrescido de DAPI (1:500).

Determinação dos Genes Transcritos para Superóxido Desmutase (*SOD1*), Proteína Anti-oxidativa 1 (*AOP-1*) e Proteína de Resposta ao Choque Térmico (*Hsp70.1*)

A ocorrência de genes transcritos para *SOD1*, senso 5'-CCCATGAAGCCTTTCTAATCCTG-3' e consenso 5'-TTCAGAGGCGCTACTATTTCCCTTC-3' (acesso n. L22092.1) e *AOP-1* senso 5'-CCTAGGTTATTTAGCGCGT-3' e consenso 5'-TTTCCGCTAGCGCTTATT-3', foi avaliado usando a transcriptase reversa na reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e os produtos amplificados gerados foram de 297 e 310 pares de base respectivamente. A transcrição do gene *HSP 70.1* (acesso n. U09861) senso 5'-AAGGTGCTGGAGTAGGCT-3' e consenso 5'-ACTTGGAAGTAAACAGAAGC-3' gerou um produto amplificado de 312 pb. O kit PureLink® foi utilizado para a extração do RNA total, este foi isolado de amostras de 10 embriões dos grupos controle e exposto, seguindo as recomendações do fabricante. O RNA total foi eluído em 20 µL de água ultra pura e tratado com 0,5 UI de DNase. A RT-PCR foi imediatamente realizada usando 0,5 µg de *primers* (dT).

O “mix” da reação foi constituído de 200 µM de cada dNTP, 1 x RT buffer, 2 µL DTT 0,1 M, 40 UI de inibidor de RNase e 200 UI de SuperScript II. A reação de RT foi realizada a 42 °C por 52 min, com incubação final de 70 °C por 15 min, seguida de PCR conforme já descrito no item detecção molecular do BoHV-5. Os produtos da reação em cadeia da polimerase foram visualizados em gel de agarose 1,5% (p/v) após coloração com Sybergreen a concentração de 0,5 µg/mL.

Semi-quantificação e Análise dos Dados

Os níveis de *SOD1*, *AOP-1*, *Hsp70.1* e de antígeno viral foram semi-quantificados conforme a intensidade da reação de imunofluorescência. Foram empregados dois padrões de filtros: filtro DAPI (emissão de comprimento de onda: 425 nm) foi usado para determinar a qualidade, ao passo que o filtro isotiocionato de fluoresceína (FITC, emissão de comprimento de onda: 512 nm) foi empregado para detectar *SOD1*, *AOP-1*, *Hsp70.1* e antígenos de BoHV-5. Os embriões bovinos foram examinados em duas ocasiões separadas por dois observadores sem conhecimento da classificação anterior. A intensidade da marcação foi semi-quantitativamente graduada em: (-) negativa, (±) mínima, (+) leve, (++) moderado, e (+++) severo.

As imagens foram coletadas no microscópio de luz ultravioleta Axiolmager A.1 conectada ao AxioCamMRc (Carl Zeiss®, Oberkochen, Germany) e micrografias foram processadas com AxioVision 4.8 software (Carl Zeiss®).

As diferenças nos valores médios respectivos foi testada utilizando χ^2 (qui-quadrado) e teste-*t* de para amostras independentes. Os resultados foram expressos como médias $\pm$ SD, valores $p < 0,05$ foram considerados significativos.

IV. RESULTADOS

Avaliação da Taxa de Maturação Oocitária

A taxa de maturação oocitária não diferiu entre os grupos, com se pode ver na tabela 1.

Tabela 1 - Avaliação da taxa de maturação de óocitos bovinos

Grupos	% de óocitos com corpúsculo polar
Controle	92 ^a (92/100)
Exposto	89 ^a (89/100)

^a Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si, pelo teste qui-quadrado.

Desenvolvimento Embrionário e Detecção Viral

O grupo controle foi composto por 405 óocitos não expostos ao BoHV-5, enquanto 417 óocitos compunham o grupo exposto. A exposição viral experimental acarretou diferença ($p < 0,05$) na taxa de clivagem (Tabela 2), mas não causou efeitos significativos no desenvolvimento embrionário incluindo a proporção de óocitos que se desenvolveram até o estágio de embrião (D7), foram considerados na contagem BL, BX e BE, no grupo controle foram obtidos 220 embriões (54,6%) e no grupo exposto 217 (49,7%). Para confirmar a infecção viral, antígenos do BoHV-5 foram identificados pela reação imunofluorescência indireta (RIFI) e PCR. Houve marcação positiva na RIFI para embriões expostos. Apenas a amostra de embriões expostos foi positiva

na PCR (Figura 4B e C, coluna 3). Nenhuma evidência de contaminação por BoHV-5 pôde ser observada nos oócitos (Figura 4C, coluna1), espermatozoides utilizado na fecundação *in vitro* (Figura 4C, coluna 2) e nos embriões oriundos do grupo controle (Figura 4C, coluna 4).

Tabela 2 – Efeito da exposição experimental de oócitos ao BoHV-5 sobre o desenvolvimento embrionário *in vivo*

Grupos	Oócitos (N)	Desenvolvimento Embrionário – N (%)	
		Clivados - D3	Número de embriões D7 (BL, BX e BE) (%)
Controle	405	355 ^a	220 ^a (54,3)
Exposto	417	352 ^b	217 ^a (49,7)

^{a,b} Valores seguidos de letra diferente, na coluna, diferem entre si, pelo teste *t* ($p < 0,05$).

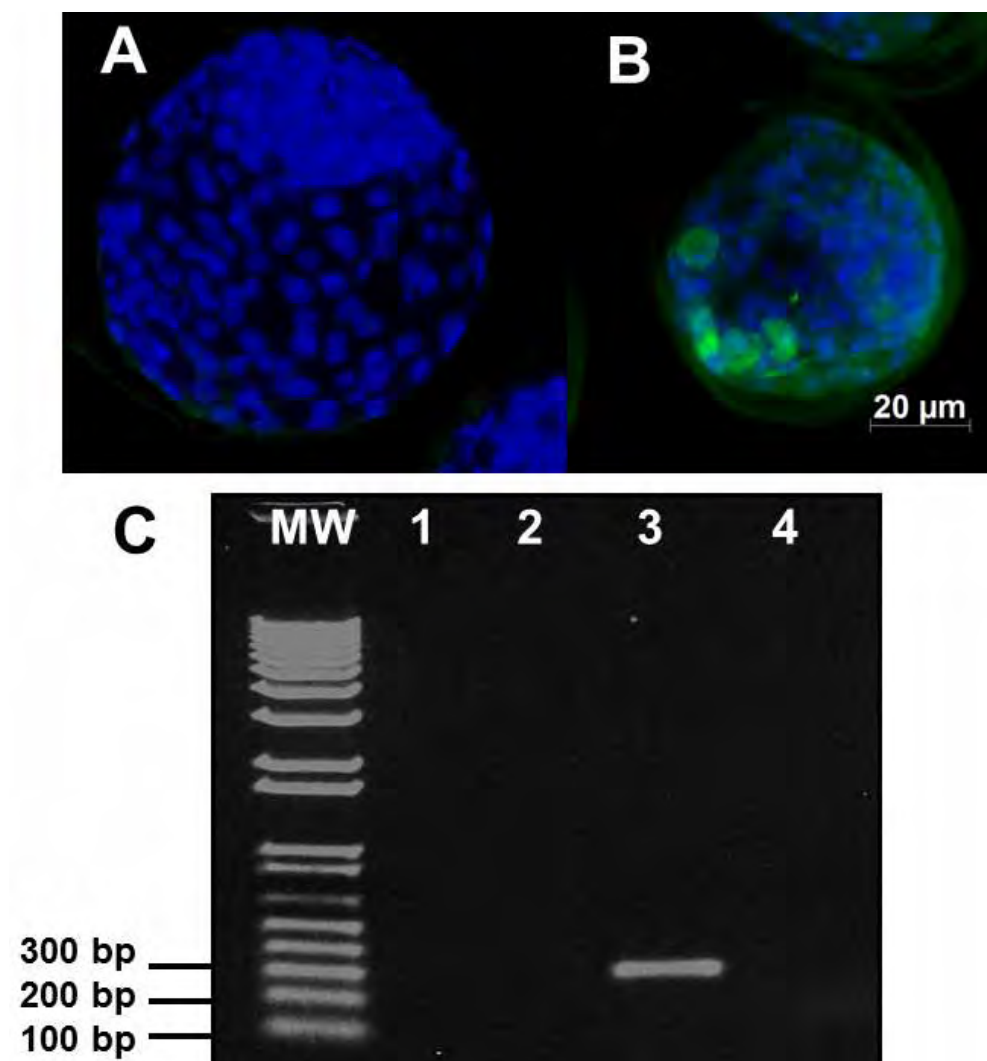


FIGURA 4 - A: Marcação com corante DAPI (emissão de comprimento de onda: 425 nm) sob fluorescência mostrando o número de núcleos em um embrião do grupo exposto. B: Reação de imunofluorescência indireta mostrando marcação para antígenos do BoHV-5 (emissão de comprimento de onda: 512 nm). C: Resultado da eletroforese em gel de agarose, com amplificação pela PCR para US9. “MW: molecular weight”. Colunas 1 e 2 - representam os resultados de oócitos não expostos e do sêmen; coluna 3- amplificação positiva, a partir grupo exposto (250 bp); coluna 4 - amplificação negativa, de embriões do grupo controle.

Expressão da Marcação pelos Corantes MitoTracker Green FM, Jc-1 e Hoechst 33342

A intensidade de fluorescência para a coloração MitoTracker Green FM diferiu ($p < 0,05$) entre os embriões provenientes do grupo exposto ($123 \pm 8,5$) e do grupo controle ($53 \pm 3,9$) (Figura 5; Tabela 3). A intensidade da fluorescência citoplasmática foi mais alta nos embriões do grupo exposto (Figura 5). Os resultados para a marcação ao Jc-1, também diferiram ($p < 0,05$) entre os embriões do grupo exposto ($143 \pm 8,2$) e do grupo controle ($40 \pm 4,5$) (Tabela 3; Figura 5). Não houve diferença significativa entre o número de núcleos corados por Hoechst 33342 nos embriões de ambos os grupos (Tabela 4; Figura 5).

Tabela 3 - Comparação da intensidade de fluorescência entre os grupos controle e exposto após coloração pelo MitoTracker Green FM e Jc-1

Grupos	Número de embriões D7	Intensidade fluorescência de, media, $\pm$ SD	
		MitoTracker Green FM	Jc-1
Controle	30	$53 \pm 3,9^a$	$40 \pm 4,5^a$
Exposto	30	$123 \pm 8,5^b$	$143 \pm 8,2^b$

^{a,b} Valores seguidos de letras distintas diferem entre si, pelo teste t ($p < 0,05$)

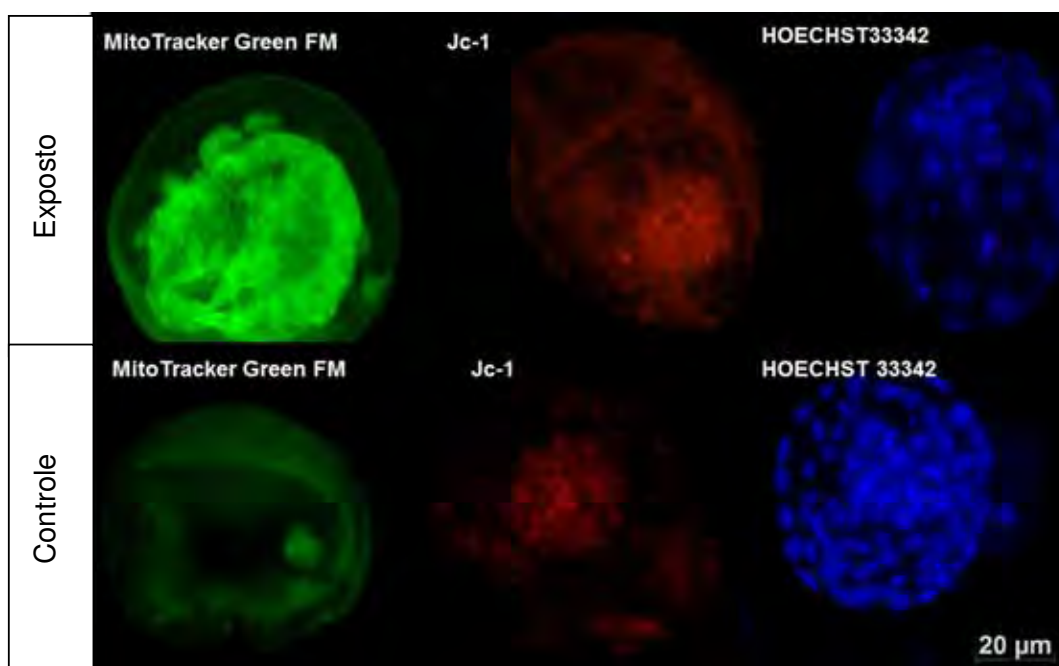


FIGURA 5 - Embriões bovinos (D7) dos grupos controle e exposto. Marcação pelo MitoTracker Green FM sob fluorescência (emissão de comprimento de onda: 500 nm) demonstrando uma marcação intensa da massa celular interna no grupo exposto. Marcação pelo Jc-1 sob fluorescência (emissão de comprimento de onda: 515-488 nm) evidenciando marcação intensa no grupo exposto. Marcação pelo Hoechst 333421 sob fluorescência (emissão de comprimento de onda: 488 nm), não mostrou diferença na qualidade celular entre os grupos controle e exposto.

Tabela 4 - Comparação do número de núcleos em embriões bovinos (D7), dos grupos controle e exposto após coloração Hoechst 33342

Grupos	Número de embriões D7	Número de núcleo/embrião D7, média $\pm$ SD
Controle	30	107 $\pm$ 10,2 ^a
Exposto	30	85 $\pm$ 4,5 ^a

^a Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si, pelo teste *t* (*p*<0,05).

Imunofluorescência Indireta e Determinação dos Genes Transcritos para *SOD1*, *AOP-1*, *Hsp70.1*

A expressão relativa de cada marcador celular e o gene estudado transcrito, *SOD1*, *AOP-1* e *Hsp70.1* está retratado nas Figuras 6 e 7. O grupo exposto apresentou expressão do *SOD1* (Figura 6A-C) em comparação ao grupo controle (Figura 6D-E). A transcrição do gene *SOD1* apenas foi detectada no grupo exposto (Figura 6F; coluna 3). Os antígenos de *AOP1* foram detectados em embriões expostos. Entretanto, a transcrição do *AOP-1* foi observada em ambos os grupos (Figura 7F, linhas 3 e 4). Nos presente estudo, não houve detecção da proteína *Hsp70.1*.

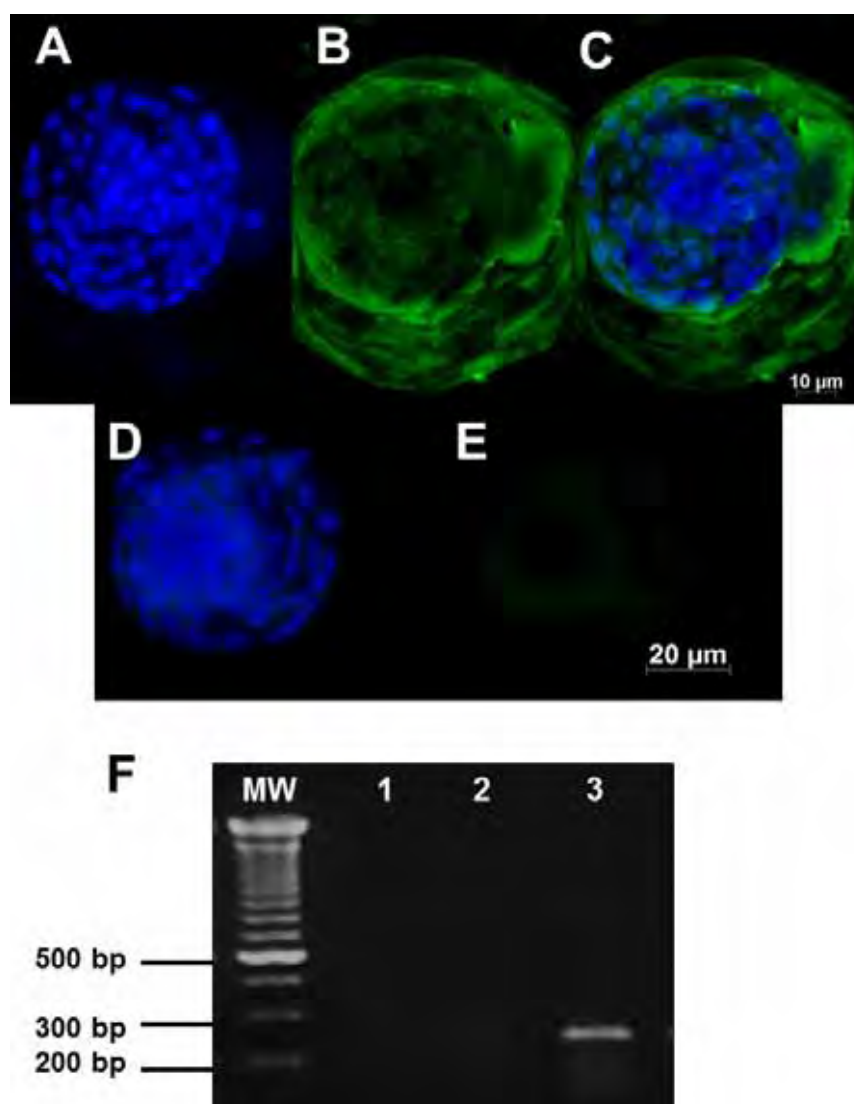


FIGURA 6 – Micrografia mostrando embriões bovinos (D7) examinados sob fluorescência (FITC, comprimento de onda: 512 nm), para *SOD1*. A-C: Grupo exposto mostrando marcação positiva severa (+++). D-E: Grupo controle mostrando marcação positiva de moderada (++). F: Resultado da eletroforese em gel de agarose, com amplificação pela RT-PCR para *SOD1*; MW-“molecular weight”. Coluna 1 - representa o resultado da RT-PCR para água ultra pura, usada como controle negativo; coluna 2 - amplificação negativa a partir de embriões do grupo controle; coluna 3 - amplificação positiva a partir de embriões do grupo exposto (297 bp).

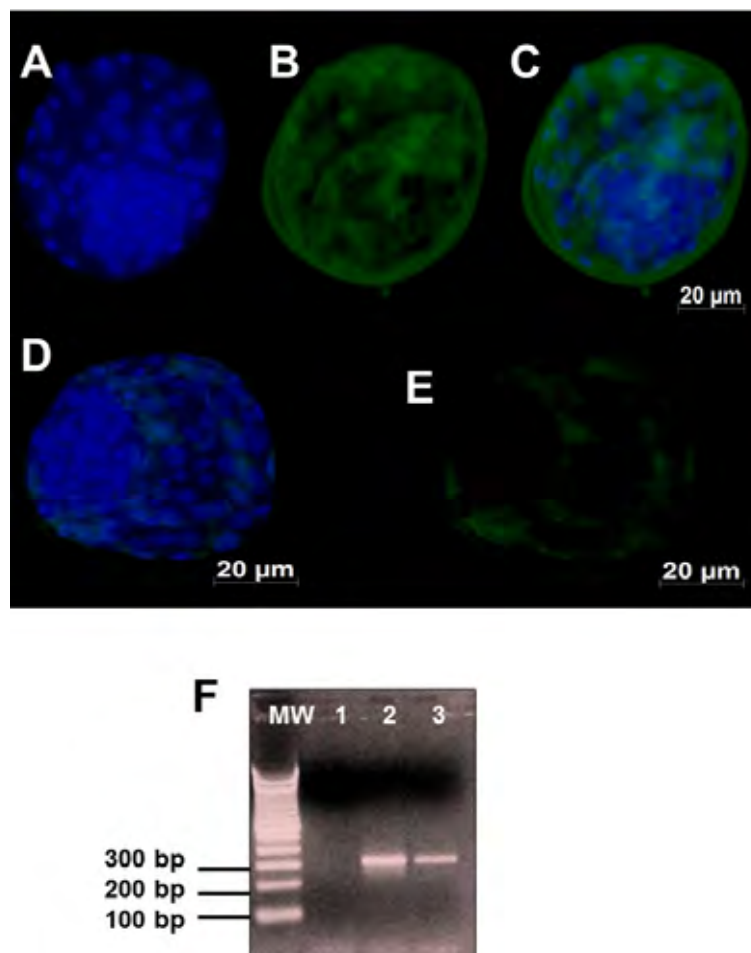


FIGURA 7 – Micrografia mostrando embriões bovinos (D7) examinados sob fluorescência (FITC, comprimento de onda: 512 nm) para *AOP-1*. A-C: Grupo exposto mostrando severa (+++) intensidade de sinal. D-E: Grupo controle mostrando moderada (++) intensidade de sinal. F: Resultado da eletroforese em gel de agarose, com amplificação pela RT-PCR para *AOP-1*; MW-“molecular weight”. Coluna 1 - representa o resultado do RT-PCR de água ultra pura, usada como controle negativo; coluna 2 - mostra amplificação positiva pela RT-PCR (310bp) a partir de embriões do grupo controle; a coluna 3 - mostra uma amplificação positiva pela RT- PCR (310bp) a partir de embriões grupo exposto.

V. DISCUSSÃO

No presente estudo a exposição experimental ao BoHV-5 não afetou a taxa de maturação oocitária, interferiu na taxa de clivagem/FIV durante o processo de produção *in vitro* de embriões bovinos, mas não interferiu na produção final de embriões. Estes resultados são compatíveis com resultados anteriores, onde não foi observado efeitos da exposição experimental de oócitos ao BoHV-5 no desenvolvimento de embriões embora a taxa de FIV tenha sido afetada. Silva-Frade et al. (2010a) constataram que óocitos e espermatozoides expostos experimentalmente ao BoHV-5 transmitiram verticalmente o vírus, sem comprometer o desenvolvimento embrionário.

Os resultados do presente estudo diferem dos relatos de literatura usando o BoHV-1, uma vez que espermatozoides ou oócitos exposto experimentalmente ao BoHV-1, reduziram significativamente a taxa de clivagem e a produção *in vitro* de embriões (GUERIN et al., 1990; MAKAREVICH et al., 2007; VANROOSE et al., 1999).

Existe grande similaridade genômica entre o BoHV-1 e o BoHV-5, sendo que até 1992 o BoHV-5 era considerado como uma variedade neuropatogênica do BoHV-1, quando o Comitê Internacional de Taxonomia reconheceu o BoHV-5 como um vírus diferente. O BoHV-1 é comumente conhecido por causar alterações na esfera reprodutiva e o BoHV-5 por causar meningoencefalite nos bovinos (ABDELMAGID et al. 1995; ENGELHARD; KEIL, 1996; RISSI et al. 2007). O BoHV-1 deve estar mais adaptado ao sistema reprodutivo do que o tipo 5. Isto pode explicar as diferenças encontradas no presente estudo com o tipo 5 e os dados de literatura para o tipo 1.

A hipótese de que o BoHV-5 causa danos na esfera reprodutiva, especificamente no desenvolvimento embrionário *in vitro*, não foi confirmada já que não houve redução na PIVE e nem prejuízo à qualidade embrionária.

Ambos os grupos, controle e exposto, não diferiram quanto ao número de núcleos marcados por Hoechst 33342. Contudo é importante ressaltar que o vírus foi capaz de infectar oócitos e se perpetuar nos procedimentos de PIVE, gerando embriões de morfologia saudável que podem ser empregados na TE. Considerando que no Brasil as doadoras de oócitos não são examinadas para este tipo de enfermidade e que a infecção persistente é a marca da família *Herspesviridae* (PAROLI et al., 2000), é possível que uma doadora seja portadora de BoHV-5, tenha oócitos infectados, destinados à PIVE, originar embriões morfolologicamente saudáveis e infectados que serão transferidos para receptoras, e assim o BoHV-5 pode ser disseminado para outros rebanhos.

A reativação do BoHV-5 em animais com infecção latente pode ocorrer em resposta a estímulos naturais ou após tratamento com glicocorticoides. Ocorre então a replicação viral que pode levar à excreção e disseminação do vírus para animais próximos (MÉDICO-ZAJAC et al. 2009). A replicação bem sucedida do vírus dentro da célula requer uma notável cascata de interação entre vírus e hospedeiro. Muitos vírus têm como parte de seu arsenal a habilidade de modular o metabolismo celular para produzir partículas virais. Tanto o vírus quanto o embrião necessitam das organelas para a replicação e para o desenvolvimento, respectivamente, portanto problemas intrínsecos e extrínsecos podem levar ao bloqueio do desenvolvimento embrionário (GRIFFIN et al. 2010; HAY; KANNOURAKIS, 2002; MEIRELLES et al. 2004; PAROLI et al., 2000; SCOTT, 2010).

Dentre as organelas, uma de extrema importância são as mitocôndrias, responsáveis pela produção de energia, em forma de ATP, resultante da fosforilação oxidativa, que também tem como resultado a produção de ERO. Além disso, atuam na homeostase redox e de íons, participam das vias metabólicas de ácidos graxos, da ureia e de alguns hormônios, armazenam fatores pró-apoptóticos, é a via intrínseca da MCP. (DUMOLLARD et al., 2007; SCOTT, 2010; TARAZONA et al., 2006).

No que se refere à reprodução, as mitocôndrias são importantes por conferir competência a oócitos e embriões, e também uma adequada reprodução. Embora o conceito de competência do desenvolvimento ainda não esteja claro (TURCOTTE, 2003), a mitocôndria pode ser usada como parâmetro para entender o desenvolvimento inicial de embriões bovinos e prever a potencial competência de embriões e de óocitos bovinos (TARAZONA et al., 2006). Reunindo estas informações e o fato da mitocôndria ser utilizada pelo vírus na replicação viral, avaliamos a atividade mitocondrial nos grupos.

No presente estudo encontramos uma maior intensidade de fluorescência à sonda MitoTracker Green FM, assim como a marcação do Jc-1, entre os embriões do grupo exposto. Estes dois corantes são considerados importantes para mensurar a atividade mitocondrial quantitativamente e qualitativamente. A mitocôndria não é capaz de multiplicar-se até a eclosão embrionária. Essa organela é responsável pela produção de energia até que o genoma do embrião seja ativado. No grupo exposto o embrioblasto foi fortemente marcado pela sonda MitoTracker Green FM e pela Jc-1, sendo que esta coloração também marcou mais intensamente o trofoblasto. Estes padrões são considerados fisiológicos, uma vez que células trofoblásticas começam a expressar proteínas de adesão e outras moléculas importantes para o reconhecimento materno do embrião (TARAZONA et al., 2006). A coloração com Jc-1 também nos mostrou que há integridade nas mitocôndrias marcadas. Uma provável explicação da intensa atividade mitocondrial entre os embriões do grupo exposto é que a replicação viral demanda mais energia que o usual, entretanto esta atividade parece não interferir no desenvolvimento embrionário. Reunindo esses achados, é possível sugerir que a exposição de embriões ao BoHV-5 aumenta a atividade mitocondrial sem nenhum dano fisiológico a estas organelas. Esta é uma das características mais importantes entre a família *Herpesviridae* (GRIFFIN et al., 2010; PAROLI et al., 2000).

Espécies reativas de oxigênio provavelmente atuam como sinalizadores intermediários do mecanismo de apoptose e parecem estar envolvidas na causa e progressão de diversos eventos reprodutivos, tanto em seres humanos quanto em animais, como na fecundação e no desenvolvimento embrionário inicial (BALASUBRAMANIAN et al., 2007; HAY; KANNOURAKIS, 2002; SCOTT, 2010; TIED et al., 2011). Recentemente, tem sido proposto que o estresse oxidativo é responsável por causar mortalidade embrionária em vacas leiteiras (CELI et al., 2011). O estresse oxidativo é resultante de um desequilíbrio entre a produção de ERO e a capacidade neutralizante dos mecanismos antioxidantes. Dentre os mecanismos protetores do estresse oxidativo, estão as enzimas de ação antioxidante, como as catalases, glutatona, peroxidase, superóxido desmutase e tioredoxinas (KNOOPS et al., 1999; TAKAHASHI, 2012).

A ocorrência de antígenos de *SOD1* e o produto da transcrição do gene diferiram entre os grupos, apenas no grupo exposto houve transcrição do gene para *SOD1* e ocorrência de antígenos foi severa neste grupo. A *SOD1* é uma oxi-redutase localizada e atuante no citoplasma (WEISIGER; FRIDOVICH, 1973), portanto é possível inferir que a exposição viral não só promoveu uma maior atividade mitocondrial, como também interferiu no metabolismo de outras organelas celulares.

A *AOP-1* funciona como uma peroxidase dependente da tioredoxina que elimina ERO, como a H_2O_2 (BREGANO et al., 2011), além de estar associada com diversas funções celulares, incluindo proliferação, diferenciação e participação do equilíbrio redox (JÄSCHKE et al., 1998; TSUJI et al., 1995). Segundo Shih et al. (2001) a *AOP-1* é produzida na mitocôndria, é capaz de sequestrar ERO, de proteger componentes mitocondriais de ânions superóxidos e de H_2O_2 , sendo que alta expressão de *AOP-1* atenua a apoptose. No presente estudo, a transcrição do gene para *AOP-1*, assim como marcação de antígenos ocorreu nos dois grupos. Porém a RIFI foi mais intensa no grupo exposto. A maior atividade mitocondrial, observada no presente

trabalho, talvez explique a maior expressão de *AOP-1* no grupo, e isto pode ter favorecido uma baixa incidência de embriões apoptóticos neste grupo. O papel *AOP-1* nas infecções virais foi demonstrada anteriormente, entretanto esta é a primeira vez que um estudo faz a associação da *AOP-1* com a produção *in vitro* de embriões bovinos (BREGANO et al., 2011; CARDOSO et al., 2010; DEREKHSAN, 2010).

Considerando que a *SOD1* e a *AOP-1* são enzima com ação antioxidante, sequestradoras de ERO, não podemos descartar a possibilidade da exposição experimental ao BoHV-5 ter causado um estresse oxidativo e que teve como resposta uma maior produção destas enzimas.

A HSP pode estar presente em embriões cultivados em condições inadequadas, como grande densidade populacional, variações bruscas de temperatura, atmosfera gasosa, suplementação proteica ou de aminoácidos (CORRÊA, et al., 2007), e são expressas desde os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário (Al-KATANANI; HANSEN, 2002). Esperávamos a presença desta proteína no grupo exposto, já que sua produção pode ser induzida por injúrias, inclusive por infecções virais (NEUER et al., 2000). As condições de cultivo foram rigorosamente controladas no presente estudo. Isto talvez explique a ausência de expressão de mRNA e antígenos relacionados a *HSP 70.1* nos grupos controle e exposto. Talvez a dosagem desta proteína tenha sido realizada cedo demais, já que ela começa a ser expressa a partir do estágio de blastocisto ou a resposta pode ter se dado pela família 60, que não foi avaliada. Portanto, é possível inferir que o título viral e/ou a infecção pelo BoHV-5 não tenham sido altos a ponto de induzir a produção de HSP.

VI. CONCLUSÃO

A exposição experimental ao BoHV-5 não interferiu na qualidade e a taxa de produção de embriões *in vitro*. Podemos concluir que a exposição ao

vírus não interfere o desenvolvimento, mas que há uma transmissão vertical nos procedimentos de PIVE. Ocorreu uma elevada atividade mitocondrial no grupo exposto, com baixa incidência de embriões apoptóticos isso se deva talvez a elevada síntese de proteínas antioxidantes.

Muitos mecanismos estão envolvidos na sobrevivência celular durante a infecção viral, e muitos deles ainda não são claros, mostrando assim, a necessidade de mais estudos.

VII. REFERÊNCIAS

ABDELMAGID, O.Y.; MINOCHA, H.C.; COLLINS, J.K.; CHOWDHURY, S.I. Fine mapping of bovine herpesvirus-1 (BoHV-1) glycoprotein D (gD) neutralizing epitopes by type-specific monoclonal antibodies and sequence comparison with BoHV-5 gD. *Virology*. v.206, p.242-253, 1995.

AI-KATANANI, Y.M., HANSEN P.J.. Induced thermotolerance in bovine two-cell embryos and the role of heat shock protein 70 in embryonic development. *Mol Reprod Dev.*, v.62, p.174-180, 2002.

AX, R.L.; DALLY, M.R.; DIDON, B.A.; LENZ, R.W.; LOVE, C.C.; VARNER, D.D.; HAFEZ, B.; BELLIN, E. Artificial insemination. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. *Reproduction in Farm Animals*. Seventh edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. Chapter 26, 376-389.

BALASUBRAMANIAN, S., KUMAR, B.M., OCK, S.A., YOO, J.G., IM, G.S., CHOE, S.Y., RHO, G.J. Expression pattern of oxygen and stress-responsive gene transcripts at various developmental stages of in vitro and in vivo preimplantation bovine embryos. *Theriogenology*, v.68,p.265-275, 2007.

BACETTI, B.; BENEDETTO, A.; BURRINI, A.G.; COLLODEL, G.; CECCARINI, E.C.; CRISA, N.; et al. HIV-particles in spermatozoa of patients with AIDS and their transfer into the oocyte. *J. Cell. Biol.*, v.127, p.903-14, 1994.

BETTS, D.H.; MADDAN, P. Permanent embryo arrest: molecular and cellular concepts. *Mol. Human. Rep.*, v. 14, n.8, p. 445-453, 2008.

BETTS, D.H., KING, W.A. Genetic regulation of embryo death and senescence. *Theriogenology*. v. 55, p. 171-191, 2001.

BIELANSKI, A. et al. Isolation of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in association with the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*. v.40, n.3, p.531-538, 1993.

BIELANSKI, A.; DUBUC, C. In vitro fertilization and culture of ova from heifers infected with bovine herpesvirus-1 (BHV-1). *Theriogenology*. v.41, p.1211-17, 1994.

BIELANSKI, A.; LUTZE-WALLACE, C.; SAPP, T.; JORDAN, L. The efficacy of trypsin for disinfection of in vitro fertilized bovine embryos exposed to bovine herpesvirus-1. *Anim. Reprod. Sci.* v.47, p.1-8, 1997.

BIELANSKI, A.; ALGIRE, A.; LALONDE, A.; NADIN-DAVIS, S. Transmission of bovine viral diarrhea virus (BVDV) via in vitro-fertilized embryos to recipients, but not to their offspring. *Theriogenology*. v.71, p. 499-508, 2009.

BOLS, P.E.J.; VANDENHEEDE, J.M.M.; VAN SOOM, A.; Transvaginal ovum-pick up (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. *Theriogenology*, v. 43, p.677-687, 1995.

BREGANO, L.C., AGOSTINHO, S.D.; RONCATTI, F.L.B.T.; PIRES, M.C.; RIVA, H.G.; LUVIZOTTO, M.C.R.; CARDOSO, T.C. Immunohistochemical detection of metalloproteinase-9 (MMP-9), anti-oxidant like 1 protein (AOP-1) and synaptosomal-associated protein (SNAP-25) in the cerebella of dogs naturally infected with spontaneous canine distemper. *Folia Histochem. Cytobiol.* v.49, p.41-48, 2011.

BRILL, A., TORCHINSKY, A., CARP, H., TODER, V. The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development. *J. Assist. Reprod. Genet.*, v.16,

p.512-9, 1999.

CARDOSO, T.C.; FERRARI, H.F.; LUVIZOTTO, M.C.R.; ARMS, C.W. Bio-safety technology in production of Bovine Herpesvirus type 5 (BoHV-5) using an alternative serum-free medium. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* v.3, p.125-130, 2007.

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. *J. Virol. Meth.* v.163, p.509-12, 2010.

CARDOSO, T.C.; FERRARI, H.F.; GARCIA, A.F.; BREGANO, L.C.; ANDRADE, A.L.; NOGUEIRA, A.H. Immunohistochemical approach to the pathogenesis of clinical cases of bovine Herpesvirus type 5 infections. *Diagn. Pathol.* v.5, p.57, 2010.

CARDOSO, T.C.; ANTELLO, T.F.; VIEIRA, F.V.; MACHADO, S.T.; NOGUEIRA, A.H. Estimation of the diagnostic accuracy of the glyco-C and US9 gene-based polymerase chain reaction technique for the detection of bovine Herpesvirus type 5 DNA in decomposed brain suspension from a slaughter house using Bayesian analysis, Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.* doi:10.1007/s11250-011-9929-7, 2011.

CARILLO, B.J.; POSPISCHIL, A.; DAHME, E. Pathology of bovine necrotizing encephalitis in Argentina, 1983.

CELI, P.; MERLO, M.; DA DALT, L.; STEFANI, A.; BARBATO, O.; GABAI, G. Relationship between late embryonic mortality and the increase in plasma advanced oxidase protein products (AOPP) in dairy cows. *Reprod. Fert. Develop.* v.23, p.527-533, 2011.

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

CORRÊA, G.A.; RUMPF, R.; MUNDIM, T.C.D; FRANCO, M.M.; DODE, M. A. N. Oxygen tension during *in vitro* culture of bovine embryos: Effect in production and expression of genes related to oxidative stress. *Animal Reproduction Science*, v.104, p.132-142, 2008.

CROCCO, M.; ALBERIO, R.H.; LAURIA, L.; MARIANO, M.I. Effect of serum on the mitochondrial active area on developmental days 1 to 4 *in vitro* produced bovine embryos. *Zygote*, v.19, p.297-306, 2011.

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

D'ANGELO, M.; VISINTIN, J.A.; RICHTZENHAIN, L.J.; GONÇALVES, R.F. Evaluation of trypsin treatment on the inactivation of bovine herpesvirus type 1 on *in vitro* produced pre-implantation embryos. *Reprod. Domest. Anim.* doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01110.x, 2008.

DERAKHSHAN, M. Effect of measles virus (MV) on mitochondrial respiration. *Indian J. Med. Res.* v.131,p.97-100, 2010.

DIALLO, I.S.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. *Aust. Vet. J.* v.88, p.93-5, 2010.

DREW, T.W.; SANDVIK, T.; WAKELEY, P.; JONES, T.; HOWRAD, P. BVD virus genotype 2 detected in British cattle. *Vet. Rec.*, p. 151-155, 2002.

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, p.534-539, 1993.

DUMMOLLARD, R.; DUCHEN, M.; CARROLL, J. The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Curr. Top. Dev. Biol.* v.77., p. 21-49, 2007.

EDENS, M.S.D.; GALIK, P.K.; RIDELL, K.P.; GIVENS, M.D.; STRINGFELLOW, D.A.; LOSKUTOFF, N.L. Bovine herpesvirus-1 associated with single, trypsin-treated embryos was not infective for uterine tubal cells. *Theriogenology*. v.60, p.1495-504, 2003.

EDWARDS, J.L., EALY, A.D., MONTERROSO, V.H., HANSEN, P.J. Ontogeny of temperature-regulated heat shock protein 70 synthesis in preimplantation bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, v.48, p.25-33, 1997.

ENGELHARDT, T.; KEIL, G.M. Identification and characterization of the bovine herpesvirus 5 US4 gene and gene products. *Virology*. v.255, p.126-135, 1996.

ESTEVEZ, P.A.; SPILKI, F.R.; FRANCO, A.C.; SILVA, T.C.; OLIVEIRA, E.A.S.; MOOJEN, V.; ESMERALDINO, A.M.; ROEHE, P.M. Bovine herpesvirus type 5 in the semen of a bull not exhibiting clinical signs. *Vet. Rec.* v.24, p.658-659, 2003.

FABIAN, D.; KOPPELA, J.; MADDOX-HYTEL, P. Apoptotic processes during mammalian preimplantation development. *Theriogenology*. v. 64, p.221-231, 2005.

FAVETTA, L.A., ROBERT, C., KING, W., BETTS, D.H. Expression profiles of p53 p 66shc during oxidative stress-induced senescence in fetal bovine fibroblasts. *Exp. Cell. Res.* V.299, p.36-48, 2004.

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. *J. Virol. Meth.* v.143, p.335-40, 2007.

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

GIVENS, M.D.; RIDDELL, K.P.; GALIK, P.K.; STRINGFELLOW, D.A.; BROCK, K.V.; LOSKUTOFF, N.M. Diagnostic dilemma encountered when detecting bovine viral diarrhea virus in IVF embryo production. *Theriogenology*, v.58, p.1399-1407, 2002.

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, p.495-504, 2003.

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

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 infections and co-infections on cytokine synthesis. A comparative study. *J. Immunol.* v.149, p.181-187, 1992.

GRIFFIN, B.D.; VERWEIJ, M.C.; WIERTZ, E.J.H.J. Herpesvirus and immunity: art of invasion. *Vet. Microbiol.* v.143, p.89-100, 2010.

GUERIN, B.; LE GUIENNE, B.; ALLEITTA, M.; HARLAY, T.; THIBIER, M. Effets de la contamination par le BHV-1 sur la maturation et fécondation *in vitro* des ovocytes des bovines. *Rec. Med. Vet.* v.66, p.911-7, 1990.

GUÉRIN, P.; MOUATASSIM, S.; MÉNÉZO, EL Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum. Reprod. Update.* v.7, p. 175-189, 2001.

HANSEN, P.J.; FEAR, J.M. Cheating death at the dawn of life: Developmental control of apoptotic repression in the preimplantation embryo. *BBRC*. v.413, p 155-158, 2011.

HAY, S.; KANNOURAKIS, G. A time to kill: viral manipulation of the cell death program. *J. Gen. Virol.* v.83,p.1547-64, 2002.

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

JANSEN, R., BURTONS, G., Mitochondrial dysfunction in reproduction. *Mitochondrion*. v.4, p. 577-600, 2004.

JANSEN, R., DE BOER, K. The bottleneck: mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate. *Mol. Cell. Endocrinol.* v. 145, p.81-88, 1998.

JÄSCHKE, A.; MI, H., TROPSCHUNG, M. Human T cell cyclophilin18 binds to thiol-specific antioxidant protein AOP1 and stimulates its activity. *J. Mol. Biol.* v.277, p.763-760, 1998.

JEONG, W.J.; CHO, S.J.; LEE, H.S.; DEB, G.K.; LEE, Y.S.; KWON, T.H.; KONG, I.K. .Effect of cytoplasmic lipid content on in vitro developmental efficiency of bovine IVP embryos. *Theriogenology*, v.72, p.584-589, 2009.

JOUSAN, F.D., HANSEN, P.J. Insulin-like growth factor-I as a survival factor for the bovine preimplantation embryo exposed to heat shock. *Biol. Reprod.*, v.71, p.1665-1650, 2004.

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. *Vet. Rec.* v.165, p.111-3, 2009.

KNIAZEFF, A.J. et al. Detection of bovine viruses in fetal bovine serum used in cell culture. *In vitro*. v.11, p.400-403, 1975.

KNOOPS, B.; BOGARD, C; ARSALANE, K.; WATTIEZ, R.; HERMANS, C.; DUCONSEILLE, E. FALMAGNE, P., BERNARD, A. *J. Biol. Chem.* v.274, n. 43, p. 30451-30458, 1999.

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

LALONDE, A. BIELANSKI, A. Efficacy of the International Embryo Transfer Society (IETS) washing procedure for rendering oocytes matured in vitro free of bovine viral diarrhea virus (BVDV). *Theriogenology*, v. 76, n.2, p. 261-6, 2011

LEQUARRÉ, A.S.; FEUGANG, J.M.; MALHIMME, O.; DONNAY, I. MASSIP, A.; DESSEY,F.; VAN LANGENDONCKT, A. Expression of Cu/Zn and Mn superoxide dismutases during bovine embryo development: influence of in vitro culture. *Mol. Reprod. Dev.* v.58, n. 58, p. 45-53 (abstract).

LINDBERG, A.; ORTMAN, K.; ALENIUS, S. Seroconversion to bovine viral diarrhea virus (BVDV) in dairy heifers after ambryo transfer. In: *14th international congress on animal reproduction*, 2-6 July 2000, vol. I; 2000. p. 250 [abstract], 2000.

LOVATO, L.T. BHV-1 e BHV-5, isolamentos sorologia no Rio Grande do Sul. In: *Simpósio Internacional de herpesvírus bovino e vírus da diarréia viral bovina*. Santa Maria: UFSM. p.97-101, 1998.

MAIDANA, S.S.; LADELFA, M.F.; PÉREZ, S.E.; LOMÓNACO, P.M.; DEL MÉDICO-ZAJAC, M.P.; ODEÓN, A.; BLANCO-VIEIRA, J.; COMBESSIES, G.; FONDEVILA, N.; PALACIOS, M.; THIRY, J.; MUYLKENS, B.; THIRY, E.; ROMERA, A.S. Characterization of BoHV-5 field strains circulation and report of transient specific subtype of bovine herpesvirus 5 in Argentina. *BMC Vet. Res.* v.7, p.8, 2011.

MAKAREVICH, A.V.; PIVKO, J.; KUBOVICOVA, E.; CHRENEK, M.; SLEZAKOVA, M.; LOUDA, F. Development and viability of bovine preimplantation embryos after the *in vitro* infection with bovine herpesvirus-1 (BHV-1): immunocytochemical and ultrastructural studies. *Zygote*. v.15, p.307-315, 2007.

MALAYER, J.R., HANSEN, P.J. Differences between Brahman and Holstein cows in heat shock-induced alterations of protein synthesis and secretion by oviducts and uterine endometrium. *J. Anim. Sci.*, v.68, p.266-80, 1990.

MÉDICO-ZAJAC, M.P.; ROMERA, A.S.; LADELFA, M.F.; KOTSIAS, F.; DELGADO, F.; THIRY, J.; MEURENS, F.; KEIL, G.; THIRY, E.; MUYLKENS, B.; In vitro-generated interspecific recombinants between bovine herpesviruses 1 and 5 show attenuated replication characteristics and establish latency in the natural host. *BMC Vet. Res.* v.7, p.19, 2011.

MEIRELLES, F.V.; CAETANO, A.R., WATANABE, Y.F., RIPAMONTE, P. CARAMBULA, S.F., MERIGHE, G.K., GARCIA, S.M. Genome activation and developmental block in bovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 83, p.13-20, 2004.

NEUER, A.; SPANDORFER, S.D.; GIRALDO, P.; DIETERLE, S.; ROSENWAKS, Z.; WITKIN, S.S. The role of heat shock proteins in reproduction. *Biol. Reprod.* v.62, p.202-203, 2000 (abstract).

NUSSBAUM, O.; LASTER, J.; LOYTER, A. Fusion of enveloped viruses with sperm cells: interaction of Sendai, Influenza and Semliki Forest viruses with bull spermatozoa. *Exp. Cell. Res.* v.206, p. 11-5, 1993.

Office International des Epizooties(OIE). Infectious bovine rhinotracheitis/Infectious pustularvulvovaginitis In: *Manual of Standards for Diagnostic Test and vaccines for Terrestrial Animal (Mammals, Birds and Bees)*. 6^a ed., p.752-768, 2010.

PAROLI, M.; SCHIAFELLA, E.; Di Rosa, F., Barnaba, V. Persisting viruses and autoimmunity .*J. Neuroimmunol.* v.107, p.201-4, 2000.

PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Heat-shock induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally-regulated phenomenon. *Biol. Reprod.* v.66, p.1169–1177, 2002a.

PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Apoptosis is an adaptive response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v.295, p. 37–42, 2002b.

RENESTO, A. Associação das biotécnicas: aspiração folicular guiada por ultrasonografia e superovulação na produção *in vitro* e *in vivo* de embriões bovinos. 2004. 59p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2004.

RISSI, D.R.; RECH, R.R.; FLORES, E.F.; KOMMERS, G.D.; BARROS, C.S.L. Meningoencefalite por herpesvirus bovino-5. *Pesq. Vet. Bras.* v.27, n.7, p. 251-260, 2007.

RODINA, T.M.; COOOKE, F.N.T., HANSEN, P.J., EALY, A.D. Oxygen tension and medium type actions on blastocyst development and interferon-tau secretion in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* v.111, p.173-188, 2009.

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

ROEHE, P.M.; TEIXEIRA, M.B.; ESTEVES, P.A. et al. Situação do BoHV-1 e BoHV-5 no Brasil. In: *Simpósio Internacional de herpesvírus bovino e vírus da diarreia viral bovina*. Santa Maria: UFSM. p.89-96, 1998.

SANCHES, A.W.D.; LANGOHR, I.M.; STIGGER, A.L.; BARROS, C.S.L. Doenças do sistema nervosa central em bovinos no Sul do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 20:113-118, 2000.

SCOTT, I. The role of mitochondria in the mammalian antiviral defense system. *Mitochondrion*, v.10, p.316-320, 2010.

SCHUDEL, A.A.; CARRILO, B.J.; WYLER, R.; METZLER, A.E. Infections of calves with antigenic variants of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurological disease. *Journal of Veterinary Medicine*. v.33, p.303-310, 1986.

SCHWARTZMAN, R.A.; CIDLOWSKI, J.A. Apoptosis: molecular biology of programmed cell death. *Endocr. Rev.* v.14, p. 133-151, 1993.

SENEDA, M.M.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; ANDRADE, E.R. Aspectos técnicos e biológicos da obtenção de oócitos bovinos: revisão de literatura. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 23, n. 1, p.101-110, 2002.

SHIH, S.F.; YU-HAUH, W.; CHIH-HUNG, H.; HUI-YU, Y.; JUNG-YAW, L. Abrin Triggers Cell Death by Inactivating a Thiol-specific Antioxidant Protein. *J. Biol. Chem.* v. 276, n.24, p. 21870-21877, 2001.

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, p. 324-31, 2010 a.

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, p.1296-303, 2010 b.

SOUZA, D.G.; SILVA-FRADE, C.; MARTINS JÚNIOR, A.; CARDOSO, T.C. Bull semen variables after experimental exposure with Bovine Herpesvirus type 5. *Anim. Reprod. Sci.* v.124, p.55-60, 2011.

STONE, J.R.; YANG, S. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid Redox*. v.8, p.243-270, 2006.

STRINGFELLOW, D.A.; GIVENS, M.D.; WALDROP, J.G. Biosecurity issues associated with current and emerging embryo technologies. *Reproduction, Fertility and Development*, v.16, p.93-102, 2004.

STRINGFELLOW, D.A.; GIVENS, M.D. Infections agents in embryo production: hazards and solutions. *Theriogenology*. v.53, p85-94, 2000a.

STRINGFELLOW, D.A.; GIVENS, M.D. Epidemiologic concerns relative to in vivo and in vitro production of livestock embryos. *Anim. Reprod. Sci.* v.60,p.629-42, 2000b.

STUDDERT, M.J. Bovine encephalitis herpesvirus. *The Veterinary Record*. 25:284, 1989.

TAKAHASHI, M. Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of mammalian embryos. *J. Reprod. Dev.*, v.58, p.1-9, 2012.

TARAZONA, A.M.; RODRIGUEZ, J.I.; RESTREPO, L.F.; OLIVEIRA-ANGEL, M. Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced *in vitro*. *Reprod. Dom. Anim.*, v.41, p.5-11, 2006.

THIBIER, M. Biosecurity –its added value to Embryo Transfer. *Acta Scientiae Veterinariae*. V.38, p.649-659, 2010.

TIEDE, L.M.; COOK, E.A.; MORSEY, B.; FOX, H.S. Oxygen matters: tissue culture oxygen levels affect mitochondrial function and structure as well as responses to HIV viroproteins. *Cell Death Dis.* v.2, p.246, 2011.

TSUJI,K.; COPERLAND, N.; JENKINS, N.A.; OBINATA, M. Mammalian antioxidant protein complements alkylhydroperoxide reductase (ahpC) mutation in Escherichia coli. *Biochem. J.* v.307, p.377-381, 1995.

TURCOTTE, L. Mitochondria: biogenesis, structure and function. *Med. Sci. Sports Exerc.* v.35, p.82-85, 2003.

VANDAELE, L.; VAN SOON A. Intrinsic factors affecting apoptosis in bovine in vitro produced embryos. *Verh. K. Acad. Geneeskde Belg*, v. 73, n.1-2, p. 79-104, 2011.

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. *Vet. Microbiol.* v.142, p. 254-260, 2010.

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

VANROOSE, G.; NAUWYNCK, H.; VAN SOOM, A.; THIRY, E.; de KRUIF, A. Use of monoclonal antibodies to prevent the bovine herpesvirus-1 induced inhibition of sperm-zona binding. *Theriogenology*. v.53, p.322 (abstract), 2000.

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

WEISIGER, R. A.; FRIDOVICH, I. Mitochondrial Superoxide Dismutase: SITE OF SYNTHESIS AND INTRAMITOCHONDRIAL LOCALIZATION. *J. Biol. Chem.* v.248, n. 13, P. 4793-4796, 1973.

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

XIA, H.; VIJAYARAGHAVAN, B.; BELÁK, S. Detection and identification of the atypical bovine pestiviruses in commercial foetal bovine serum batches. *PLoS One*. v.6, n.12, p. e28853, 2011.

APÊNDICES

Tabela1 – Classificação de oócitos conforme De LOOS *et al.* 1989.

Tipo de Oócito	Descrição
Grau I	- Revestido com várias camadas de células do <i>cumulus</i> compacto - Ooplasma homogêneo - COC claro e transparente
Grau II	- Revestido com várias camadas de células do <i>cumulus</i> compacto - Ooplasma com alguns pontos escuros (picnóticos) - COC levemente escuro
Grau III	- Revestido com poucas camadas de células do <i>cumulus</i> compacto - Ooplasma irregular, com vários pontos escuros - COC escuro
Grau IV	- Revestido de células do <i>cumulus</i> expandido - Ooplasma irregular, com vários pontos escuros - COC escuro irregular

Tabela 2 – Meio de Lavagem dos Oócitos (ML)

Componentes	100 mL
PBS	90 mL
SFB	10 mL
Sulfato de Gentamicina	5 mg

Tabela 3 – Meio Base de Maturação

Componentes	5 mL
TCM 199	4,5 mL
SFB	500 µL
Piruvato	10 µL
Sulfato de Gentamicina	25 µL
FSH	50 µL
LH	50 µL

Tabela 4 – Meio de Fertilização (TALP FERT)

Componentes	50 mL
Água Milli-Q	50 mL
NaCL	0,3330g
KCl	0,0120g
MgCl ₂ 6H ₂ O	0,0050g
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0,0023g
NaHCO ₃	0,1050g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,0150g
Ácido Lático	72 µL
Phenol Red	0,0005g

Tabela 5 – Meio de Cultivo (SOF)

Componentes	1 mL
Piruvato	2 µL
Sulfato de Gentamicina	5 µL
SFB	25 µL
SOF Estoque	968 µL