



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José do Rio Preto

**Camila da Silva Frade**

**EXPRESSÃO DE FATORES RELACIONADOS À MORTE  
CELULAR PROGRAMADA EM EMBRIÕES BOVINOS  
INFECTADOS COM BHV-5**

**SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – SP**

**2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José do Rio Preto

**Camila da Silva Frade**

**EXPRESSÃO DE FATORES RELACIONADOS À MORTE  
CELULAR PROGRAMADA EM EMBRIÕES BOVINOS  
INFECTADOS COM BHV-5**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Área de Concentração – Virologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Tereza Cristina Cardoso

**SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – SP**

**2013**

Camila da Silva Frade

Expressão de fatores relacionados à morte celular programada em  
embriões bovinos infectados com BHV-5

Banca Examinadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tereza Cristina Cardoso  
FMVA – UNESP Araçatuba  
Orientador

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helena Lage Ferreira  
USP - Pirassununga

Dr<sup>a</sup>. Vera Cláudia Magalhães Curci  
APTA - Araçatuba

Dr<sup>a</sup>. Flávia Lombardi Lopes  
FMVA – UNESP Araçatuba

Dr<sup>o</sup>. Roberto Gameiro de Carvalho  
FMVA – UNESP Araçatuba

São José do Rio Preto, 15 de julho de 2013

## SUMÁRIO

|                                                                                                    | Página |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| RESUMO .....                                                                                       | 8      |
| ABSTRACT .....                                                                                     | 9      |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....                                                                            | 10     |
| ÍNDICE DE TABELAS .....                                                                            | 12     |
| ABREVIATURAS .....                                                                                 | 13     |
| INTRODUÇÃO .....                                                                                   | 16     |
| 1. Exposição experimental de oócitos ao BHV-5 e produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos ..... | 17     |
| 2. Conceitos sobre apoptose .....                                                                  | 23     |
| 2.1. A mitocôndria no processo da apoptose .....                                                   | 31     |
| 2.2. Caspase-2 e -3 .....                                                                          | 34     |
| 2.3. Mcl-1 e Bax .....                                                                             | 36     |
| 2.4. Apaf-1 .....                                                                                  | 38     |
| 3. Referências .....                                                                               | 41     |
| OBJETIVOS .....                                                                                    | 56     |
| CAPÍTULO I .....                                                                                   | 58     |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS .....                                                                         | 92     |
| ANEXO 1 .....                                                                                      | 94     |
| APÊNDICES .....                                                                                    | 95     |

“Foi o tempo que dedicastes à tua rosa, que a fez tão importante.”  
(Antoine de Saint-Exupéry)

## **DEDICATÓRIA**

- Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pois sem Ele, nada seria possível e não estaríamos desfrutando deste momento tão importante.
- Aos meus pais, Marcos e Marina, ao meu irmão, Marcos Júnior, minha sobrinha, Julia, ao meu esposo, Marcelo e à minha filha, Luísa, que de maneira especial contribuíram para realização deste sonho, dando-me força, incentivo e estímulo. Por vocês e com vocês é possível superar qualquer obstáculo.
- Aos meus amigos e amigas, em especial à Juliana Pampana Nicolau, pelo apoio, motivação e alegrias.
- Dedico àqueles que me ajudaram, direta e indiretamente, na construção deste trabalho.
- E ainda dedico este trabalho a todos aqueles que acreditam que a ousadia e o erro são caminhos para as grandes realizações.

## **AGRADECIMENTOS**

- À Professora Assistente Doutora TEREZA CRISTINA CARDOSO, pela orientação, confiança, exemplo como pesquisadora, capacidade de orientação e incentivo em todos os momentos. Sem a sua disponibilidade e esforço eu não teria atingido este objetivo.
- Ao Curso de Pós-graduação em Microbiologia do IBILCE/UNESP – Campus de São José de Rio Preto pela aceitação do meu nome como aluna regular no Doutorado, e por tornar real mais uma conquista.
- Aos amigos que fiz junto ao Laboratório de Virologia da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP – Campus de Araçatuba: Ana Carolina Guedes Rosa, Heitor Ferrari, Andrea F. Garcia, Juliana Bueno Novaes, Talita F. Antello e Marina C. Ferrarezi.
- Aos funcionários da seção de pós-graduação do IBILCE - UNESP, Campus de São José do Rio Preto.
- Aos professores (Roberto Gameiro, Alicio Martins Júnior, Sílvia Helena Venturolli e Luiz Eduardo Corrêa Fonseca) e a todos os amigos do Programa de Pós-graduação pelo convívio, amizade e carinho.

## RESUMO

É sabido que alguns patógenos podem desencadear o processo de apoptose em determinadas células do organismo, entretanto, o BHV-5 inibe a apoptose em embriões bovinos com sete dias de desenvolvimento. Por esta razão, o objetivo deste trabalho foi investigar a interação vírus-embrião no mecanismo de morte celular programada. Oócitos bovinos foram divididos em dois grupos, sendo: I (controle) e II (exposto ao BHV-5). Após 24 horas de maturação *in vitro*, 100 oócitos de cada grupo foram desnudados e observados em microscópio invertido para verificação da extrusão do primeiro corpúsculo polar, sendo o restante dos oócitos incubados com espermatozoides, por 18 a 20 horas, para que ocorresse o processo de fertilização *in vitro*. Transcorrido este período, os prováveis zigotos foram desnudados e transferidos para gotas contendo meio de cultivo (mSOF), até o dia sete pós-inseminação. Os embriões produzidos *in vitro* foram submetidos à técnica de PCR em tempo real para pesquisa do BHV-5 e análise da transcrição dos genes Mcl-1, Bax, caspase-2, -3 e Apaf-1 relacionados à apoptose, além do teste de MTT ((3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)), para avaliação da atividade mitocondrial. A análise estatística para a taxa de maturação nuclear dos oócitos foi feita pelo teste de  $\chi^2$ . A produção *in vitro* de embriões, MTT e transcrição gênica foi avaliada pelo teste *t* não pareado. Observou-se que o BHV-5 não interferiu na taxa de maturação nuclear dos oócitos e no desenvolvimento embrionário, entretanto os embriões do grupo I apresentaram maior viabilidade mitocondrial e os embriões do grupo II tiveram a expressão dos genes Bax e caspase-2 diminuídos, comprovando que o vírus inibiu o processo de morte celular programada nos embriões bovinos sete dias pós-inseminação, a fim de favorecer a disseminação viral.

Palavras-Chave: apoptose, MTT, oócitos, qPCR e vírus

## ABSTRACT

It is known that some pathogens can initiate apoptosis in certain cells of the organism, however, BHV-5 inhibits apoptosis in bovine embryos after seven days of development. Therefore, the aim was to investigate the interaction virus-embryo in the mechanism of programmed cell death. Bovine oocytes were divided into two groups: I (control) and II (exposed to BHV-5). After 24 hours of *in vitro* maturation, 100 oocytes of each group were denuded and observed under inverted microscope to check the extrusion of the first polar body, and the other oocytes were incubated with spermatozoa for 18 to 20 hours, for *in vitro* fertilization. After this period, presumptive zygotes were denuded and transferred to drops containing culture medium (mSOF), until day seven post-fertilization. *In vitro* produced embryos were submitted to real time PCR to evaluate the presence of BHV-5 and expression of Mcl-1, Bax, caspase-2, -3 and Apaf-1 related to apoptosis, also the MTT assay ((3 - [4,5-dimethylthiazol - 2-yl] -2,5-diphenyl tetrazolium bromide)) was performed for the evaluation of mitochondrial activity. Statistical analysis for nuclear maturation of oocytes was performed by  $\chi^2$  test. *In vitro* embryo production, MTT and gene expression were analyzed by unpaired *t* test. It was observed that BHV-5 did not influence nuclear maturation rate of oocytes or embryonic development, however embryos of group I showed greater mitochondrial viability, and embryos of group II had a decrease in genes expression of Bax and caspase-2, suggesting that the virus inhibited the process of programmed cell death in bovine embryos seven days post-fertilization, in order to promote viral spread.

Keywords: apoptosis, MTT, oocytes, qPCR and virus

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                       | Página |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| <b>Figura 1.</b> Representação esquemática da apoptose .....                                                                                          | 24     |
| <b>Figura 2.</b> Via intrínseca e extrínseca de ativação da apoptose .....                                                                            | 25     |
| <b>Figura 3.</b> Comparação dos genes envolvidos no processo de apoptose no nematódio <i>C. elegans</i> e nos mamíferos .....                         | 26     |
| <b>Figura 4.</b> Opções para danos no DNA do embrião .....                                                                                            | 28     |
| <b>Figura 5.</b> Representação esquemática da mitocôndria: membrana interna e externa, cristas mitocondriais e matriz mitocondrial .....              | 32     |
| <b>Figura 6.</b> Cascata das caspases – ativadoras e efetoras .....                                                                                   | 34     |
| <b>Figura 7.</b> Alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial levam à liberação do citocromo c e desencadeiam o processo de apoptose .....   | 37     |
| <b>Figura 8.</b> Comparação dos genes envolvidos no processo de apoptose no nematódio <i>C. elegans</i> e nos mamíferos .....                         | 38     |
| <b>Figura 9.</b> Formação do apoptossomo .....                                                                                                        | 39     |
| <b>Figura 10.</b> Extração de DNA viral usando o PureLink™ .....                                                                                      | 68     |
| <b>Figura 11.</b> Molécula de SYBR® Green entre a dupla fita de DNA .....                                                                             | 69     |
| <b>Figura 12.</b> Representação esquemática da Sonda TaqMan .....                                                                                     | 70     |
| <b>Figura 13.</b> “Threshold” colocado manualmente na região exponencial para amplificação do gene referência Histona 2a .....                        | 71     |
| <b>Figura 14.</b> Representação da fluorescência para o gene referência Histona 2a, cuja sonda foi FAM-MGB, bem como para o corante passivo ROX ..... | 71     |
| <b>Figura 15.</b> Comparação entre os sistemas de detecção TaqMan® e SYBR® Green .....                                                                | 72     |
| <b>Figura 16.</b> Oócito maturado <i>in vitro</i> , desnudo, com a extrusão do primeiro corpúsculo polar, indicado pela seta (Grupo I) .....          | 73     |
| <b>Figura 17.</b> Oócito maturado <i>in vitro</i> , desnudo, com a extrusão do primeiro corpúsculo polar, indicado pela seta (Grupo II) .....         | 74     |

|                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 18.</b> Curva de dissociação dos genes referência: A. Histona 2a; B. $\beta$ -actina e C. GAPDH, nas setas a representação de reações inespecíficas (A e B) e formação de dímeros de “primer” (C) ..... | 77 |
| <b>Figura 19.</b> Correlação linear para os genes referência: A. $\beta$ -actina, B. histona 2a e C. GAPDH, em destaque o maior valor para o coeficiente de determinação.....                                     | 78 |
| <b>Figura 20.</b> Diferentes expressões dos genes Mcl-1, caspase-2, caspase-3, Apaf-1 e Bax para os grupos I e II. Dados são apresentados como média e desvio padrão ( $p < 0,05$ ) de três replicatas .....      | 79 |

## ÍNDICE DE TABELAS

|                                                                                                                                         | Página |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| <b>Tabela 1.</b> Percentual de oócitos que apresentaram extrusão do primeiro corpúsculo polar para os grupos avaliados .....            | 73     |
| <b>Tabela 2.</b> Efeito da infecção experimental com BHV-5 em oócitos bovinos sobre o desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i> ..... | 75     |
| <b>Tabela 3.</b> Resultados da atividade mitocondrial pela dehidrogenase mitocondrial (teste de MTT) .....                              | 75     |

## ABREVIATURAS

$\chi^2$  - qui-quadrado

$\mu\text{g}$  - micrograma

$\mu\text{L}$  - microlitro

Apaf-1 - *Apoptotic protease activating factor 1*

ATP - adenosina trifosfato

Bad - *Bcl-2-associated death promoter*

Bax - *Bcl-2-associated X protein*

Bcl-2 - *B-cell lymphoma 2*

BE - blastocisto eclodido

BHV-1 - *bovine Herpesvirus 1*, Herpesvirus bovino tipo 1

BHV-5 - *bovine Herpesvirus 5*, Herpesvirus bovino tipo 5

Bid - *gene pro-apoptotic member*

BL - blastocisto

BSA - *bovine serum albumin*, albumina sérica bovina

BVDV - *bovine viral diarrhea vírus*, vírus da diarreia viral bovina

BX - blastocisto expandido

cDNA - DNA complementar

*ced* - *cell death abnormal*

CIV - cultivo *in vitro*

$\text{CO}_2$  - dióxido de carbono

CCO - complexo *cumulus* oócitos

CPE - *cytopathic effect*, efeito citopático

Ct - *threshold cycle*

DISC - *death inducing signaling complex*

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA - *deoxyribonucleic acid*, ácido deoxirribonucléico

dNTP - bases nitrogenadas

EGL-1 - *egg laying abnormal 1*

ERO - espécies reativas de oxigênio

FAS - *apoptosis antigen 1* (APO-1 ou APT)  
FASL - FAS ligante  
FIV - fecundação *in vitro*  
FSH - *follicle stimulating hormone*, hormônio folículo estimulante  
GAPDH - *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*  
gC - glicoproteína C  
HSV-2 - *Herpesvirus 2*  
IA - inseminação artificial  
IETS - *International Embryo Transfer Society*, Sociedade Internacional de Transferência de Embriões  
IL-6 - interleucina-6  
LH - *luteinizing hormone*, hormônio luteinizante  
m.o.i. - *multiplicity of infection dose*  
Mcl-1 - *induced myeloid leukemia cell differentiation protein*  
MCP - morte celular programada  
MDBK - *Madin Darby bovine kidney*  
MEM - *minimum essential medium*, meio mínimo essencial  
mg - miligrama  
MGB - minor groove binder  
MgCl<sub>2</sub> - cloreto de magnésio  
MIV - maturação *in vitro*  
mL - mililitro  
MM - meio de maturação  
mm - milímetro  
mM - milimolar  
MOET - *multiple ovulation and embryo transfer*  
mSOF - *modified synthetic oviduct fluid*  
MTT - (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)  
nm - nanômetro  
OPU - *ovum pick up*  
pb - pares de base

PBS - *phosphate buffer saline*, solução tamponada de fosfato  
PCR - *polymerase chain reaction*, reação em cadeia da polimerase  
PHE - penicilamina, hipotaurina e epinefrina  
PIVE - produção *in vitro* de embriões  
pmol - picomol  
PS - *phosphatidylserine*, fosfatidilserina  
PVA - *polyvinyl alcohol*, álcool polivinílico  
pz - prováveis zigotos  
RNA - *ribonucleic acid*, ácido ribonucléico  
RNAi - RNA de interferência  
SFB - soro fetal bovino  
TALP - Tyrode albumina, lactato e piruvato  
TCID - tissue culture infective dose  
TCM - tissue culture medium  
TE - transferência de embriões  
TNF - *tumor necrosis factor*, fator de necrose tumoral  
TRAIL - *TNF-related apoptosis-inducing ligand*

## **INTRODUÇÃO**

## **1. Exposição experimental de oócitos ao BHV-5 e produção *in vitro* de embriões bovinos**

Diversas biotécnicas ligadas à reprodução animal têm sido desenvolvidas e aprimoradas, a fim de aumentar a eficiência reprodutiva e, conseqüentemente, maximizar 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 reprodutivas adotadas no Brasil, destaca-se, inicialmente, o emprego da inseminação artificial (IA) (AX et al., 2000), sendo a primeira biotecnologia adotada no sistema de produção pecuário brasileiro, seguida da introdução de esquemas de ovulações múltiplas, recuperação e transferência de embriões (TE), conhecida como “Multiple Ovulation and Embryo Transfer” (MOET), associada à criopreservação de embriões na década de 80, a qual possibilitou à bovinocultura aumentar o número de gestações provenientes de fêmeas de alto mérito genético, multiplicando em mais de três vezes o número de descendentes na sua vida reprodutiva (BOLS et al., 1997; RODRIGUES, 2001).

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) foi considerada a terceira geração de biotecnologia aplicada ao melhoramento genético, após a IA e a TE (BOLS et al., 1997; SENEDA et al., 2002). Desenvolveu-se, inicialmente, 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 diretamente de animais vivos, e a aplicação comercial da tecnologia avançou notavelmente (PIETERSE et al., 1991). Passou a ser utilizada para acelerar a produção de animais geneticamente superiores e para impedir o descarte precoce de fêmeas portadoras de alterações adquiridas ou congênitas que impossibilitam a fecundação (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, têm revelado bons índices reprodutivos, confirmando serem um procedimento economicamente viável (RENESTO, 2004).

A aplicação de biotecnologias ligadas à reprodução animal contribuiu para que o país fosse classificado como o segundo maior detentor do rebanho comercial de bovinos do mundo, e o maior exportador mundial de carne bovina (ANUALPEC, 2012), e ainda, ganhou uma condição de destaque dentro do contexto internacional relativo à produção *in vitro* de embriões bovinos (THIBIER, 2002; FIGUEIREDO; GONÇALVES; VISINTIN, 2008).

Com o aumento da comercialização de embriões, houve a preocupação com o aspecto sanitário dos mesmos. Vários métodos de prevenção são utilizados para se obter embriões livres de patógenos específicos, controlando a sanidade desde a doadora até a receptora, além de tratamentos nos embriões para torná-los livre 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; GIVENS; WALDROP, 2004).

A Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) apresentou dados de 2008, mostrando que aproximadamente 800.000 embriões bovinos foram transferidos para receptoras em todo o mundo, sendo dois terços produzidos *in vivo* e um terço *in vitro*, ou seja, o uso de embriões tornou-se largamente aceito como um meio seguro, eficiente e prático para o deslocamento de germoplasma. Entretanto, os procedimentos de TE e PIVE 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 destes passou a ser uma preocupação crescente.

O primeiro vírus considerado pela IETS (1998) como de ocorrência em oócitos e embriões de zona pelúcida intacta, foi o vírus da diarreia viral bovina (BVDV). Dentre o grande número de embriões bovinos, oriundos de TE, que são transferidos anualmente, em todo o mundo, somente dois investigadores

demonstraram a transmissão do BVDV através desta técnica (LINDBERG et al., 2000; DREW et al., 2002), constatando a escassez de literatura sobre o assunto. Em ambos os relatos, o uso de soro fetal bovino (SFB) contaminado foi mencionado como possível origem do vírus.

Xia et al. (2011) identificou BVDV e outros pestivírus bovinos e Van Wagtendonk-de Leeuw et al. (2000) mencionou a presença do BHV-1 nos componentes de origem animal utilizados na PIVE. Além disso, nos últimos anos foi demonstrado que o BHV-1 pode estar presente no material utilizado no sistema de produção *in vitro* de embriões bovinos (VANROOSE et al., 1999), ou seja, no líquido folicular, associado às células epiteliais do oviduto (BIELANSKI et al., 1993; D'ANGELO et al., 2009), e no sêmen de touros infectados (ROCHA et al., 1998; VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 2000; MUYLKENS et al., 2007; WRENZYCKI et al., 2007). Portanto, o risco de transmissão de patógenos durante o procedimento de PIVE deve ser considerado, uma vez que o vírus pode estar presente em animais aparentemente saudáveis.

O *Herpesvirus* bovino é um patógeno que acomete comumente a espécie bovina. Existem três tipos conhecidos de *Herpesvirus* bovino (BHV-1, 4 e 5), que estão associados a distúrbios reprodutivos (SMITH, 1997). O BHV-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 à infecção sistêmica em neonatos. Animais acometidos que sobrevivem ao *Herpesvirus* e não apresentam sintomas clínicos da doença, albergam o vírus de forma latente nos gânglios sensoriais do sistema nervoso (WRATHALL et al., 2006).

Pesquisadores têm identificado a presença do BHV-1 no sêmen de touros, sendo este infectado no momento da ejaculação, pelo vírus presente na mucosa do prepúcio (WRATHALL et al., 2006). Contudo, a grande preocupação é que existe uma tendência do vírus se ligar à membrana plasmática do espermatozoide, inibindo sua habilidade em fecundar o oócito.

Não há relatos de que os espermatozoides infectados possam penetrar através da zona pelúcida e, desta forma, levar contaminação aos embriões (WRATHALL et al. 2006). O único risco plausível é de que espermatozoides normais em sêmen infectado com BHV-1 possam fecundar os oócitos, podendo o vírus ser carregado passivamente através da zona pelúcida. Risco este comprovado por Silva-Frade et al. (2010a) em estudo realizado com BHV-5.

O BHV-1 pode estar presente no soro (KNIAZEFF et al., 1975), fluido folicular (STRINGFELLOW e GIVENS, 2000a) ou células da granulosa de oócitos bovinos (BIELANSK et al., 1997), assim como nas células do oviduto (GIVENS et al., 2002) e no sêmen de touros infectados (ROCHA et al., 1998, WRATHALL et al., 2006), indicando que animais infectados têm potencial chance de transmitir o vírus (BIELANSK e DUBUC, 1994).

Estes relatos servem para destacar a necessidade de considerar o material de origem animal empregado na PIVE e TE, bem como a saúde do touro, da doadora, dos embriões e receptoras quando se deseja produzir embriões livres de patógenos, necessitando de análise prévia, através de técnicas de isolamento viral, a fim de excluir a possibilidade de infecção para os embriões.

A PIVE de bovinos requer que o sistema e seus componentes estejam livres de patógenos específicos e suportem alto desenvolvimento embrionário com resultados repetíveis. O uso de macromoléculas não proteicas, especialmente o álcool polivinílico (PVA), tem sido discutido, a fim de eliminar o uso de produtos de origem animal nos meios de cultura *in vitro* de embriões, os quais apresentam grande risco sanitário (SILVA, 2005). Segundo Seidel et al. (1990) e Nowshari e Brem (2000) o PVA pode substituir o SFB nos protocolos de PIVE.

Além do BHV-1 existe a possibilidade de o BHV-5 ser encontrado em oócitos, sêmen e embriões, devido à grande similaridade genômica deste com o BHV-1, observada por Abdelmagid et al. (1995) e Engelhardt e Keil (1996). Ambos são membros da família *Herpesviridae* e subfamília *Alphaherpesvirinae* (RISSI et al., 2007), sendo considerados vírus neurotrópicos que estabelecem

latência no gânglio trigêmeo (CHOWDHURY et al., 2000a,b). Assim, apesar das escassas informações disponíveis a respeito do BHV-5, relacionado com o sistema reprodutivo, supõe-se que, após a reativação e replicação viral, o mesmo possa causar distúrbios reprodutivos em bovinos.

O BHV-5 é o agente causador da segunda doença infecciosa cerebral mais importante, denominada de encefalite herpética, a qual afeta rebanhos bovinos na América Latina. O vírus é caracterizado por uma rápida replicação lítica em cultura de células e, como o BHV-1, estabelece latência nos gânglios sensoriais do sistema nervoso do hospedeiro (RISSI et al., 2007). Desta forma, é possível que o vírus, após a reativação viral, tenha tropismo pelo aparelho genital, levando a comprometimentos na esfera reprodutiva, assim como observado para o BHV-1.

A infecção causada pelo BHV-5 foi descrita 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 BHV-5 foi classificado como a segunda maior causa de encefalite letal em bovinos (SANCHES et al., 2000), com tendência a ser reativado da latência, após uma situação de estresse, incluindo infecções por outros agentes (OSÓRIO, 1998; TIKOO et al., 1995). O vírus induz a liberação de interleucina-6 (IL-6), levando, conseqüentemente, a distúrbios na homeostasia do sistema imunológico e à imunossupressão (GOSSELIN et al., 1992)

Segundo Silva-Frade et al. (2010a) oócitos, espermatozoides e embriões bovinos foram susceptíveis à exposição ao BHV-5. Diversos autores relataram a detecção do BHV-1 no sêmen bovino, através do emprego de técnicas de PCR (DEKA ET AL., 2005; OLIVEIRA et al., 2011; RANA et al., 2011), mas, a detecção do BHV-5 foi descrita pela primeira vez por Gomes et al. (2003). Schudel et al. (1986) isolou o BHV-5 de fetos abortados e Esteves et al. (2003) isolou o BHV-5 do sêmen de touros assintomáticos. Alguns autores têm relatado a presença do BHV-1 em amostras de sêmen de touros soronegativos (PARSONSON e SNOWDON, 1975; KUPFERSCHMIED et al., 1986). Segundo

Gomes et al. (2003) não há correlação entre o título de anticorpos e a excreção de BHV-5 no sêmen.

Nussbaum et al. (1993) concluíram que espermatozoides podem facilmente servir como carreadores de genes virais, especialmente de vírus envelopados como o *Herpesvirus*. Além disso, Bacceti et al. (1994) demonstraram a existência de partículas virais em zigotos, as quais eram morfológicamente similares às encontradas nos espermatozoides. Concluíram que, o vírus foi carreado pelo espermatozoide infectado para dentro dos oócitos durante a fecundação.

Vanroose et al. (2000) estudaram os poros externos da zona pelúcida e mostraram que estes são largos o suficiente para permitir a entrada do BHV-1 (180 – 200 nm). Observaram também que, alguns zigotos fertilizados apresentavam formação de escavações e fissuras na zona pelúcida com a dimensão exata da cabeça espermática, podendo proporcionar um ponto de entrada para o vírus na fecundação, além de servir como um potencial local de ligação para o vírus. Nesta localidade o vírus encontra-se protegido contra eventuais medidas sanitárias, como por exemplo, lavagens e tratamento com tripsina (KUBOVICOVA, 2008). Desta forma, o procedimento de lavagem com tripsina preconizado pela IETS pode não ser efetivo na remoção do BHV-1 (BIELANSKI E DUBUC, 1993, 1994; BIELANSKI et al., 1997; STRINGFELLOW e GIVENS, 2000b; D'ANGELO et al., 2002; EDENS et al., 2003; WALDROP et al., 2004; D'ANGELO et al., 2008), sugerindo uma interação entre vírus e embrião.

Segundo Gillespie et al. (1990), o BHV-1 adere ao embrião após exposição artificial, sendo assim o embrião pode funcionar como vetor na transmissão de patógenos. Portanto, o risco de introduzir agentes infecciosos na PIVE é evidente. 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 e GIVENS, 2000a), levando à redução na taxa de prenhez, após a TE (IETS, 1998).

Como descrito por Bielanski no artigo 3 do manual da IETS (1998), os embriões de PIVE apresentam maior susceptibilidade às 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 PIV possuem uma maior tendência a carrear o BHV-1, após exposição experimental ao vírus, sendo mais difícil de removê-los por meio do protocolo de tratamento com tripsina recomendado pela IETS (1998).

Guerin et al. (1990) estudaram o efeito do BHV-1 em grupos de oócitos que foram expostos ao vírus durante a maturação e fecundação. O vírus parece não ter efeito na maturação dos oócitos, porém reduziu significativamente a taxa de fecundação. Os autores concluíram que o BHV-1 não somente foi adsorvido no gameta, como também prejudicou sua habilidade de fecundar o oócito, possivelmente devido ao fato de alterar a penetração espermática ou afetar o mecanismo de interação intracelular de fusão.

Segundo Bielanski e Dubuc (1994), a proporção de blastocistos morfolologicamente normais foi reduzida, quando estes foram produzidos no sistema de PIVE infectado com BHV-1. Makarevich et al. (2007) observou comprometimento no desenvolvimento embrionário pré-implantação, após exposição ao BHV-1, concluindo que a viabilidade embrionária pode ser afetada em função do título viral.

Os embriões com zona pelúcida intacta foram protegidos contra a infecção, contudo, os blastocistos expandidos, expostos ao BHV-1, expressaram antígenos virais em aproximadamente 13% de suas células e tornaram-se degenerados (VANROOSE et al., 1996). Em outro estudo, Vanroose et al. (1999) encontraram taxas de clivagem e de formação de blastocistos significativamente reduzidas, após a exposição ao vírus, durante a etapa de fecundação *in vitro* (FIV).

Vanroose et al. (2000) usaram espermatozoides previamente incubados com BHV-1 na FIV, encontrando uma redução de até 60% no número de espermatozoides aderidos à zona pelúcida, quando comparada ao grupo controle (sem exposição ao vírus). Gomes et al. (2003) e Schudel et al. (1986)

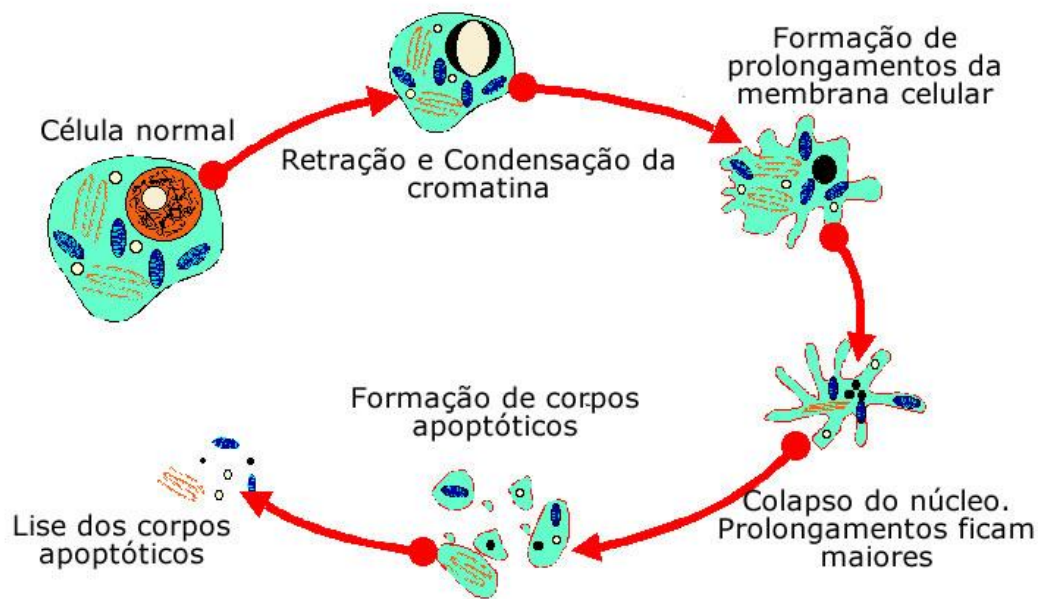
demonstraram que o BHV-5 também pode comprometer o aparelho reprodutor, semelhante ao BHV-1.

Sendo assim, estudos com exposição de oócitos, espermatozoides e embriões a diferentes tipos virais podem ajudar a elucidar os mecanismos utilizados pelo vírus para se propagarem nestas células, bem como verificar os efeitos da interação entre vírus e gametas.

## **2. Conceitos sobre apoptose**

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 e WILLIAMS, 1964). Em 1972, Kerr, Wyllie e Currie sugeriram o termo apoptose (do grego *apó* = separação, *ptôsis* = queda) para indicar este tipo de morte celular. A apoptose, ou morte celular programada, refere-se às características morfológicas e bioquímicas do processo de eliminação celular (FABIAN; KOPPEL; MADDOX-HYTTEL, 2005).

A apoptose é um processo fisiológico ativo, em que ocorre a condensação da cromatina, redução do volume celular, perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, fragmentação do DNA e formação de vesículas na membrana, denominadas de corpos apoptóticos, os quais são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem que haja processo inflamatório associado (SCHWARTZMAN E CIDLOWSKI, 1993; FABIAN; KOPPEL e MADDOX-HYTTEL, 2005; GRIVICICH, REGNER e ROCHA, 2007) (FIGURA 1).

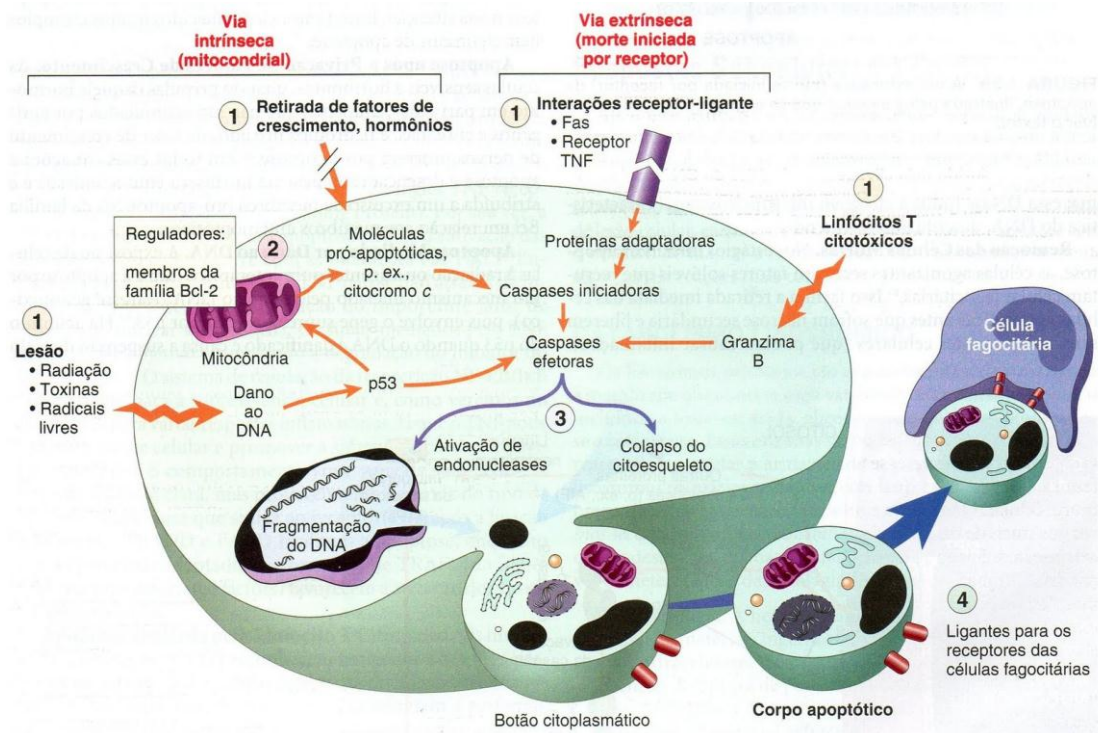


Fonte: domínio público

**FIGURA 1.** Representação esquemática da apoptose.

Durante muito tempo, a MCP foi considerada um processo passivo de caráter degenerativo, que ocorre em situações de lesão celular, infecção e ausência de fatores de crescimento. Como consequência, a célula altera a integridade da membrana plasmática, diminui o seu volume e perde as suas funções metabólicas (YU e CHOI, 2000). Entretanto, nem todos os eventos de morte celular são processos passivos. Organismos multicelulares são capazes de induzir a MCP como resposta a estímulos intra ou extracelulares (HENGARTNER, 2000).

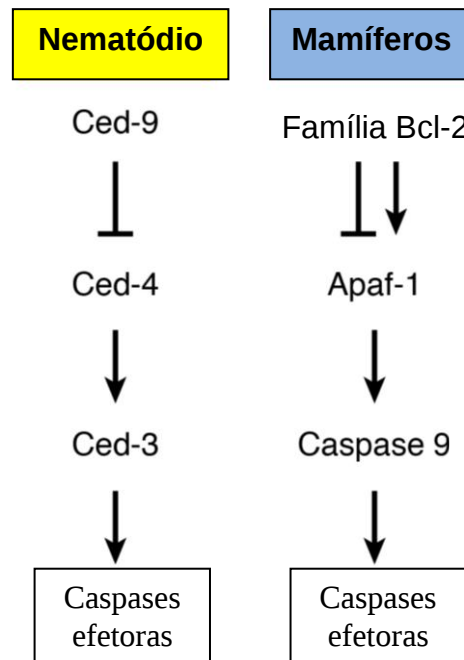
A apoptose envolve dois mecanismos: **intrínseco** (mitocondrial), dependente da mitocôndria, sendo iniciada por sinais intracelulares pró-apoptóticos, levando à liberação do citocromo c e ativação das caspases; e **extrínseco** (citoplasmática), no qual ocorre ligação receptor-ligante, levando à ativação das caspases (FIGURA 2).



Fonte: domínio público

**FIGURA 2.** Via intrínseca e extrínseca de ativação da apoptose.

Estudos envolvendo a participação de genes no controle da apoptose iniciaram-se com o nematódio *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). A morte fisiológica nesses organismos é controlada, principalmente, por três genes da família *ced* ("cell death abnormal"): *ced-3*, *ced-4*, *ced-9*, além de outras proteínas (LIU e HENGARTNER, 1999). Nesses organismos, o gene supressor da apoptose *ced-9* (homólogo ao gene humano Bcl-2) sempre está associado ao gene *ced-4* (homólogo à proteína humana fator de ativação de protease associada à apoptose 1 - Apaf-1), o qual impede a ativação da *ced-3* (gene pró-apoptótico). Quando a apoptose é iniciada, a proteína EGL-1 (homóloga à proteína humana Bax) se associa ao *ced-9*, liberando o *ced-4* e levando à ativação do *ced-3*. Em humanos, o processo é muito semelhante ao que ocorre com o *C. elegans*, ou seja, a proteína Bax se associa à Bcl-2, induzindo a liberação da Apaf-1, ativando a caspase 9, desencadeando a apoptose (HENGARTNER, 2000) (FIGURA 3).



**FIGURA 3.** Comparação dos genes envolvidos no processo de apoptose no nematódio *C. elegans* e nos mamíferos.

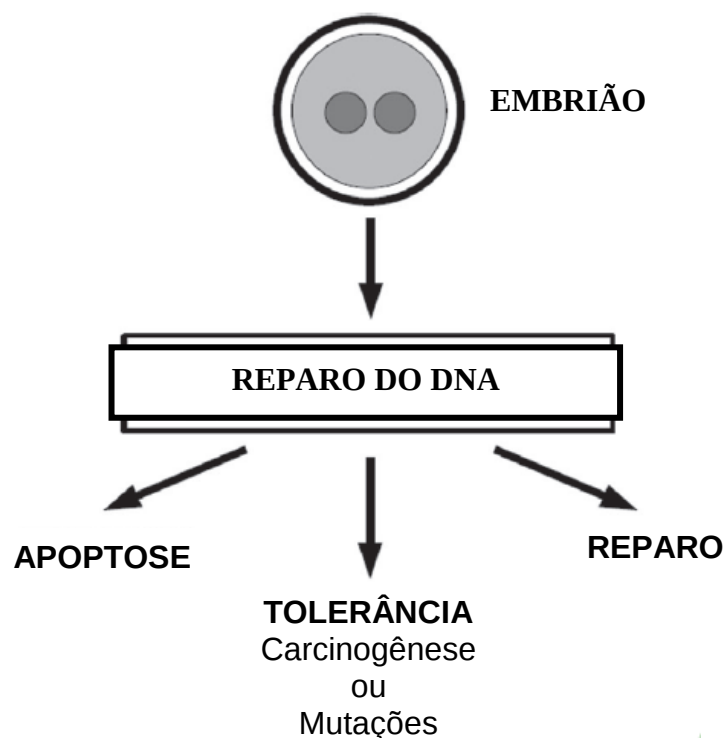
A apoptose nos mamíferos tem um importante papel no controle da qualidade do desenvolvimento embrionário, uma vez que, através desse mecanismo são eliminadas células danificadas, não funcionais e anormais (revisado por PAULA-LOPES e HANSEN, 2002a,b; BETTS e MADAN, 2008). A apoptose de células embrionárias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

Embora a apoptose 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-implantados, podemos citar as anormalidades cromossômicas e nucleares, desequilíbrio nos fatores de crescimento e hormônios, exposição a agentes

prejudiciais, tais como: espécies reativas de oxigênio (ERO), radiação ultravioleta e choque térmico (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002a,b; FABIAN; KOPPEL e MADDOX-HYTTEL, 2005).

Segundo Tarazona et al. (2006), a competência do embrião para se manter vivo até os primeiros estágios do desenvolvimento é dependente da produção de ATP pela mitocôndria, sendo que embriões não competentes têm baixa atividade mitocondrial e a clivagem é bloqueada antes da ativação do genoma. Segundo Melka et al. (2010), a apoptose durante o início do desenvolvimento embrionário é considerada uma das causas de perdas embrionárias.

Há um consenso de que em células somáticas ocorrem mais de 100.000 reparos no DNA por dia. Em embriões, durante as primeiras 24 horas, imediatamente antes e após a fase S, o número de lesões para serem reparadas pode atingir facilmente este número, especialmente se considerarmos o genoma materno e paterno. Existem três opções para a célula, somática ou embrionária, as quais são voltadas para os danos no DNA (FIGURA 4): a primeira é ativar os passos da apoptose. Esta ativação leva à morte celular (JURISICOVA E ACTON, 2004), a qual destruirá uma ou mais células e prejudicará a viabilidade celular. A segunda opção é tolerar a lesão. Esta opção pode levar a mutações e a eventual carcinogênese nas gerações futuras. A terceira opção, e melhor, é a reparação da lesão (MÉNÉZO et al., 2010)



**FIGURA 4.** Opções para os danos no DNA do embrião.

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).

A fim de melhorar a produção *in vitro* de embriões, diferentes graus de oócitos são selecionados com base na morfologia das células do *cumulus* e do ooplasma, havendo uma possível relação entre a morfologia e o desenvolvimento embrionário (LONERGAN et al., 1992; BRACKETT e ZUELKE, 1993). Esses estudos demonstraram que oócitos com células do *cumulus* compactas foram originados de folículos saudáveis, enquanto que oócitos sem células do *cumulus* ou expandidas foram originados de folículos com sinais de atresia. BLONDIN e SIRARD (1995) relataram que oócitos

desnudos têm menor taxa de desenvolvimento, e diferem significativamente de oócitos com células do *cumulus* compactas e citoplasma homogêneo. Esses resultados confirmam os achados de YANG e RAJAMAHENDRAM (2002) em que oócitos grau 4 tiveram maior avanço no processo de apoptose, quando comparados com grau 1 (excelente qualidade), levando à formação de embriões de má e boa qualidade, respectivamente. Os pesquisadores avaliaram a expressão de Bcl-2 e Bax nos embriões bovinos, sendo possível concluir que em embriões saudáveis (boa qualidade) havia uma maior expressão de Bcl-2, já a expressão de Bax foi maior em embriões fragmentados (má qualidade), constatando que a apoptose é responsável pela degeneração de oócitos, fragmentação de embriões e está diretamente relacionada à perda embrionária.

As mitocôndrias têm um comportamento particular durante o desenvolvimento embrionário, sendo maternalmente transmitidas com ínfima contribuição paterna, não havendo multiplicação das mesmas até a eclosão embrionária. Manter um perfeito funcionamento das mitocôndrias de origem materna é vital para o embrião, pois uma disfunção mitocondrial pode comprometer o processo de desenvolvimento e/ou desencadear a apoptose do embrião (JANSEN e DE BOER, 1998; DUMOLLARD, DUCHEN, CARROLL, 2007). O estresse celular ativa a mitocôndria, provocando a despolarização da membrana e alterando a razão entre as proteínas pró-apoptóticas e as antiapoptóticas (HANSEN e FEAR, 2011).

A infecção viral geralmente resulta na alteração dos processos celulares que podem desencadear a MCP pela via mitocondrial. A apoptose é um importante mecanismo de defesa da célula hospedeira contra os agentes virais, os quais possuem estratégias para controlá-la ou regulá-la, maximizando a produção da progênie viral e permitindo a disseminação viral para as células vizinhas (HAY e KANNOURAKIS, 2002). O sucesso na replicação de muitos vírus depende da habilidade em prevenir a indução da apoptose pela via mitocondrial (SCOTT, 2010). Não é possível estabelecer se a apoptose tem uma consequência direta na replicação viral ou se é mediada por mecanismos

indiretos, tais como a liberação de citocinas pró-apoptóticas (BORDI et al., 2006). 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 BHV-5 levou à infecção de embriões bovinos produzidos *in vitro* sem interferir no desenvolvimento embrionário (SILVA-FRADE et al., 2010a), suprimindo algumas vias da apoptose. Ainda é desconhecido como o BHV-5 inibe a apoptose ou induz disfunção mitocondrial em embriões bovinos expostos experimentalmente (HAY e KANNOURAKIS, 2002; SILVA-FRADE et al., 2010 a, b).

Considerando a grande complexidade do processo de apoptose, e com a finalidade de melhor elucidá-lo na infecção por BHV-5 em embriões bovinos, foram utilizados cinco genes relacionados com a morte celular programada, direta e indiretamente, sendo estes mencionados a seguir.

## **2.1. A mitocôndria no processo da apoptose**

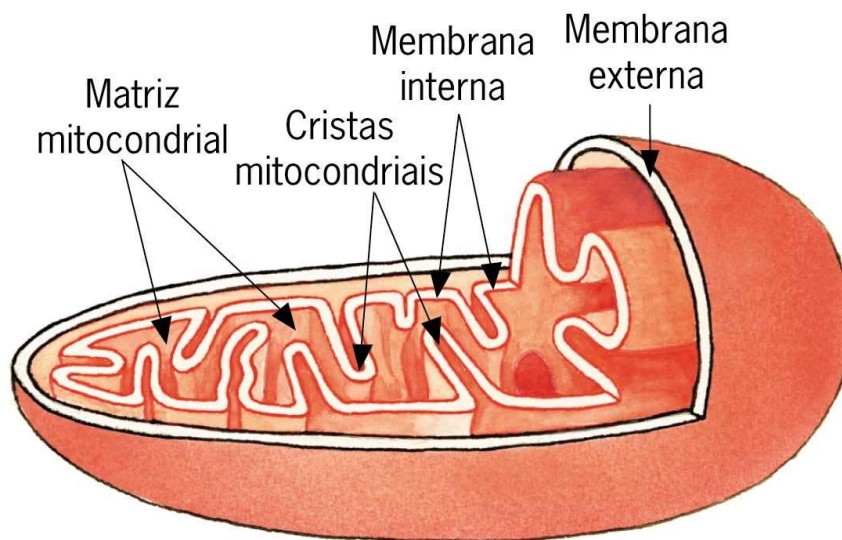
Evidências experimentais indicam que a mitocôndria representa um alvo preferencial e crítico para a ação de drogas e toxinas, bem como agentes virais. Os efeitos sobre as mitocôndrias podem ocorrer por mecanismos diretos e indiretos, levando a disfunções mitocondriais, tais como: alterações no transporte de elétrons e fosforilação oxidativa, na permeabilidade da membrana mitocondrial interna, no transporte de cálcio, no estado oxidativo, além de uma série de outros eventos que levam à depleção de ATP (MINGATTO et al., 1996; UYEMURA et al., 1997; PIGOSO et al., 1998; MINGATTO et al., 2000; DORTA et al., 2003).

A mitocôndria participa da manutenção de funções celulares vitais, tais como: respiração celular e síntese de ATP, modulação do estado redox da célula, regulação osmótica, controle do pH, homeostasia do cálcio no citosol e sinalização intracelular. Paradoxalmente, a mitocôndria guarda no espaço

intermembranoso substâncias letais, capazes de deflagrar o processo de morte celular, dentre as quais figura o citocromo *c*. Quando liberado da mitocôndria, o citocromo *c* associa-se a duas proteínas presentes no citosol (Apaf-1 e a pró-caspase-9) e na presença de ATP, ativa a caspase-9. A caspase-9, por sua vez, ativa a pró-caspase-3 e 7, as quais executam o processo de apoptose. A caspase-3 pode amplificar a cascata de proteólise pela ativação da caspase-8 e pela clivagem da proteína antiapoptótica Bcl-2 que, normalmente, garante a integridade da membrana mitocondrial (KAPLOWITZ, 2000).

Para a manutenção da integridade celular é necessário que os componentes pró-apoptóticos, presentes no interior da mitocôndria, não sejam liberados para o citosol. Existe, na membrana mitocondrial interna, uma estrutura proteica chamada poro de transição de permeabilidade mitocondrial, que se mantém habitualmente fechada, assegurando a sobrevivência celular.

Uma das consequências da abertura do poro de permeabilidade é a expansão da matriz mitocondrial devido a sua hiperosmolaridade. A membrana mitocondrial interna, que apresenta várias pregas, pode acomodar o aumento do volume da matriz, enquanto a membrana externa, que é esférica, se rompe, liberando componentes pró-apoptóticos, como o fator indutor da apoptose e o citocromo *c* (FIGURA 5). Outra consequência é a nova entrada de prótons na matriz, causando colapso no potencial de membrana mitocondrial e comprometendo a síntese de ATP (FELDMANN et al., 2000).



Fonte: domínio público

**FIGURA 5.** Representação esquemática da mitocôndria: membrana interna e externa, cristas mitocondriais e matriz mitocondrial.

A abertura do poro de permeabilidade mitocondrial causa, simultaneamente, ativação das caspases (potencialmente levando à apoptose) e depleção de ATP (potencialmente causando necrose). Essa disputa entre a ativação das caspases e a depleção de ATP irá orientar a morte celular, seja por apoptose ou por necrose. A disputa pode ser vencida pelas caspases, quando estas são diretamente ativadas pelos receptores da superfície celular ou granzima B e, quando o poro de permeabilidade se abre em algumas mitocôndrias, permitindo que as demais sintetizem ATP. Nestas circunstâncias, a célula entra no processo de apoptose. Por outro lado, se o poro de permeabilidade é aberto rapidamente e a célula não pode obter energia suficiente a partir da glicólise anaeróbia, a depleção do ATP impede que a apoptose se instale (processo ativo que requer energia) e a célula morre por necrose (PESSAYRE, et al., 1999).

A mitocôndria é importante para oócitos e embriões não somente para sua competência, mas também para adequada divisão celular. Durante o início do desenvolvimento embrionário, as mitocôndrias são todas maternas, uma vez

que as paternas são eliminadas quando o espermatozoide penetra no ooplasma (JANSEN e BURTON, 2004).

O oócito primário contém aproximadamente 6.000 mitocôndrias e durante a maturação citoplasmática, o número aumenta para mais de 100.000 (CUMMINS, 2004). Nos oócitos, as mitocôndrias são estruturas imaturas, com formato arredondado ou ovalado, com poucas cristas e alguns vacúolos. Após a fertilização e durante o início do desenvolvimento, as mitocôndrias maturam formando novas cristas e podem, além disso, ser consideradas como uma mistura, composta de várias populações de mitocôndrias com diferentes níveis de atividade e fase de maturação (BAVISTER E SQUIRRELL, 2000).

Segundo Lane e Gardner (1998), durante o início do desenvolvimento, a competência dos embriões depende do ATP produzido pela mitocôndria. Como os embriões não competentes tem menor atividade de mitocôndria e sua clivagem foi bloqueada antes da ativação do genoma (quatro células), isto sugere o papel importante da mitocôndria na produção de energia para o processo de ativação do genoma (TARAZONA et al., 2006) e, conseqüentemente, para o desenvolvimento embrionário adequado.

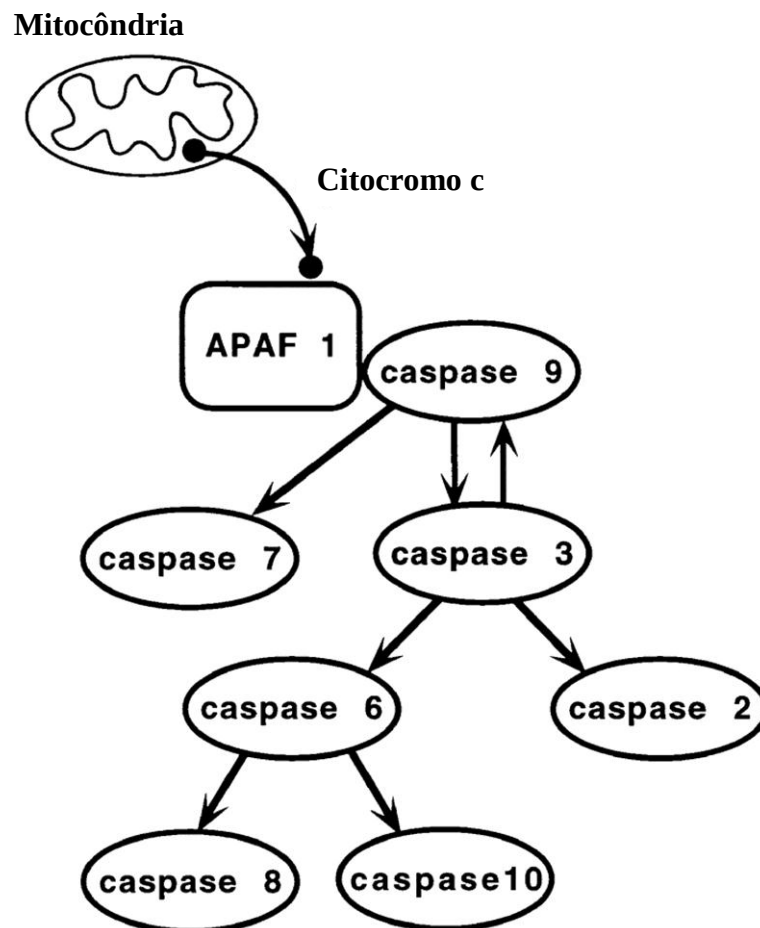
## **2.2. Caspase-2 e -3**

A apoptose pode ser deflagrada por estímulos externos, através de receptores específicos na superfície celular, chamados receptores da morte, ou por estímulos internos de estresse intracelular, tais como: lesão do DNA ou perturbações no ciclo celular ou nas vias metabólicas. Essas diferentes vias culminam com a ativação de proteases conhecidas como caspases, que possuem papel fundamental no processo de morte celular (PAROLIN e REASON, 2001).

As caspases (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*) pertencem à família das cisteínas proteases, as quais têm a capacidade de reconhecer e clivar substratos que possuam resíduos de aspartato (NICHOLSON e THORNBERRY, 1997), sendo essenciais no processo de apoptose. Estão presentes no citosol sob a forma de pró-enzimas inativas,

denominadas zimogênios (HENGARTNER, 2000), tornando-se ativas após clivagem proteolítica dos resíduos do ácido aspártico (THOMPSON, 1999).

As caspases podem ser caracterizadas como iniciadoras ou efetoras da cascata das caspases (THORNBERRY E LAZEBNIK, 1998). As iniciadoras (caspase-2, 8, 9 e 10) clivam as caspases efetoras inativas, ativando-as. Sendo assim, as efetoras (caspase-3, 6 e 7) desencadeiam o mecanismo de apoptose, clivando substratos que são essenciais para função e estrutura da célula, levando a mudanças morfológicas e morte celular (KAPLOWITZ, 2000) (FIGURA 6).



**FIGURA 6.** Cascata das caspases – ativadoras e efetoras.

A pró-caspase-2 está localizada na mitocôndria e é liberada no citosol, após ativação por vários estímulos fisiológicos e patológicos, já a pró-caspase-3 é uma proteína citosólica (EARNSHAW et al., 1999). A clivagem específica da caspase-2 está relacionada com as caspases efetoras, tais como caspase-3 e 7 (ZHIVOTOVSKY e ORRENIUS, 2005). Robertson et al. (2002) e Lassus et al. (2002), estudaram a supressão da expressão da caspase-2 através de “knockout” em células de ratos usando RNA de interferência (RNAi). Neste experimento foi possível evitar a morte celular pela ablação da caspase-2, além de prevenir a translocação do Bax na mitocôndria e a subsequente liberação do citocromo c por essa organela. Revisão feita por Zhivotovsky e Orrenius (2005) indicou que a caspase-2 tem muitas propriedades distintas de outras caspases, mas ainda não se sabe muito sobre seu o exato papel na regulação da morte celular *in vivo*.

Uma vez ativada, a maioria das caspases tem a habilidade de catalisar a ativação de múltiplos outros membros dessa família, resultando em amplificação da cascata proteolítica. Contrariamente às proteases armazenadas nos lisossomos ou ativadas no citosol pelo cálcio, as quais possuem espectro amplo de substratos inespecíficos, as caspases têm substratos bem restritos, o que lhes assegura seletividade e especificidade no processo de proteólise. Tais substratos incluem proteínas envolvidas no reparo de danos na replicação do DNA, no ciclo celular, na sinalização de transdução e na manutenção da integridade da estrutura celular. O ataque a todos esses alvos impede o reparo quando se rompe a estrutura do citoesqueleto e do núcleo, levando à desestruturação celular (THOMPSON, 1999).

### **2.3. Mcl-1 e Bax**

Um número crescente de genes tem sido identificado como capazes de influenciar o processo de apoptose. Entre eles, destaca-se a família das proteínas Bcl-2, que desempenha papel crítico na regulação da apoptose em condições fisiológicas ou patológicas (BORNER, 2003). Pelo menos 15 membros dessa família já foram identificados nos mamíferos. Algumas dessas

proteínas, como Bcl-2 e Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1 (BCL2L3) e A1 são antiapoptóticas, enquanto outras, como a Bax, Bad e Bid são pró-apoptóticas (PATEL e GORES, 1998; HENGARTNER, 2000), as quais possuem sítios de ligação na membrana mitocondrial externa (MURPHY et al., 2000).

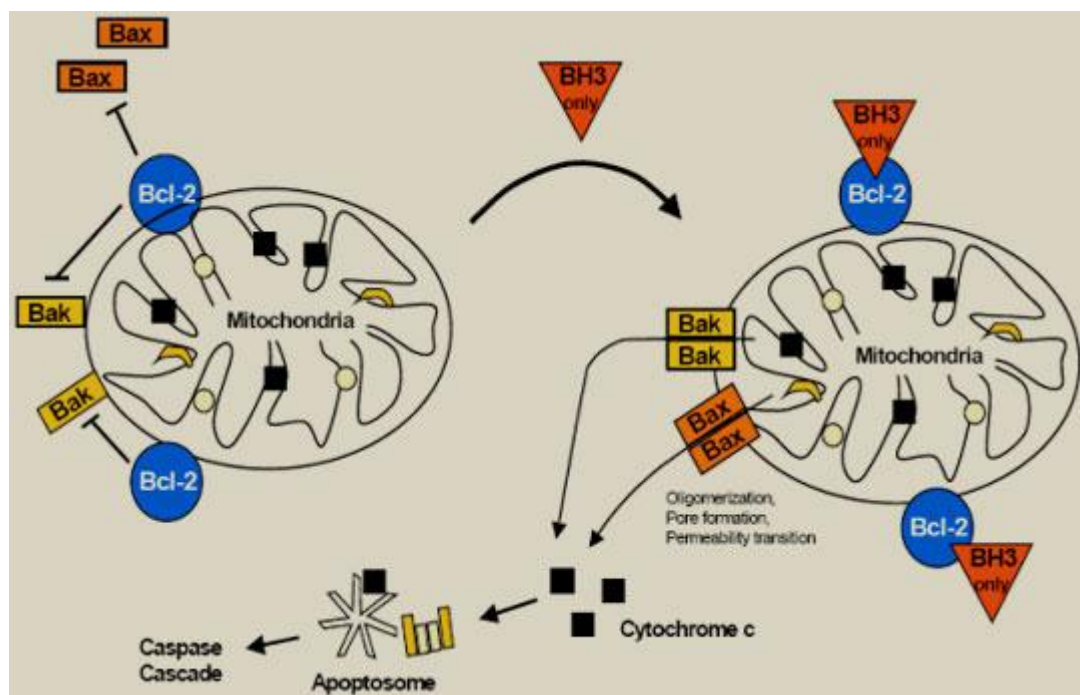
O Bcl-2 é uma proteína localizada na membrana externa da mitocôndria, a qual previne a liberação do citocromo c (YANG et al., 1997), sendo chamada de regulador antiapoptótico. Uma vez liberada, o citocromo c, presente no espaço existente entre a membrana mitocondrial interna e externa, forma um complexo com o fator ativador da apoptose 1 (Apaf-1), levando a ativação da caspase-9, que ativa caspases efetoras (PAROLIN e REASON, 2001), além disso a expressão do Bcl-2 é capaz de inibir a geração de espécies reativas de oxigênio e a acidificação intracelular, bem como estabilizar o potencial de membrana da mitocôndria (VANDER HEIDEN e THOMPSON, 1999).

Três funções têm sido descritas para essas proteínas: dimerização, atividade formadora de poro ou canal de íons, e ligação a outras proteínas. As proteínas Bax e Bcl-2 são capazes de formar homodímeros (Bax-Bax e Bcl-2-Bcl-2) e heterodímeros (Bax-Bcl-2), sendo que o equilíbrio entre esses homodímeros e heterodímeros pode definir o balanço pró-apoptótico ou antiapoptótico na célula (PETROS; OLEJNICZAK e FESIK, 2004). A formação de heterodímeros entre proteínas agonistas e antagonistas, pode inibir a apoptose pela neutralização das agonistas ou promover a apoptose pelo deslocamento de fatores pró-apoptóticos ligados a antagonistas, como por exemplo, o Apaf-1 (RICCI e ZONG, 2006).

Os principais antagonistas da apoptose, Bcl-2 e Bcl-X<sub>L</sub>, localizam-se, principalmente, na membrana mitocondrial (PATEL e GORES, 1998). Essas proteínas são capazes de formar poros condutores de íons em membranas sintéticas (THOMPSON, 1999). Acredita-se que um dos mecanismos, pelos quais elas mantêm a homeostasia celular, seja o de regulação da permeabilidade das membranas nas quais se distribuem. Recentemente, foi demonstrado que a Bcl-2 bloqueia a penetração nuclear de perforina e granzima, substâncias liberadas pelos linfócitos T citotóxicos contra seus alvos

e que podem ser ativadoras de caspases (GRIVICICH, REGNER E ROCHA, 2007).

Os membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 são normalmente encontrados no citosol, e após um estímulo de morte, o Bcl-2 inibe a permeabilização da membrana externa da mitocôndria, pelo sequestro de Bax ou por competir por sítios que seriam ocupados pelo Bax na membrana externa mitocondrial (MURPHY et al., 2000). Este evento leva à alteração na permeabilidade da membrana dessa organela, permitindo o extravasamento de proteínas pró-apoptóticas, tais como o citocromo c, o fator indutor da apoptose, DNase e pró-caspases-2 e 9 (KERR, WYLLIE e CURRIE, 1972) (FIGURA 7).



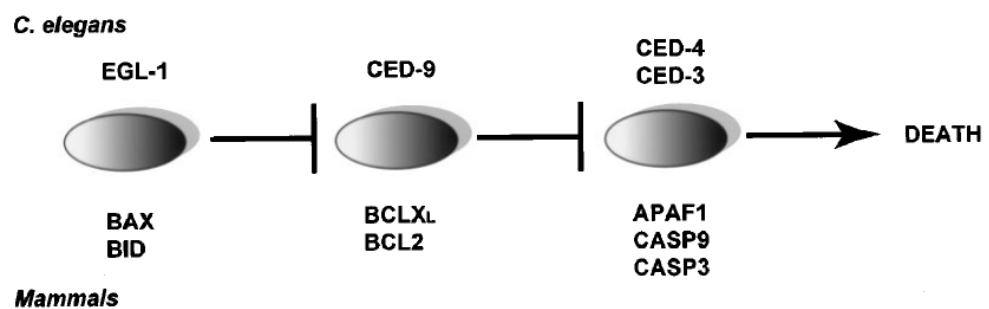
Fonte: domínio público

**FIGURA 7.** Alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial levam à liberação do citocromo c e desencadeiam o processo de apoptose.

#### 2.4. Apaf-1

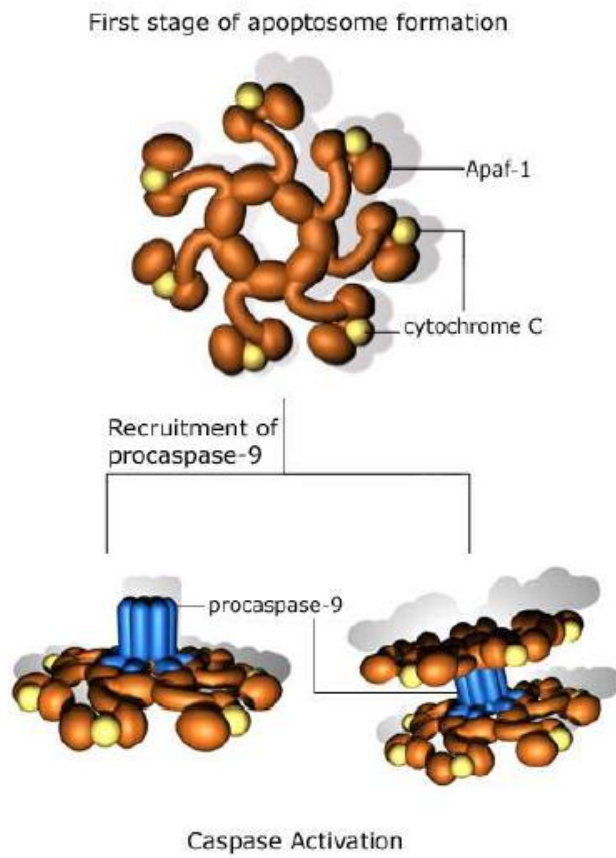
Como mencionado, estudos envolvendo a participação de genes no controle da apoptose iniciaram-se com o nematódio *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). A morte fisiológica nesses organismos é controlada, principalmente

por três genes da família ced (“cell death abnormal”): ced-3, ced-4 e ced-9, além de outras proteínas. Nesses organismos, o gene supressor de apoptose ced-9 (homólogo ao gene humano Bcl-2) sempre está associado ao gene ced-4 (homólogo à proteína humana fator de ativação de protease associada à apoptose 1 - Apaf-1), o que impede a ativação de ced-3 (pró-apoptótica). Quando a apoptose é iniciada, a proteína EGL-1 (homóloga à proteína humana Bax) se associa ao ced-9, liberando o ced-4 e levando à ativação do ced-3 (FIGURA 8). Em humanos, o processo é muito semelhante ao que ocorre com *C. elegans*, ou seja, a proteína Bax se associa à Bcl-2 induzindo a liberação do citocromo c, o qual no citosol se liga ao Apaf-1 e a caspase-9, formando o chamado apoptossomo, promovendo assim a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9, ativa (BUDIHARDJO et al., 1999) (FIGURA 9). Uma vez ativada, a caspase-9 ativa a caspase-3 que vai ocasionar a apoptose (RUPNARAIN et al., 2004; PETROS; OLEJNICZAK e FESIK, 2004).



Fonte: domínio público

**FIGURA 8.** Comparação dos genes envolvidos no processo de apoptose no nematódio *C. elegans* e nos mamíferos.



Fonte: domínio público

**FIGURA 9.** Formação do apoptossomo.

### 3. REFERÊNCIAS

ABDELMAGID, O.Y. *et al.* Fine mapping of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) glycoprotein D (gD) neutralizing epitopes by type-specific monoclonal antibodies and sequence comparison with BHV-5 gD. *Virology*, v. 206, p. 242-253, 1995.

ANUALPEC. *Anuário da pecuária brasileira*. 10 ed. São Paulo: Editora FNP, 2012.

AX, R.L. *et al.* Artificial insemination. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. *Reproduction in Farm Animals*. Seventh edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. Chapter 26, p. 376-389.

BACETTI, B. *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.

BAVISTER, B.D.; SQUIRRELL, J.M. Mitochondrial distribution and function in oocytes and early embryos. *Hum Reprod*, v. 15 (Suppl. 2), p. 189-198, 2000.

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

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

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. *et al.* 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.

BLONDIN, P.; SIRAD, M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev*, v. 41, p. 54-62, 1995.

BOLS, P. E. J. *et al.* Effects of needle tip bevel an aspiration procedure on the morphology and developmental capacity bovine compact cumulus oocyte complexes. *Theriogenology*, v. 47, p. 1221- 1236, 1997.

BORDI, L. *et al.* Bcl-2 inhibits the caspase-dependent apoptosis induced by SARS-CoV without affecting virus replication kinetics. *Arch Virol*, v. 151, p. 369-377, 2006.

BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol*, v. 39, p. 615-47, 2003.

BUDIHARDJO, I. *et al.* Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, v. 15, p. 269-90, 1999.

BRACKETT, B.G.; ZUELKE, K.A. Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*, v.39, p. 43-64, 1993.

CARILLO, B.J. *et al.* Pathology of bovine necrotizing encephalitis in Argentina. *Zen Vet B*, v. 30, p. 161-8, 1983.

CHOWDHURY, S.I. *et al.* Neurovirulence of glycoprotein C (gC)-deleted bovine herpesvirus type-5 (BHV-5) and BHV-5 expressing BHV-1 gC in a rabbit seizure model. *J Virol*, v. 6, p. 284-295, 2000a.

CHOWDHURY, S.I. *et al.* Bovine herpesvirus 5 glycoprotein E is important for neuroinvasiveness and neurovirulence in the olfactory pathway of rabbit. *J Virol*, v. 74, p. 2094-2106, 2000b.

CROCCO, M. *et al.* 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.

CUMMINS J. The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, v. 115 (Suppl.1), p. S23-S29, 2004

D'ANGELO, M. *et al.* 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. *et al.* Evaluation of trypsin treatment on the inactivation of bovine herpesvirus type 1 on in vitro produced pre-implantation embryos. *Reprod Domest Anim*, v. 44, p. 536-9, 2008.

D'ANGELO, M. *et al.* Evaluation of trypsin treatment on the inactivation of bovine herpesvirus type 1 in vitro produced pre-implantation embryos. *Rep Dom Anim*, v. 44, p. 536-539, 2009.

DEKA, D. *et al.* Detection of bovine herpesvirus-1 infection in breeding bull semen by virus isolation and polymerase chain reaction. *Rev Sci Tech*, v. 24, p. 1085-94, 2005.

D'OFFAY, J.M. *et al.* Isolation and characterization of encephalitic bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle in North America. *Am J Vet Res*, v. 54, p. 534-539, 1993.

DORTA, D. J. *et al.* A proposed sequence of events for cadmium-induced mitochondrial impairment. *J Inorg Biochem*, v. 97, p. 251 - 257, 2003.

DREW, T.W. *et al.* BVD virus genotype 2 detected in British cattle. *Vet Rec*, v. 151, p. 551, 2002.

DUMMOLLARD, R. *et al.* The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Curr Top Dev Biol*, v. 77, p. 21-49, 2007.

EARNSHAW, W.C. *et al.* Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Ann Rev Bioch*, v. 68, p. 383-424, 1999.

EDENS, M.S.D. *et al.* Bovine herpesvirus-1 associated with single, trypsin-treated embryos was not infective for uterine tubal cells. *Theriogenology*, v. 60, p. 1495-504, 2003.

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. *et al.* Bovine herpesvirus type 5 in the semen of a bull not exhibiting clinical signs. *Vet Rec*, v. 24, p. 658-659, 2003.

FABIAN, D. *et al.* Apoptotic processes during mammalian preimplantation development. *Theriogenology*, v. 64, p. 221-231, 2005.

FELDMAN, G. Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes matrix expansion and outer membrane rupture in Fas-mediated hepatic apoptosis in mice. *Hepatology*, v. 31, p. 674-83, 2000.

FIGUEIREDO, J.R. *et al.* Biotécnicas e reprodução animal: Princípios básicos, importância e desafios das biotécnicas aplicadas à reprodução animal. *Revista Conselho Federal de Medicina Veterinária*, v. 14, n. 44, 2008.

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

GILLESPIE, J.H. *et al.* Comparison of persistence of semen bovine viruses on bovine embryos following in vitro exposure. *Dtschtierarzti Wschr*, v. 97, p. 65-68, 1990.

GIVENS, M.D *et al.* Diagnostic dilemma encountered when detecting bovine viral diarrhea virus in IVF embryo production. *Theriogenology*, v. 58 p. 1399-1407, 2002.

GOMES, L.I. *et al.* Bovine herpesvirus 5 (BHV-5) in bull semen: amplification and sequence analysis of the US4 gene. *Vet Res Comm*, v. 27, p. 495-504, 2003.

GONÇALVES, P.B.D. *et al.* Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. *Rev Bras Reprod Anim*, v. 31, n. 2, p. 212-217, 2007.

GOSSELIN, J. *et al.* 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.

GRIVICICH, I. *et al.* Morte celular por apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 53 (3), p. 335-343, 2007.

GUERIN, B. *et al.* Effects de la contamination par le BHV-1 sur la maturation et fecundation in vitro des ovocytes des bovines. *Rec Med Vet*, v. 66, p. 911-917, 1990.

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.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, v. 407, p. 770-76, 2000.

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. 3<sup>rd</sup> ed., Savoy, I.L.: IETS, 1998.

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

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

JURISICOVA, A.; ACTON, B.M. Deadly decisions: the role of genes regulating programmed cell death in human preimplantation embryo development. *Reproduction*, v. 128, p. 281-91, 2004.

KAPLOWITZ, N. Cell death at the millennium. Implications for liver diseases. *Clin Liver Dis*, v. 4, p. 1-23, 2000.

KERR, J.F. *et al.* Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, v. 6, p. 239-57, 1972.

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.

KUBOVICOVA, E. *et al.* Alteration in ultra-structural morphology of bovine embryos following subzonal microinjection of bovine viral diarrhea virus (BVDV). *Zygote*, v. 16, p. 187-193, 2008.

KUPFERSCHMIED, H.U. *et al.* Transmission of IBR/IPV virus in bovine semen: a case report. *Theriogenology*, v. 25, p. 439-443, 1986.

LANE, M.; GARDNER, D.K. Amino acids and vitamins prevent culture-induced metabolic perturbations and associated loss of viability of mouse blastocysts. *Hum Reprod*, v. 13, p. 991-97, 1998.

LASSUS, P. *et al.* Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeability. *Science*, v. 297, p. 1352-1354, 2002.

LINDBERG, A. *et al.* Seroconversion to bovine viral diarrhea virus (BVDV) in dairy heifers after embryo transfer. In: *14<sup>th</sup> international congress on animal reproduction*, v. 1, p. 250 [abstract], 2000.

LIU, Q.A.; HENGARTNER, M.O. The molecular mechanism of programmed cell death in *C. elegans*. *Ann N Y Acad Sci*, v. 887, p. 92-104, 1999.

LOCKSHIN, R.A.; WILLIAMS, C.M. Programmed cell death II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J Insect Physiol*, v. 10, p. 643-49, 1964.

LONERGAN, P. *et al.* Effect of time to transfer to granulosa cell monolayer and cell-stage at 48h postinsemination on bovine oocyte development following IVM/IVF/IVC. In: *Proceedings of the English Conference of the European Embryo Transfer Association*, p. 178 (abstract), 1992.

MAKAREVICH, A.V. *et al.* Development and viability of bovine preimplantation embryos after the in vitro infection with bovine herpesvirus-1 (BHV-1): immunocytochemical and ultra-structural studies. *Zygote*, v. 15, p. 307-315, 2007.

MELKA, M. *et al.* Expression of apoptosis regulatory genes and incidence of apoptosis in different morphological quality groups of in vitro-produced bovine pre-implantation embryos. *Reprod Domest Anim*, v. 45, p. 915-921, 2010.

MÉNÉZO, Y. *et al.* DNA damage and repair in human oocytes and embryos: a review. *Zygote*, v. 18, p. 357-365, 2010.

MINGATTO, F. E. *et al.* In vitro interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on oxidative phosphorylation of rat kidney mitochondria: respiration and ATP synthesis. *Arch Biochem Biophys*, v. 342, n. 2, p. 231-235, 1996.

MINGATTO, F.E. *et al.* Effects of nimesulide and its reduced metabolite on mitochondria. *Br J Pharmacol*, v. 131, n. 6, p. 1154-1160, 2000.

MURPHY K.M. *et al.* Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondrial during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death Differ*, v. 7, p.102-11, 2000.

MUYLKENS, B. *et al.* Bovine herpesvirus 1 infection bovine rhinotracheitis. *Vet Res*, v. 38, p. 181–209, 2007.

NICHOLSON, D.W.; THORNBERRY, N.A. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci*, v. 22, p. 299-306, 1997.

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

NUSSBAUM, O. *et al.* Fusion of enveloped viruses with sperm cells: interaction of Sendai, Influenza and Semliki Forest viruses with bull spermatozoa. *Exp Cell Res*, v. 206, p. 11-15, 1993.

OLIVEIRA, M.T. *et al.* Detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in semen from Brazilian bulls. *Theriogenology*, v. 75, p. 1139-45, 2011.

OSÓRIO, F.A. Latency of bovine herpesvirus-1. *Anais do Simpósio International de Herpesvirus Bovino (tipo 1 e 5) e Vírus da Diarréia Viral Bovina*. UFSM, Santa Maria. p. 117-126, 1998.

PAROLIN, M.B.; REASON, I. J. M. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. *Arq Gastroenterol*, v. 38, p. 138-144, 2001.

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. *Aust Vet J*, v. 51, p. 365-369, 1975.

PATEL, T.; GORES, G.J. Apoptosis in liver transplantation: a mechanism contributing to immune modulation, preservation injury, neoplasia and viral disease. *Liv Transpl Surg*, v. 4, p. 42-50, 1998.

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. 169-177, 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.

PETROS, A.M. *et al.* Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta*, v. 1644, p. 83-94, 2004.

PESSARYRE, D. *et al.* Withdrawal of life support, altruistic suicide, fratricidal killing and euthanasia by lymphocytes: different forms of drug-induced hepatic apoptosis. *J Hepatol*, v. 31, p. 760-70, 1999.

PIETERSE, M.C. *et al.* Transvaginal ultrasounded guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology*, v. 35, p. 19-24, 1991.

PIGOSO, A.A. *et al.* Influence of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on calcium efflux in isolated rat renal cortex mitochondria and aspects of mechanisms involved. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 30, p. 961-965, 1998.

RANA, S.K. *et al.* Use of real-time polymerase chain reaction to detect bovine herpesvirus 1 in frozen cattle and buffalo semen in India. *Vet Ital*, v.47, p. 313-22, 2011.

RENESTO, A. Associação das biotécnicas: aspiração folicular guiada por ultrassonografia 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.

RICCI, M.S.; ZONG, W.X. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *Oncologist*, v.11, p. 342-57, 2006.

RISSI, D.R. *et al.* Meningoencefalite por herpesvirus bovino-5. *Pesq Vet Bras*, v. 27, n. 7, p. 251-260, 2007.

ROBERTSON, J.D. *et al.* Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem*, v. 277, p. 29803-29809, 2002.

ROCHA, M.A. *et al.* A high sensitivity-nested PCR assay for BHV-1 detection in semen of naturally infected bulls. *Vet Microb*, v. 63, p. 1-11, 1998.

RODRIGUES, J. L. Transferência de Embriões Bovinos - Histórico e Perspectivas Atuais. *Rev Bras Reprod Anim*, v. 25, n. 2, p.102-107, 2001.

RUPNARAIN, C. *et al.* Colon cancer: genetics and apoptotic events. *Biol Chem*, v. 385, p. 449-64, 2004.

SANCHES, A.W.D. *et al.* Doenças do sistema nervosa central em bovinos no Sul do Brasil. *Pesq Vet Bras*, v.20, p.113-118, 2000.

SCHUDEL, A.A. *et al.* Infections of calves with antigenic variants of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurological disease. *J Vet Med*, v. 33, p. 303-310, 1986.

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

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

SEIDEL, G.E Jr. *et al.* Cryopreservation of bovine embryos in media with chemically defined macromolecules. *Theriogenology*, v. 33, p. 322 (abstract), 1990.

SENEDA, M.M. *et al.* Aspectos técnicos e biológicos da obtenção de oócitos bovinos: revisão de literatura. *Semana: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 23, n. 1, p. 101-110, 2002.

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

SILVA-FRADE, C. *et al.* Effects of bovine Herpesvirus type 5 on development of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology*, v. 73, p. 324-31, 2010a.

SILVA-FRADE, C. *et al.* Apoptotic and developmental effects of bovine Herpesvirus type-5 infection on in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*, v. 74, p. 1296-303, 2010b.

SMITH, K.C. Herpesviral abortion in domestic animals. *Vet J* (review), v. 153, p. 253-68, 1997.

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.

STRINGFELLOW, D.A.; GIVENS, M.D. Infection agents in embryo production: hazards and solutions. *Theriogenology*, v. 53, p. 85-94, 2000a.

STRINGFELLOW, D.A. *et al.* Biosecurity issues associated with current and emerging embryo technologies. *Reprod Fert Dev*, v.16, p. 93-102, 2004.

STUDDERT, M.J. Bovine encephalitis herpesvirus. *The Vet Rec*, v. 25, p. 284, 1989.

TARAZONA, A.M. *et al.* Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced in vitro. *Reprod Dom Anim*, v. 41, p. 5-11, 2006.

TIKOO, S.K. *et al.* Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biological pathogenesis and control. *Adv Virus Res*, v. 45, p. 191-223, 1995.

THIBIER, M. A contrasted year for the world activity of the animal transfer industry: a report from the IETS data retrieval committee. *International Embryo Transfer Society Newsletter*, v. 20, n. 4, p. 13-19, 2002.

THORNBERRY, N.A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. *Science*, v. 281, p. 1312-1216, 1998.

TIEDE, L.M. *et al.* 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.

THOMPSON, C.B. Apoptosis. In: Paul, W.E., editor. *Fundamental immunology*. 4 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, p. 813-29, 1999.

UYEMURA, S.A. *et al.* Diclofenac sodium and mefenamic acid: potent inducers of the membrane permeability transition in renal cortex mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, v. 342, p. 231-235, 1997.

VANDER HEIDEN, M.G.V.; THOMPSON, C.B. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nar Cell Biol*, v. 1, p. E209-16, 1999.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M. *et al.* Effects of different reproduction techniques: AI, MOET, or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology*, v. 53, p. 575–597, 2000.

VANROOSE, G. *et al.* Use of monoclonal antibodies to prevent the bovine herpesvirus-1 induced inhibition of sperm-zona binding. *Theriogenology*, v. 53, p. 322 (abstract), 2000.

VANROOSE, G. *et al.* Effect of bovine herpesvirus-1 or bovine viral diarrhea virus on development of in vitro-produced bovine embryos. *Mol Reprod Dev*, v. 54, p. 255-63, 1999.

VANROOSE, G. *et al.* Comparison of the susceptibility of in vitro produced hatched blastocysts for an infection with bovine herpesvirus-1 and herpesvirus-4. In: *Proceedings of the 12<sup>th</sup> Reunion of European Embryo Transfer Association*. (abstract 206), 1996.

WALDROP, J.G. *et al.* Different strains of noncytopathic bovine viral diarrhea virus (BVDV) vary in their affinity for in vivo-derived bovine embryos. *Theriogenology*, 62:45-55, 2004.

WEIBLEIN, R. *et al.* Bovine meningoencephalitis from IBR virus. *The Vet Rec*, v. 124, p. 666-667, 1989.

WRATHALL, A.E. *et al.* 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.

WRENZYCKI, C. *et al.* Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology*, v. 68, n. 1, p. 77-83, 2007.

YANG, L. *et al.* Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, v. 275, p. 1129-1132, 1997.

YANG, M.Y.; RAJAMAHENDRAN, R. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. *Anim Reprod Sci*, v. 70, p. 159-69, 2002.

YU, S.P.; CHOI, D.W. Ions, cell volume and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 97, p. 9360-362, 2000.

XIA, H. *et al.* Detection and identification of the atypical bovine pestiviruses in commercial foetal bovine serum batches. *PLoS One*, v. 6, n. 12, p. e28853, 2011.

ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S. Caspase-2 function in response to DNA damage. *Biochem Bioph Res Comm*, v. 331, p. 859-867, 2005.

## **OBJETIVOS**

O presente estudo teve como objetivo geral investigar a interação vírus-embrião no mecanismo de morte celular programada, após infecção experimental de oócitos bovinos com BHV-5.

Os objetivos específicos foram:

1. Verificar a taxa de maturação nuclear de oócitos *in vitro*, após a infecção experimental com BHV-5.
2. Analisar a viabilidade mitocondrial dos embriões bovinos produzidos, após infecção experimental com BHV-5 pelo teste de MTT.
3. Avaliar a produção *in vitro* de embriões bovinos, após infecção experimental de oócitos com BHV-5.
4. Determinar a transcrição dos genes Mcl-1, Bax, caspase-2, caspase-3 e Apaf-1, relacionados à apoptose.

## **CAPÍTULO I**

## RESUMO

É sabido que alguns patógenos podem desencadear o processo de apoptose em determinadas células do organismo, entretanto, o BHV-5 inibe a apoptose em embriões bovinos com sete dias de desenvolvimento. Por esta razão, o objetivo deste trabalho foi investigar a interação vírus-embrião no mecanismo de morte celular programada. Oócitos bovinos foram divididos em dois grupos, sendo: I (controle) e II (exposto ao BHV-5). Após 24 horas de maturação *in vitro*, 100 oócitos de cada grupo foram desnudados e observados em microscópio invertido para verificação da extrusão do primeiro corpúsculo polar, sendo o restante dos oócitos incubados com espermatozoides, por 18 a 20 horas, para que ocorresse o processo de fertilização *in vitro*. Transcorrido este período, os prováveis zigotos foram desnudados e transferidos para gotas contendo meio de cultivo (mSOF), até o dia sete pós-inseminação. Os embriões produzidos *in vitro* foram submetidos à técnica de PCR em tempo real para pesquisa do BHV-5 e análise da transcrição dos genes Mcl-1, Bax, caspase-2, -3 e Apaf-1 relacionados à apoptose, além do teste de MTT ((3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)), para avaliação da atividade mitocondrial. A análise estatística para a taxa de maturação nuclear dos oócitos foi feita pelo teste de  $\chi^2$ . A produção *in vitro* de embriões, MTT e transcrição gênica foi avaliada pelo teste *t* não pareado. Observou-se que o BHV-5 não interferiu na taxa de maturação nuclear dos oócitos e no desenvolvimento embrionário, entretanto os embriões do grupo I apresentaram maior viabilidade mitocondrial e os embriões do grupo II tiveram a expressão dos genes Bax e caspase-2 diminuídos, comprovando que o vírus inibiu o processo de morte celular programada nos embriões bovinos sete dias pós-inseminação, a fim de favorecer a disseminação viral.

Palavras-Chave: apoptose, MTT, oócitos, qPCR e vírus

## ABSTRACT

It is known that some pathogens can initiate apoptosis in certain cells of the organism, however, BHV-5 inhibits apoptosis in bovine embryos after seven days of development. Therefore, the aim was to investigate the interaction virus-embryo in the mechanism of programmed cell death. Bovine oocytes were divided into two groups: I (control) and II (exposed to BHV-5). After 24 hours of *in vitro* maturation, 100 oocytes of each group were denuded and observed under inverted microscope to check the extrusion of the first polar body, and the other oocytes were incubated with spermatozoa for 18 to 20 hours, for *in vitro* fertilization. After this period, presumptive zygotes were denuded and transferred to drops containing culture medium (mSOF), until day seven post-fertilization. *In vitro* produced embryos were submitted to real time PCR to evaluate the presence of BHV-5 and expression of Mcl-1, Bax, caspase-2, -3 and Apaf-1 related to apoptosis, also the MTT assay ((3 - [4,5-dimethylthiazol - 2-yl] -2,5-diphenyl tetrazolium bromide)) was performed for the evaluation of mitochondrial activity. Statistical analysis for nuclear maturation of oocytes was performed by  $\chi^2$  test. *In vitro* embryo production, MTT and gene expression were analyzed by unpaired *t* test. It was observed that BHV-5 did not influence nuclear maturation rate of oocytes or embryonic development, however embryos of group I showed greater mitochondrial viability, and embryos of group II had a decrease in genes expression of Bax and caspase-2, suggesting that the virus inhibited the process of programmed cell death in bovine embryos seven days post-fertilization, in order to promote viral spread.

Keywords: apoptosis, MTT, oocytes, qPCR and virus

## 1. INTRODUÇÃO

O *Herpesvirus* bovino é um patógeno que acomete a espécie bovina, podendo estar presente em animais aparentemente saudáveis. Existem três tipos conhecidos de *Herpesvirus* bovino (BHV-1, 4 e 5), os quais estão associados a distúrbios reprodutivos (SMITH, 1997). O BHV-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 à infecção sistêmica em neonatos.

O BHV-5 e o BHV-1 são *alfa-Herpesvirus* e apresentam 85% de identidade genômica (CHOWDHURY, 1995). Assim, apesar das escassas informações disponíveis a respeito do BHV-5 relacionado com o sistema reprodutivo, supõe-se que, após a reativação e replicação viral, o mesmo possa causar distúrbios reprodutivos em bovinos. O BHV-5 é o agente causador da segunda mais importante doença infecciosa cerebral, denominada de encefalite herpética, a qual afeta rebanhos bovinos na América Latina. O vírus é caracterizado por uma rápida replicação lítica em cultura de células e, como o BHV-1, estabelece latência nos gânglios sensoriais do sistema nervoso do hospedeiro (RISSI et al., 2007; WRATHALL et al., 2006). O BHV-5 foi detectado no sêmen bovino (GOMES et al., 2003; KIRKLAND et al., 2009) e em fetos abortados, mas nenhum relato menciona sua presença em gametas e embriões bovinos. Silva-Frade et al. (2010a) realizou o primeiro estudo *in vitro* com o BHV-5, expondo oócitos, espermatozoides e embriões bovinos ao vírus, concluindo que o BHV-5 infecta gametas e embriões bovinos, podendo ser propagado durante o procedimento de fecundação e cultura *in vitro*, sem apresentar prejuízo no número de embriões produzidos *in vitro*.

Estes achados resultam em grande preocupação sanitária e comercial, uma vez que machos que albergam o vírus no estágio de latência podem liberá-lo no sêmen após reativação viral, desencadeada por fatores

estressantes (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 2000), tais como: transporte, vacinação, variações de temperatura, entre outros. 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 (WRENZYCKI et al., 2007). Oócitos e embriões também podem ser infectados pelo BHV-5 através dos componentes de origem animal presentes nos meios utilizados para produção *in vitro* de embriões bovino (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 2000). Segundo Cardoso et al., 2005 e Makoschey et al., 2002 o soro fetal bovino (SFB), comumente utilizado na PIVE, pode ser responsável por carrear fungos, bactérias e vírus para o sistema.

A infecção viral geralmente resulta em alteração no processo de morte celular programada, pela via mitocondrial, estimulando ou inibindo genes relacionados à apoptose, favorecendo a replicação e disseminação viral (HAY e KANNOURAKIS, 2002). A apoptose pode também servir como uma resposta celular inata à infecção, a qual limita o tempo e a maquinaria celular disponível para a replicação do vírus (VAUX et al, 1994).

As características típicas de células apoptóticas incluem alterações celulares, morfológicas e bioquímicas, tais como condensação da cromatina, exposição da fosfatidilserina (PS), retração citoplasmática, invaginação da membrana, fragmentação do DNA e ativação da caspase (HAY e KANNOURAKIS, 2002). Muitos dos principais eventos bioquímicos que ocorrem durante a apoptose são mediados por proteases (KIDD et al., 2000), as mais importantes delas são as caspases (proteases cisteína dependentes de específico aspartato).

A apoptose é iniciada por mecanismos extrínsecos ou intrínsecos. O desencadeamento extrínseco da apoptose ocorre após a ligação dos receptores de morte com o fator de necrose tumoral (TNF), ligante Fas (FasL) e TNF relacionado com ligantes indutores da apoptose (TRAIL). A ligação do receptor TNF resulta na formação do complexo sinalizador da indução da morte (DISC) (KISCHKEL et al., 1995) necessário para a ativação das caspases

iniciadoras. A ativação intrínseca da apoptose é desencadeada após a translocação dos membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, como Bid ou Bax, na mitocôndria (YIN, 2006; YOULE et al., 2008), resultando na formação de poros e permeabilidade da membrana externa da mitocôndria (YIN, 2006; CARRIDO et al., 2006).

Os mecanismos da apoptose apresentam muitas etapas individuais. O vírus pode influenciar apenas um único ponto do processo ou o progresso da morte celular programada pela manipulação de uma variedade de proteínas apoptóticas essenciais (HAY e KANNOURAKIS, 2002).

Como explicado acima, a proteína efetora chave que é ativada durante a apoptose e representa o alvo dos vírus para a inibição da apoptose, são as caspases (KISCHKEL et al., 1995). As caspases efetoras e iniciadoras avaliadas neste experimento foram caspase-2 e -3, respectivamente. As caspases existem na célula como pró-caspases inativas ou zimogênio e, para serem ativadas é necessário à clivagem das mesmas (DENAULT e SALVESEN, 2002).

A atividade das caspases é regulada pela família de proteínas Bcl-2 (REED, 1997; ADAMS e CORY, 1998; GREEN e REED, 1998) as quais foram divididas em dois subgrupos: aqueles que exercem efeitos antiapoptóticos (por exemplo, Mcl-1) e aqueles que são pró-apoptóticos (por exemplo, Bax) (CORY e ADAMS, 1998). Encontrou-se que a proteína Bcl-2 previne a apoptose por diversos estímulos e mantém a sobrevivência celular por influenciar na liberação do citocromo c da mitocôndria (YANG et al., 1997), o qual no citosol se liga ao Apaf-1 e a pró-caspase-9, formando o chamado apoptossomo, promovendo assim a ativação da caspase-9 (BUDIARDJO et al., 1999). Uma vez ativada, a caspase-9 ativa a caspase-3 que vai desencadear a cascata das caspases (RUPNARAIN et al., 2004; PETROS; OLEJNICZAK e FESIK, 2004).

A hipótese do presente estudo foi de que o BHV-5 inibe a transcrição de algum gene relacionado à apoptose, a fim de manter a viabilidade embrionária e, desta forma se replicar com eficiência.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. 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.

### 2.2. Exposição experimental de oócitos bovinos ao BHV-5

Foram utilizadas amostras de BHV-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 (TCID<sub>50</sub>) foi realizada após o cultivo *in vitro* do vírus, na sequência 0,1 m.o.i. (“multiplicity of infection dose” – 10<sup>2</sup> TCID<sub>50</sub>/mL) (FERRARI, et al., 2007; DEL MEDICO ZAJAC, et al., 2011). Alíquotas do estoque do vírus (100 µL) com 10<sup>3.3</sup> TCID<sub>50</sub>/50 µL foram congeladas a -86°C até o momento do uso.

Os oócitos utilizados foram obtidos a partir de ovários de animais abatidos em frigorífico, sendo estes transportados para o laboratório no prazo de uma hora *post mortem* em solução fisiológica a 37°C. Os complexos *cumulus*-oócito (COC) foram recuperados por aspiração dos folículos com diâmetro de 2-6 mm, com auxílio de seringa (10 mL) e agulha (40x12). Apenas os COC que apresentavam 3 a 4 camadas ou mais de células do *cumulus* compacta e citoplasma homogêneo foram selecionados. Estes foram divididos em dois grupos: I (controle) e II (exposto ao BHV-5) e acondicionados em criotubos contendo 400 µL de meio de maturação (MM).

O grupo I recebeu 40 µL de MEM e o grupo II, 40 µL de suspensão viral, oriundas do estoque de vírus. Os criotubos foram incubados por uma hora em estufa Thermo Scientific (Spectrun, modelo 3110) com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub> em ar, para permitir a adsorção viral.

### **2.3. Maturação *in vitro* dos oócitos**

Após o período de adsorção viral, os oócitos foram lavados por três vezes em MM e alocados em gotas de 70 µL de MM, distribuídas em placa de Petri (35x10 mm), sob óleo mineral, sendo que cada gota continha de 20 a 25 oócitos.

A gota de cultura foi a unidade experimental do trabalho, sendo realizadas 23 repetições, ou seja, 23 gotas (unidades experimentais) para cada grupo. Em cada etapa foi feito o mesmo número de gotas para cada grupo, e as placas foram mantidas na mesma estufa de cultura, sob as mesmas condições.

Durante o período de maturação, os oócitos foram mantidos em estufa Thermo Scientific (Spectrun, modelo 3110), com atmosfera úmida, a 5% de CO<sub>2</sub> em ar, a 38,8°C, por um período de 23 horas, que somados à uma hora da exposição experimental ao BHV-5, totalizaram 24 horas.

### **2.4. Avaliação da Taxa de Maturação Oocitária**

Foram realizados os processos de colheita de oócitos, exposição experimental ao BHV-5 e maturação *in vitro* (MIV), como descrito anteriormente. Após as 24 horas da etapa de maturação, 100 oócitos de cada grupo (I e II) 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 total das células do *cumulus*. Após as lavagens e a completa remoção das células do *cumulus*, os oócitos foram analisados individualmente em microscopia invertida com aumento de 40X, sendo contados os oócitos que apresentavam a extrusão do primeiro corpúsculo polar, evento este que caracteriza a maturação oocitária nuclear (n=100).

## 2.5. Fecundação e cultura *in vitro*

Foi utilizado na fecundação *in vitro* (FIV), sêmen congelado de bovino (*Bos indicus*) em palhetas 0,5 mL, de um único touro e da mesma partida. O sêmen foi centrifugado em gradiente de Percoll a 700 xg 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/mL de BSA, 30 µg/mL de heparina e solução de PHE (2 mM de penicilamina, 1 mM de hipotaurina e 250 mM de epinefrina) e novamente centrifugado a 200 xg por 5 minutos. O “pellet” foi diluído em meio TALP-FERT para uma concentração final de  $1 \times 10^5$  espermatozoides/mL, em gotas de 100 µL. Após 24 horas de maturação, os oócitos foram lavados e transferidos para gotas com 100 µL de meio TALP-FERT.

Na 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 com 100 µL de meio de cultura *in vitro* mSOF (“modified Synthetic Oviduct Fluid”) até o dia sete (D7), sendo considerado dia zero (D0) o dia da fecundação. A taxa de clivagem foi avaliada no dia três (D3) e o “feeding” realizado, ou seja, de cada gota de cultivo foi removido o volume de 50 µL e acrescentado 50 µL de meio fresco de mesma composição. O procedimento de “feeding” foi repetido no dia cinco (D5). A FIV e a cultura foram realizadas sob as mesmas condições descritas para a MIV.

O desenvolvimento embrionário foi monitorado, sendo oócitos clivados e os estágios blastocisto (BL), blastocisto expandido (BX) e blastocisto eclodido (BE) avaliados no D3 e D7, respectivamente.

No dia sete 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. Os reagentes de origem animal utilizados neste estudo foram testados para a presença do BHV-1 e 5 (SILVA-FRADE, et al., 2010a), a fim de garantir a ausência da contaminação viral de caráter não experimental.

## **2.6. Recuperação Viral**

Os embriões (n=10) derivados dos grupos I e II foram congelados e descongelados três vezes, para promover 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., 2010a,b). O período de adsorção foi de 90 minutos 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 três passagens, culturas que não apresentaram efeitos citopáticos foram consideradas negativas.

## **2.7. Atividade mitocondrial**

A atividade mitocondrial foi avaliada com o uso do kit “In vitro toxicology assay kit MTT based” (M5655, Sigma-Aldrich), utilizando espectrofotometria.

O sistema MTT mensura a atividade das células viáveis por meio das desidrogenases mitocondriais. É um método simples, acurado e com resultados reproduzíveis. O componente chave é (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) ou MTT. A solução de MTT, dissolvida em solução salina balanceada sem soro ou fenol “red”, apresenta cor amarelada. As desidrogenases mitocondriais das células viáveis clivam o anel tetrazolium, formando cristais de formazan, os quais apresentam cor roxa e são insolúveis em água. Os cristais são dissolvidos em isopropanol acidificado, resultando em uma solução roxa que é mensurada por espectrofotometria. Quanto maior o número de cristais de formazan, maior o valor de leitura no espectrofotômetro para o teste, menor citotoxicidade e, conseqüentemente, maior viabilidade mitocondrial.

Para as análises o tubo contendo MTT foi reconstituído em 3 mL de solução salina balanceada. Em seguida, 10 embriões foram pipetados dando um volume de 50 µL, o qual foi colocado em tubo tipo eppendorf, sendo

acrescido de 5 µL da solução de MTT, diluição de 1:10. O tubo contendo embriões e MTT foi incubado em estufa por 4 horas. Após o período de incubação, os cristais de formazan foram dissolvidos com a adição de 50 µL de MTT “Solubilization Solution” (M8910, Sigma-Aldrich) e homogeneizados cuidadosamente. Posteriormente, 50 µL desta solução foi colocada em cubeta e submetida à leitura em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 570 nm.

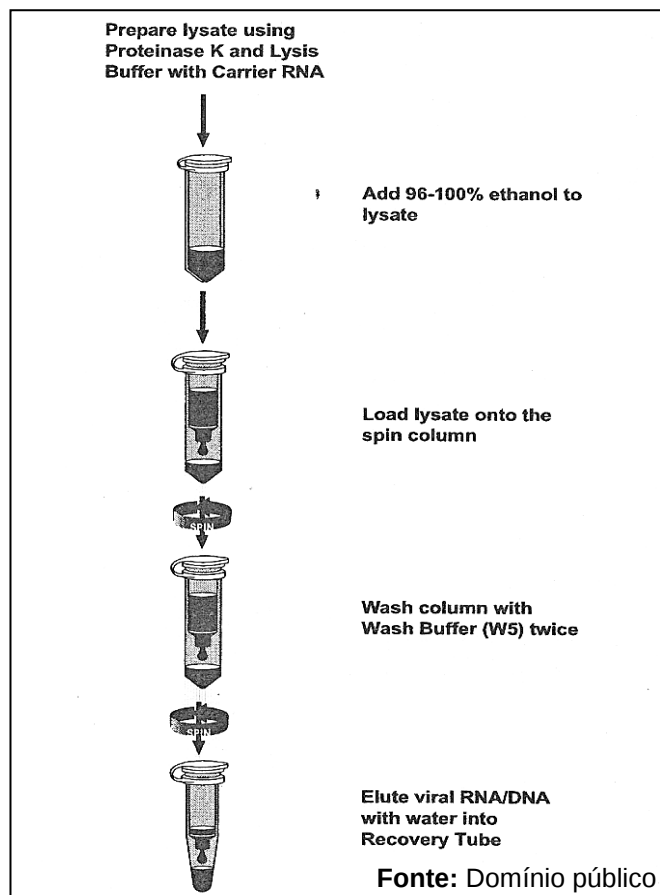
Todas as leituras foram feitas sempre com o emprego do controle negativo, sendo usado meio mSOF sem células (embriões), com leitura sempre negativa, tendo como valor médio de absorbância -0,243.

## **2.8. PCR em tempo real**

### **2.8.1. Extração do DNA**

O DNA dos embriões pertencentes aos grupos I e II foram extraídos com uso do Mini Kit PureLink™ Viral RNA/DNA (Invitrogen™, cat # 12280-050, FIGURA 10), seguindo as recomendações do fabricante. Para cada grupo foram utilizados 10 embriões no D7 (dia sete pós-inseminação). Após extração, as amostras de DNA foram quantificadas no equipamento NanoDrop 3.1.2 (ND1000, Applied Biosystems), apresentando valor médio de 578,8 ng/µL e 620,5 ng/µL de DNA para os grupos I e II, respectivamente.

Estas amostras de DNA foram diluídas para a concentração de 100 ng por reação e utilizadas na PCR em tempo real para detecção do BHV-5.



**FIGURA 10.** Extração de DNA viral usando o PureLink™.

### 2.8.2. Extração do RNA e síntese de cDNA

Os RNAs, pertencentes aos grupos I e II, foram extraídos com uso de Mini Kit PureLink™ Viral RNA/DNA (Invitrogen™, cat # 12280-050), seguindo as recomendações do fabricante. Para cada grupo, foram utilizados 10 embriões no D7 (dia 7 pós-inseminação). Após extração, as amostras foram tratadas com DNase e quantificadas no equipamento NanoDrop 3.1.2 (ND1000, Applied Biosystems), apresentando valor médio de 2,7 ng/μL e 2,8 ng/μL de RNA para os grupos I e II, respectivamente.

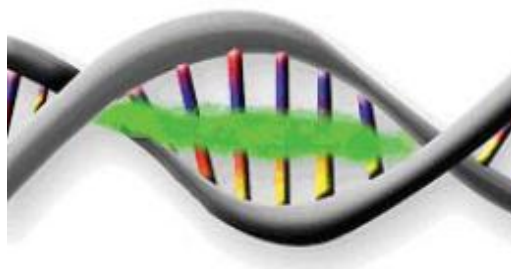
Estas amostras de RNA foram convertidas em cDNA com o uso do Kit high capacity RNA-to-cDNA™ (Applied Biosystems) e, então, utilizadas na PCR em tempo real para determinação da transcrição dos genes: Apaf-1, Bax, caspase-2, -3, Mcl-1 e histona 2a.

### 2.8.3. Detecção viral (sistema SYBR® Green)

Para a detecção do BHV-5 foram sintetizados os “primers” pela Applied Biosystems, conforme representado no Anexo 1. O sistema de detecção empregado foi o SYBR® Green (agente ligante de DNA, FIGURA 11), portanto não há necessidade do uso de sonda TaqMan® (sondas de hidrólise), tornando a técnica menos onerosa e viável na rotina laboratorial.

A reação consiste de 25 µL, sendo 12,5 µL de SYBR-Green master mix, 100 µM de cada “primer”, 100 ng da amostra e água ultrapura livre de DNA/RNA (Invitrogen™) para completar o volume final. O volume da reação foi multiplicado pelo número de amostras a serem analisadas, excluindo o volume da amostra (DNA). O volume total foi pipetado em tubo tipo eppendorf de 1,5 mL e, então distribuído nos poços da placa, sendo que cada poço recebeu, posteriormente, a amostra a ser testada. A placa foi vedada e centrifugada brevemente e, em seguida, foi levada ao Step One Plus (Applied Biosystems) e iniciada a corrida. As condições da corrida foram: desnaturação inicial 95°C por 15 minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, com a extensão final de 72°C por 10 minutos.

Foram testados 3 genes referência (histona 2a,  $\beta$ -actina e GAPDH) em reações separadas para verificar a curva de dissociação (curva de dissociação), curva padrão e a eficiência da amplificação. Para a curva padrão, as amostras foram diluídas em 100 ng, 20 ng, 4 ng, 0,8 ns e 0,16 ng. O método do  $\Delta C_t$  foi usado para analisar os resultados da expressão do gene US9 (BHV-5) em embriões do grupo I e II, levando em consideração os genes referência histona 2a,  $\beta$ -actina e GAPDH (Anexo 1).



Fonte: Domínio público

**FIGURA 11.** Molécula de SYBR® Green entre a dupla fita de DNA.

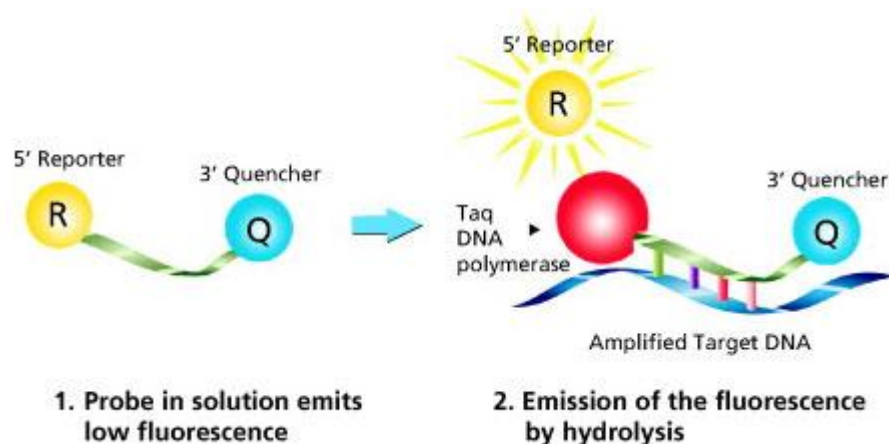
#### 2.8.4. Expressão gênica (sistema TaqMan®)

A reação de PCR em tempo real foi realizada no Step One Plus™ (Applied Biosystems), usando TaqMan Gene Expression Assays para expressão dos genes: Apaf-1 (Bt03210919\_g1), Bax (Bt03211776\_m1), caspase-2 (Bt03817113\_m1), caspase-3 (Bt03250955\_g1) e Mcl-1 (Bt03276965\_g1), todos itens inventoriados pela Applied Biosystems, cuja sonda empregada foi a FAM-MGB (região 5') (FIGURA 12).

A reação final foi de 20 µL, sendo 1 µL do TaqMan Gene Expression Assay ("primer" e sonda), 10 µL do Master Mix, 4 µL da amostra (cDNA) e 5 µL de água RNase-free. O volume da reação foi multiplicado pelo número de amostras a serem analisadas, excluindo o cDNA. O volume total foi pipetado em tubo tipo eppendorf de 1,5 mL e, então distribuído nos poços da placa, sendo que cada poço recebeu, posteriormente, o cDNA correspondente a amostra a ser testada. A placa foi vedada e centrifugada brevemente e, em seguida, foi levada ao equipamento e iniciada a corrida.

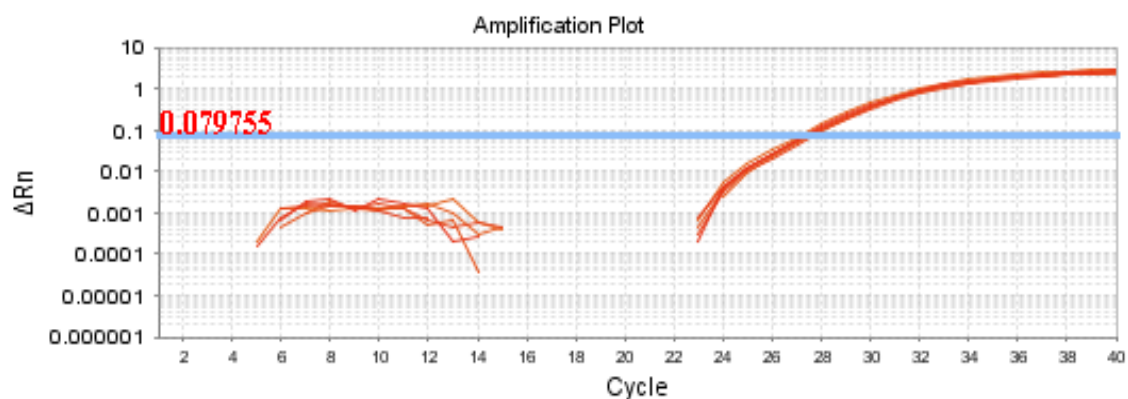
Em todas as corridas foi utilizado o gene referência histona 2a, cuja expressão não se altera nos embriões do grupo I e II. Além disso, todas as reações foram feitas em triplicata para assegurar os resultados.

A abundância relativa do gene transcrito foi calculada baseada no valor do  $\Delta C_t$  ("Threshold cycle") obtido após traçar o "Threshold" (FIGURA 13).

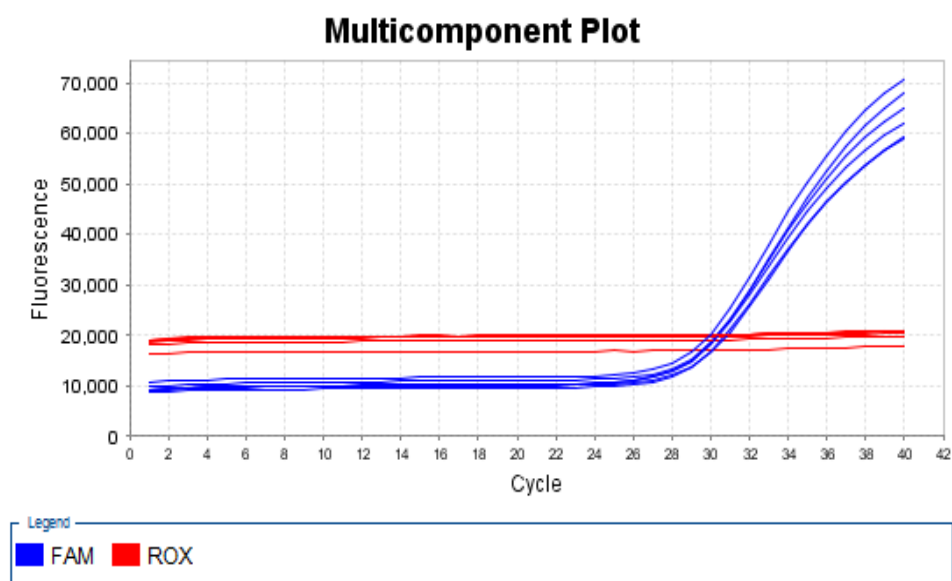


Fonte: Domínio público

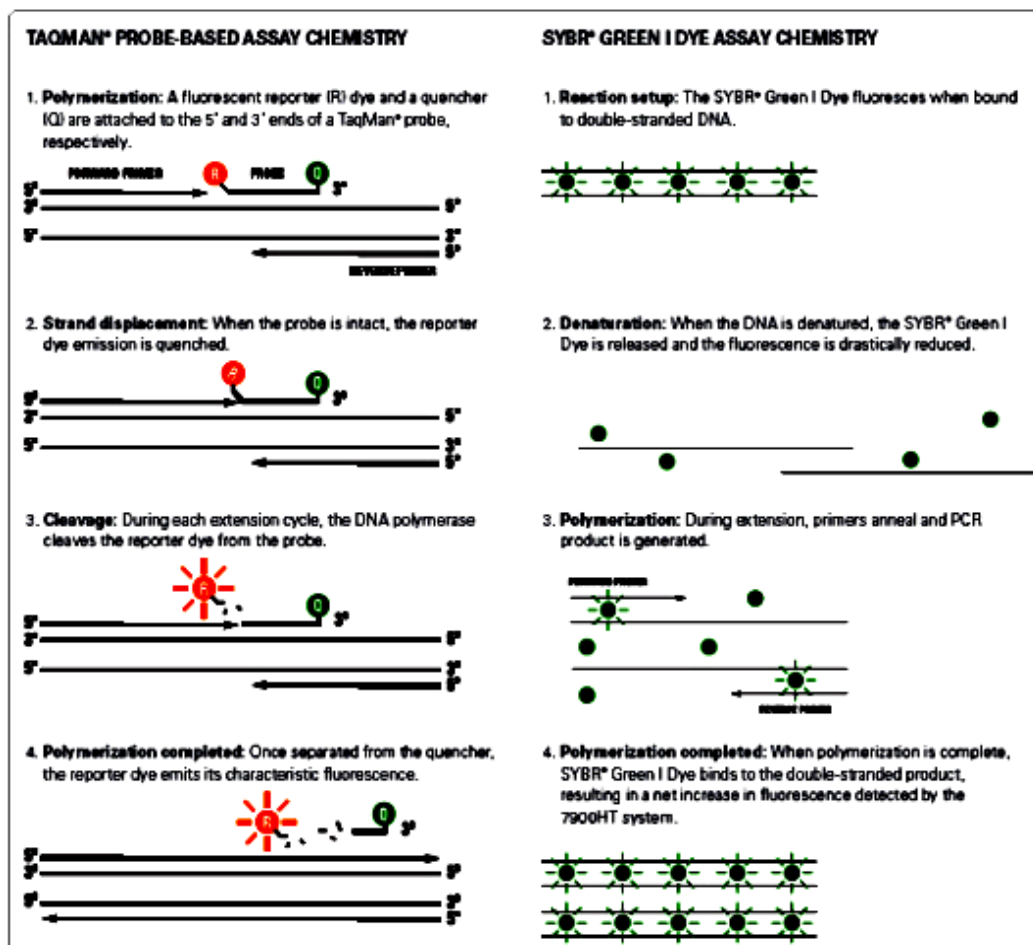
**FIGURA 12.** Representação esquemática da Sonda TaqMan.



**FIGURA 13.** “Threshold” colocado manualmente na região exponencial para amplificação do gene referência Histona 2a.



**FIGURA 14.** Representação da fluorescência para o gene referência Histona 2a, cuja sonda foi FAM-MGB, bem como para o corante passivo ROX (calibrador).



Fonte: Domínio público

**FIGURA 15.** Comparação entre os sistemas de detecção TaqMan® e SYBR® Green.

## 2.9. Análise Estatística

As taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário, bem como a viabilidade celular foram analisadas pelo teste  $t$  não pareado, sendo considerada diferença significativa para  $p < 0,05$ . A taxa de maturação foi avaliada pelo teste de  $\chi^2$ . A análise dos genes referência foi feita pela correlação linear e determinação do coeficiente de determinação ( $r^2$ ) sendo usado teste  $t$  não pareado para verificar a expressão dos genes Mcl-1, caspase-2, caspase-3, Apaf-1 e Bax, sendo considerada diferença significativa para  $p < 0,05$ .

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Avaliação da Taxa de Maturação Oocitária

A taxa de maturação oocitária não diferiu entre os grupos, como se pode observar na Tabela 1.

**Tabela 1.** Percentual de oócitos que apresentaram extrusão do primeiro corpúsculo polar para os grupos avaliados.

| GRUPOS       | % DE OÓCITOS COM CORPÚSCULO POLAR |
|--------------|-----------------------------------|
| I (CONTROLE) | 92,0±1,2 <sup>a</sup> (92/100)    |
| II (BHV-5)   | 89,0±1,4 <sup>a</sup> (89/100)    |

<sup>a</sup> Valores seguidos de mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste  $\chi^2$



**FIGURA 16.** Oócito maturado *in vitro*, desnudo, com a extrusão do primeiro corpúsculo polar, indicado pela seta (Grupo I), aumento 40X.



**FIGURA 17.** Oócito maturado *in vitro*, desnudo, com a extrusão do primeiro corpúsculo polar, indicado pela seta (Grupo II), aumento 40X.

### **3.2. Desenvolvimento Embrionário e Detecção Viral**

O grupo controle (grupo I) foi composto por 357 oócitos não expostos ao BHV-5, enquanto 388 oócitos compuseram o grupo exposto (grupo II). A exposição viral experimental resultou em diferença significativa ( $p=0,0336$ ) na taxa de clivagem (Tabela 2), sendo 87,7% e 84,5% para os grupos I e II, respectivamente. Entretanto, não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ) no desenvolvimento embrionário até o dia 7 pós-inseminação. Foram considerados na contagem BL, BX e BE; no grupo I foram obtidos 195 embriões (54,6%) e no grupo II, 193 (49,7%). Para confirmar a infecção viral, antígenos do BHV-5 foram identificados pela técnica de PCR em tempo real. Apenas a amostra com embriões do grupo II foi positiva para o BHV-5. Nenhuma evidência de contaminação por BHV-5 foi ser observada nos oócitos, espermatozoides e embriões oriundos do grupo I (dados não mostrados).

**Tabela 2.** Efeito da infecção experimental com BHV-5 em oócitos bovinos sobre o desenvolvimento embrionário *in vitro*.

| Grupos       | Oócitos<br>(n) | Desenvolvimento embrionário - n<br>(%) |                             |
|--------------|----------------|----------------------------------------|-----------------------------|
|              |                | Clivados<br>72 h                       | BI/Bx/Be<br>168 h           |
| I (Controle) | 357            | 313±6,5 (87,7) <sup>a</sup>            | 195±3,2 (54,6) <sup>a</sup> |
| II (BHV-5)   | 388            | 328±8,9 (84,5) <sup>b</sup>            | 193±3,2 (49,7) <sup>a</sup> |

<sup>a,b</sup> Valores seguidos de mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste *t* não pareado ( $p>0,05$ )  
h = horas pós-inseminação

### 3.3. Atividade mitocondrial

Os valores de MTT foram maiores ( $p=0,0026$ ) para o grupo I (2,753) quando comparado ao II (1,480), ou seja, mais cristais de formazan foram produzidos no grupo I, mostrando que o grupo II apresenta maior número de mitocôndrias danificadas, maior citotoxicidade e menor viabilidade mitocondrial (Tabela 3).

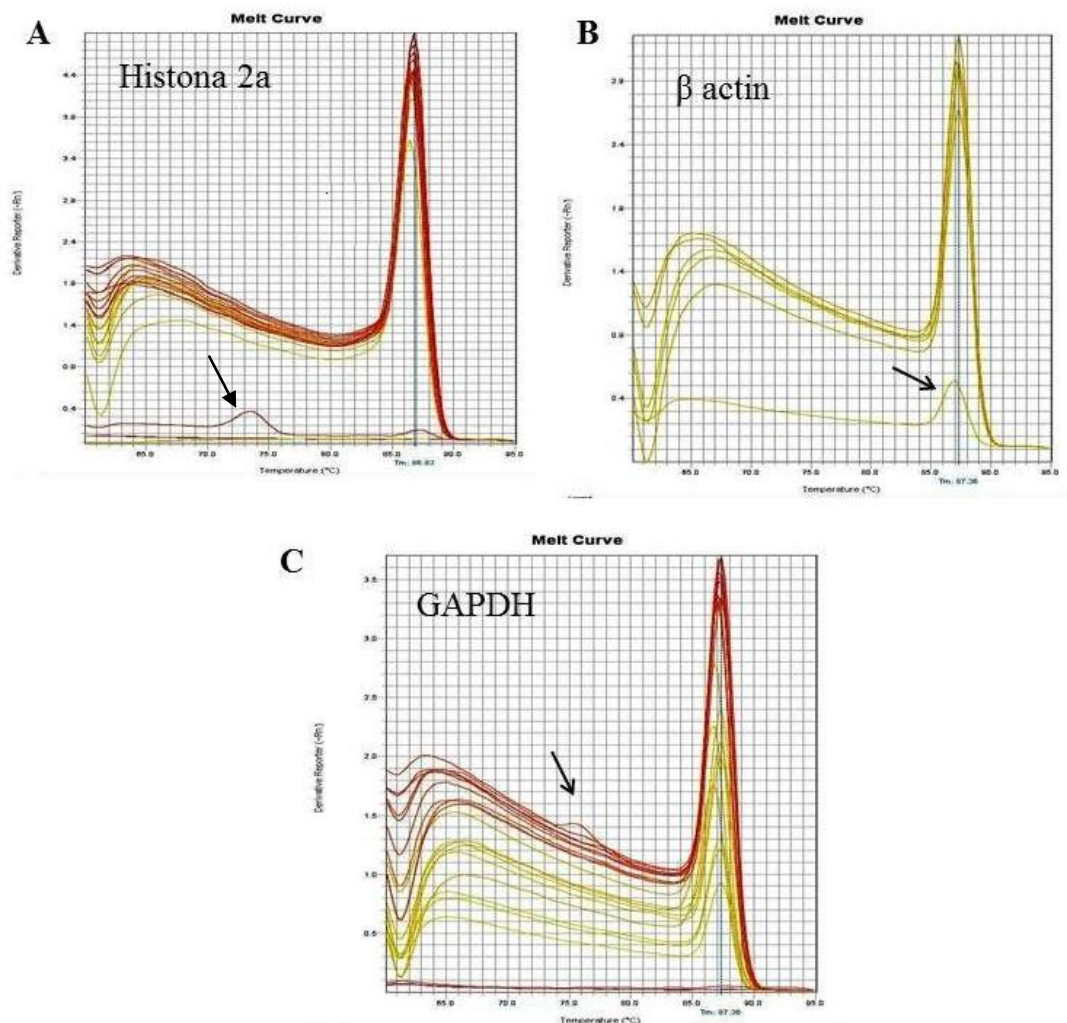
**Tabela 3.** Resultados da atividade mitocondrial pela dehidrogenase mitocondrial (teste de MTT)

| GRUPOS       | Valor médio de absorbância |
|--------------|----------------------------|
| I (CONTROLE) | 2,753±0,019 <sup>a</sup>   |
| II (BHV-5)   | 1,265±0,074 <sup>b</sup>   |

<sup>a,b</sup> Valores seguidos de mesma letra, na coluna, não diferem entre si ( $p>0,05$ ), pelo teste *t* não pareado

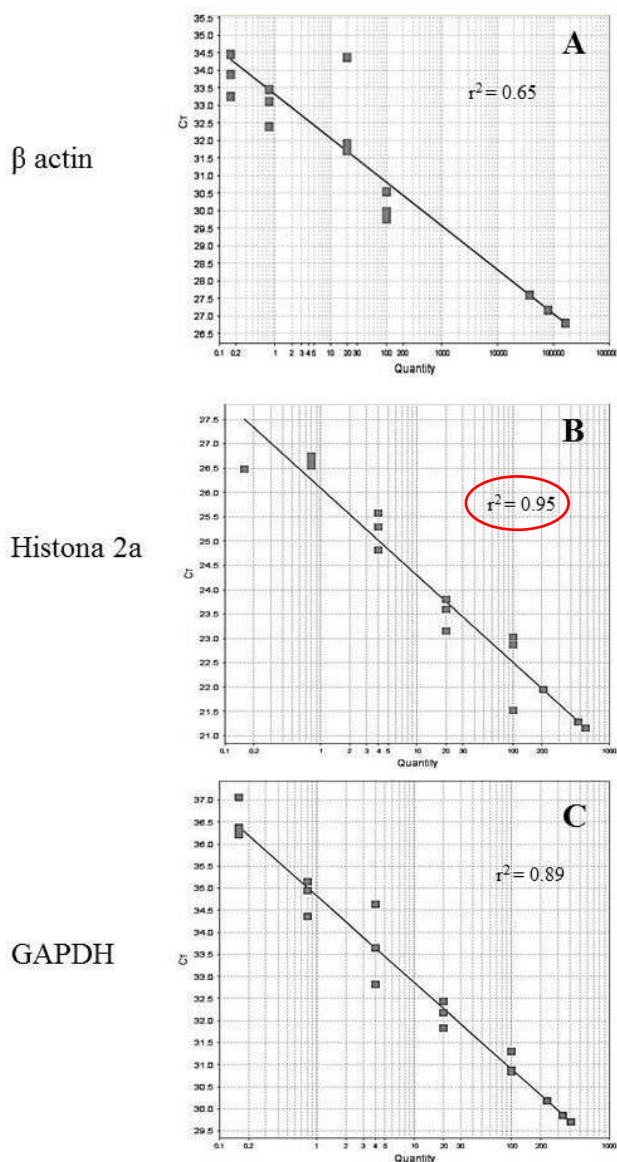
### **3.4. Detecção viral**

A sensibilidade da detecção com SYBR® Green pode ser comprometida pela formação de dímeros de “primers”, a falta de especificidade e concentração dos “primers”, além da formação de estruturas secundárias no produto da PCR. Todos esses fatores podem levar à produção de produto inespecífico de DNA de fita dupla, os quais incorporam SYBR-Green e produzem sinal de fluorescência (FIGURA 18). O ensaio utilizando sondas TaqMan® também pode ser comprometido pela formação de dímeros de “primers”, no entanto estes produtos não são detectados na reação e, portanto, não alteram a eficiência de amplificação.



**FIGURA 18.** Curva de dissociação dos genes referência: A. Histona 2a; B.  $\beta$ -actina e C. GAPDH, nas setas a representação de reações inespecíficas (A e B) e formação de dímeros de “primer” (C)

Após a corrida e verificação da curva de dissociação foi feita a correlação linear para constatar a eficiência da amplificação, o maior valor do coeficiente de determinação ( $r^2=0,95$ , FIGURA 19B) representa o melhor gene referência para o estudo em questão, ou seja, a histona 2a é o gene referência mais adequado para estudos com embriões bovinos infectados com BHV-5 quando comparada com a  $\beta$ -actina e o GAPDH (FIGURA 19).



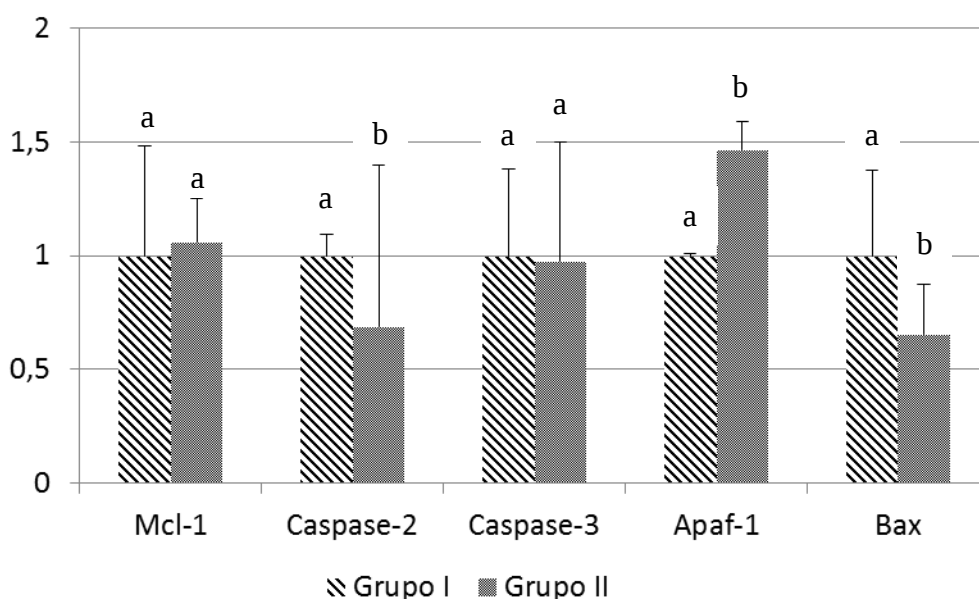
**FIGURA 19.** Correlação linear para os genes referência: A.  $\beta$ -actina, B. histona 2a e C. GAPDH, em destaque o maior valor para o coeficiente de determinação.

Adotando-se o gene referência histona 2a para a detecção do BHV-5 em embriões bovinos pertencentes ao grupo I e II e nas células MDBK 72h pós-infecção, foi possível observar que o vírus estava presente nas amostras de embriões oriundas de oócitos expostos ao BHV-5 (grupo II), assim como nas células MDBK cultivadas com fragmentos dos embriões do grupo II,

apresentando valores de Ct iguais a 36,5 e 32,8, respectivamente. Os embriões do grupo I e as células MDBK cultivadas com fragmentos de embriões deste grupo não apresentaram pico de fluorescência, ou seja, foram negativos para a presença do BHV-5.

### 3.5. Expressão gênica

Quanto à expressão dos genes Mcl-1, caspase-2, caspase-3, Apaf-1 e Bax, a detecção foi feita pelo sistema TaqMan® e os resultados estão apresentados na FIGURA 20. Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na expressão da caspase-2, Apaf-1 e Bax, sendo que a caspase-2 ( $p = 0,0253$ ) e o Bax ( $p = 0,0232$ ) foram mais expressos no grupo I e o Apaf-1 foi mais expresso ( $p = 0,0381$ ) no grupo II. Entretanto, não houve diferença estatística na expressão dos genes Mcl-1 e caspase-3 ( $p > 0,05$ ).



**FIGURA 20.** Diferentes expressões dos genes Mcl-1, caspase-2, caspase-3, Apaf-1 e Bax para os grupos I e II. Dados são apresentados como média e desvio padrão ( $p < 0,05$ ) de três replicatas.

#### 4. DISCUSSÃO

Observou-se que a taxa de maturação dos oócitos expostos ou não ao BHV-5 foi similar ( $p>0,05$ ), mostrando que o vírus não afetou o processo de maturação nuclear *in vitro*, a qual foi avaliada pela extrusão do primeiro corpúsculo polar. A exposição experimental dos oócitos ao BHV-5 diminuiu a taxa de clivagem, entretanto este resultado não comprometeu o desenvolvimento embrionário e a produção *in vitro* de embriões, dados estes verificados anteriormente por Silva-Frade et al. (2010a).

Guerin et al. (1990), usando espermatozóides infectados com BHV-1 e oócitos expostos ao BHV-1 para a produção *in vitro* de embrião, demonstraram que o BHV-1 não interferiu na maturação oocitária, mas reduziu significativamente a clivagem. O vírus não foi somente adsorvido aos gametas, como também prejudicou a fertilização *in vitro*, possivelmente devido ao efeito sobre a penetração espermática ou a interação com mecanismos intracelulares de fusão.

Segundo Vanroose et al. (2000), o BHV-1 pode reduzir em até 60% a ligação do espermatozoide à zona pelúcida. De acordo com Choi et al. (2008), o BHV-1 pode modificar as propriedades elétricas da membrana plasmática através de alterações nos gradientes catiônicos ou por interações com as proteínas da membrana que modulam os canais iônicos. Esta observação pode estar relacionada com o mecanismo de fusão (oócito-espermatozoide), sendo assim, o estresse imposto pelo vírus pode prejudicar a taxa clivagem.

Bielanski e Dubuc (1994) relataram que a infecção de oócitos bovinos com BHV-1 levou à diminuição na taxa de formação de blastocistos. O resultado do presente estudo pode ter divergido dos achados da literatura, por se tratar de outro agente viral (BHV-5), com características intrínsecas diferentes, embora muito similares geneticamente e pertencentes à mesma família *Alphaherpevirus* (Chowdurry, 1995).

Os resultados obtidos confirmam que a zona pelúcida não é uma barreira eficaz para proteger oócitos da infecção viral, dados estes já

observados por Silva-Frade et al. (2010a) e por Makaravechi et al. (2007), os quais verificaram a ineficiência da zona pelúcida em proteger oócitos e embriões expostos ao BHV-5 e BHV-1, respectivamente, os quais transpõem os grandes poros externos da zona pelúcida (180 a 200 nm) (VANROOSE et al., 2000).

Embora o BHV-5 não tenha interferido no número de embriões produzidos *in vitro*, a qualidade destes embriões é questionável, uma vez que embriões de baixa qualidade resultam em maiores taxas de perdas embrionárias (DISKIN e MORRIS, 2008). Para avaliar tal parâmetro, foi empregado o teste de MTT que analisa a atividade mitocondrial. Este método foi relatado pela primeira vez por Mosmann (1983), que o considerou uma técnica simples e barata, e tem sido usado em vários tipos de células (LEVITZ e DIAMOND, 1985; CARMICHAEL et al., 1987; FREIMOSER et al., 1999; AZIZ, 2006; HONG et al., 2011).

A viabilidade mitocondrial foi maior quanto mais elevado o valor médio da absorbância, ou seja, o grupo I (controle) apresentou maior atividade mitocondrial. Por esta razão, possivelmente os embriões pertencentes a este grupo têm maiores chances de obterem sucesso após a transferência para o útero de receptoras sincronizadas.

As mitocôndrias têm papel importante durante o desenvolvimento embrionário, são maternalmente transmitidas com ínfima contribuição paterna, não havendo multiplicação das mesmas até a eclosão embrionária. Portanto, manter o perfeito funcionamento destas organelas é vital para o embrião, já que uma disfunção mitocondrial pode comprometer o processo de desenvolvimento e/ou ocasionar a MCP (JANSEN e DE BOER, 1998; DUMOLLARD, DUCHEN, CARROL, 2007).

A infecção viral geralmente resulta na alteração dos processos celulares que podem desencadear a MCP pela via mitocondrial, ou seja, o sucesso da replicação viral depende da interação entre o vírus e a célula hospedeira. Muitos vírus têm como parte de seu arsenal a habilidade de modular as vias da

apoptose no hospedeiro através da manipulação de uma variedade de proteínas chaves para a apoptose (HAY e KANNOURAKIS, 2002).

A apoptose é a maior causa de morte em alguns tipos de infecções virais (XU et al., 2012) e caracteriza-se como um processo fisiológico ativo da condensação da cromatina, redução do volume celular e formação de vesículas na membrana chamadas corpos apoptóticos, resultando em fragmentos e eliminação de células desnecessárias e danificadas (SCHWARTZMAN e CIDLOWSKI, 1993). A relação entre infecção viral e apoptose é bidirecional. Por um lado, a célula infectada por vírus pode ser eliminada pela apoptose, enquanto que por outro lado, o vírus tem estratégias envolvendo a regulação da apoptose, bloqueando passos específicos na cascata da apoptose na célula hospedeira, maximizando assim a produção viral, ou induzindo a apoptose, o que consequentemente facilitará a disseminação da progênie viral (CLARKE e TYLER, 2009).

Os vírus podem produzir fatores pró e antiapoptóticos. Dentre eles, estão a caspase-2, -3 e Bcl-2, respectivamente. As caspases existem na célula como pró-caspases inativas ou zimogênios (KUMAR, 2007), e o mecanismo usado pelo vírus para suprimir a ativação das caspases é a inibição da permeabilidade da membrana mitocondrial, impedindo ou retardando a liberação do citocromo c (BOYA et al., 2004; THOMSON, 2001).

Foi possível observar uma redução na expressão do Bax e caspase-2 em embriões bovinos infectados com BHV-5. O Bax forma poros na membrana mitocondrial permitindo a liberação do citocromo c e a caspase-2 age como iniciadora no processo de apoptose, ou seja, diminuindo a expressão destes genes, o vírus garante maior vida útil à célula, tendo tempo suficiente para sua replicação. No entanto, há relatos da indução da apoptose em diversos tipos de células causada por diferentes *Alphaherpesvirus*. O *Herpesvirus* tipo 2 (HSV-2) ativa o processo de apoptose em células T (OEVER e HAN, 2010). O BHV-1 promove apoptose em linfócitos B (GEISER, ROSE e JONES, 2008).

Segundo Xu et al. (2012) o BHV-1 induz apoptose em células MDBK e, além disso, eles propõem a liberação do citocromo c pela mitocôndria e o

aumento na expressão do Apaf-1 como sendo pontos críticos na iniciação da apoptose pelo vírus. O citocromo c ajuda o Apaf-1 a recrutar e ativar a caspase-9, a qual ativa a caspase-3 (LI et al., 1997). No presente estudo houve um aumento na expressão do Apaf-1 em embriões bovinos infectados com BHV-5, concordando com os achados de Xu et al. (2012) para o BHV-1, entretanto não houve diferença na expressão da caspase-3 quando comparado ao grupo I (não infectado pelo BHV-5).

É possível inferir que o BHV-5, por diminuir a expressão do Bax, evita consequentemente, a liberação do citocromo c, ou seja, mesmo havendo aumento na expressão do Apaf-1 não há formação do apoptossomo, sendo assim o mecanismo de ativação da cascata das caspases fica bloqueado.

A caspase-3 e o Mcl-1 não sofreram alterações em sua expressão nos grupos I e II, mais uma constatação de que o Apaf-1, embora mais expresso no grupo II (infectado por BHV-5), não estava ativo, devido à ausência do citocromo c, bloqueada pela diminuição na expressão do Bax. Estes achados comprovam a evidência feita por Xu et al. (2012) de que a infecção por BHV-1 induz a apoptose pela via da mitocôndria, assim como a inibe pela mesma via. Há alguns vírus que induzem a apoptose pela via mitocondrial, tais como o vírus da arterite equina (ST-LOUIS e ARCHAMBAULT, 2007) e o vírus da dengue (SU et al., 2001).

Foi possível observar que o BHV-5 controla a expressão do Bax e, consequentemente, a liberação do citocromo c. Estes achados são consistentes com os observados para outros *Herpesvirus* (LI et al., 2010; LI et al., 2011; Xu et al., 2012) que sugerem a modulação dos membros da família Bcl-2 como chaves no processo de apoptose.

## 5. CONCLUSÃO

O BHV-5 inibiu os genes caspase-2 e Bax em embriões bovinos produzidos *in vitro*, alterando o mecanismo intrínseco de apoptose, o qual é mediado pela mitocôndria.

## 6. REFERÊNCIAS

ADAMS, J.M., CORY, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, v. 281, p. 1322-26, 1998.

AZIZ, D.M. Assessment of bovine sperm viability by MTT reduction assay. *Anim Reprod Sci*, v. 92, p. 1-8, 2006.

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

BOYA, P. *et al.* Viral proteins targeting mitochondria: controlling cell death. *Biochim Biophys Acta*, v. 1659, p. 178-189, 2004.

BUDIHardJO, I. *et al.* Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, v. 15, p. 269-90, 1999.

CARDOSO, T.C. *et al.* Bio-safety technology in production of bovine *Herpesvirus* type 5 (BHV-5) using an alternative serum-free medium. *Am J Biochem Biotech*, v. 3, p. 125-30, 2007.

CARDOSO, T.C. *et al.* Evaluation of serum and animal-free media for the production of infectious bronchitis vírus (M41) strain in a continuous cell line. *Altex*, v. 3, p. 152-156, 2005.

CARMICHAEL, J. *et al.* Evaluation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of radiosensitivity. *Cancer Res*, v. 47, p. 943-46, 1987.

CARRIDO, C. *et al.* Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*; v. 13, p. 1423-33, 2006.

CHOI, B. *et al.* Alterations in intracellular potassium concentration by HIV-1 and SIV. *Nef. Virol. J.*, .v. 19, n. 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, p. 558-568, 1995.

CLARKE, P.; TYLER, K.L. Apoptosis in animal models of virus-induced disease. *Nat Rev Microbiol*, v. 7, p. 144-155, 2009.

DEL MEDICO ZAJAC, M.P. *et al.* 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. 18, p. 7-19, 2011.

DENAULT, J.B.; SALVESEN, G.S. Caspases: key in the ignition of cell death. *Chem Rev*, v. 102, p. 4489-500, 2002.

DISKIN, M.G.; MORRIS, D.G. Embryonic and Early Foetal Losses in Cattle and Other Ruminants. *Reprod Dom Anim*, v. 43, p. 260-267, 2008.

DUMMOLLARD, R. *et al.* The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Curr Top Dev Biol*, v. 77, p. 21-49, 2007.

FERRARI, H.F. *et al.* 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. *J. Virol. Methods*, v. 143, p. 335-340, 2007.

FREIMOSER, F.M. *et al.* The MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. *Appl Environ Microbiol*, v. 65, p. 3727-29, 1999.

GEISER, V. *et al.* Bovine herpesvirus type 1 induces cell death by a cell-type-dependent fashion. *Microb Pathog*, v. 44, p. 459-466, 2008.

GOMES, L.I. *et al.* Bovine Herpesvirus 5 (BHV-5) in bull semen: amplification and sequence analysis of the US4 gene. *Vet Res Comm*, v. 27, p. 495-504, 2003.

GREEN, D.R., REED, J.C. Mitochondria and apoptosis. *Science*, v. 281, p. 1309-12, 1998.

GUERIN, B. *et al.* Effets de la contamination par le BHV-1 sur la maturation et fecundation in vitro des ovocytes des bovines. *Rec. Med. Vet. Ec. Alfort*, v. 66, p. 911-917, 1990.

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

HONG, S.G. *et al.* Production of transgenic canine embryos using interspecific somatic cell nuclear transfer. *Zygote*, v. 20, p. 67-72, 2011.

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. 3<sup>rd</sup> ed., Savoy, I.L.: IETS, 1998.

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

KIDD, V.J. *et al.* Proteolytic regulation of apoptosis. *Semin Cell Dev Biol*, v. 11, p. 191-201, 2000.

KIRKLAND, P.D. *et al.* Infertility and venereal disease in cattle inseminated with semen containing bovine Herpesvirus type 5. *Vet Rec*, v. 165, p. 111-113, 2009.

KISCHKEL, F.C. *et al.* Cytotoxicity-dependent APO-I (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *FMBO J*, v. 14, p. 5579-88, 1995.

KUMAR, S. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ*, v. 14, p. 32-43, 2007.

LEVITZ, S.M.; DIAMOND, R.D. A rapid colorimetric assay of fungal viability with the tetrazolium salt MTT. *J Infect Dis*, v. 152, p. 938-45, 1985.

LI, P. *et al.* Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, v. 91, p. 479-489, 1997.

LI, L. *et al.* Human herpesvirus 6A induces apoptosis of HSB-2 cells via a mitochondrion-relates caspase pathway. *J Biomed Res*, v. 24, p. 444-451, 2010.

LI, L. *et al.* Reactive oxygen species and p53 MAPK regulate Bax translocation and calcium redistribution in salubrinal-induced apoptosis of EBV-transformed B cells. *J Biomed Res*, v. 313, p. 235-248, 2011.

MAKAREVICH, A.V. *et al.* Development and viability of bovine preimplantation embryos after the in vitro infection with bovine herpesvirus-1 (BHV-1): immunocytochemical and ultrastructural studies. *Zygote*, v. 15, p. 307-315, 2007.

MAKOSCHEY, B. *et al.* Serum-free produced bovine herpesvirus type-1 and bovine parainfluenza type-3 virus vaccines are efficacious and safe. *Cytotechnology*, v. 39, p. 139-145, 2002.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth*, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUYLKENS, B. *et al.* Bovine herpesvirus 1 infection bovine rhinotracheitis. *Vet. Res*, v. 38, p. 181–209, 2007.

OEVER, M.J.V.; HAN, J.Y. Caspase 9 is essential for herpes simplex virus type 2 induced apoptosis in T cells. *J Virol*, v. 84, p. 3116-3120, 2010.

PETROS, A.M. *et al.* Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochem Biophys Acta*, v. 1644, p.83-94, 2004.

REED, J.C. Double identify for proteins of the Bcl-2 family. *Nature*, v. 387, p. 773-76, 1997.

RISSI, D.R. *et al.* Meningoencefalite por herpesvirus bovinos-5. *Pesq Vet Bras*, v. 27, n. 7, p. 251-260, 2007.

RUPNARAIN, C. *et al.* Colon cancer: genetics and apoptotic events. *Biol Chem*, v. 385, p. 449-64, 2004.

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

SILVA-FRADE, C. *et al.* Effects of bovine Herpesvirus type 5 on development of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology*. v. 73, p. 324-31, 2010a.

SILVA-FRADE, C. *et al.* Apoptotic and developmental effects of bovine Herpesvirus type-5 infection on in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*. v. 74, p. 1296-303, 2010b.

SMITH, K.C. Herpesviral abortion in domestic animals. *Vet. J.* (review), v. 153, p. 253-68, 1997.

St-LOUIS, M.C.; ARCHAMBAULT, D. The equine arteritis virus induces apoptosis via caspase-8 and mitochondria-dependent caspase-9 activation. *Virology*, v. 367, p. 147-155, 2007.

SU, H.L. *et al.* The effect of human Bcl-2 and Bax-X genes on dengue virus-induced apoptosis in cultured cells. *Virology*, v. 282, p. 141-153, 2001.

THOMSON, B.J. Viruses and apoptosis. *Int J Exp Pathol*, v. 82, p. 65-76, 2001.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M. *et al.* Effects of different reproduction techniques: AI, MOET, or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology*, v. 53, p. 575–597, 2000.

VANROOSE, G. *et al.* Use of monoclonal antibodies to prevent the bovine herpesvirus-1 induced inhibition of sperm-zona binding. *Theriogenology*, v. 53, p. 322 (abstract), 2000.

VAUX, D.L. *et al.* An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell*, v. 76, p. 777-779, 1994.

WRATHALL, A.E. *et al.* 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.

WRENZYCKI, C. *et al.* Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology*, v. 68, n. 1, p. 77-83, 2007.

XU, X. *et al.* Bovine herpes virus type 1 induces apoptosis through Fas-dependent and mitochondria-controlled manner in Madin-Darby bovine kidney cells. *Virology*, v. 9, p. 202, 2012.

YANG, J. *et al.* Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, v. 275, p. 1129-1132, 1997.

YIN, X.M. Bid, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death. *Gene*, v. 369, p. 7-19, 2006.

YOULE, R.J., STRASSER, A. The Bcl-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 9, p. 47-59, 2008.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

- O BHV-5 não afetou a taxa de maturação nuclear de oócitos bovinos expostos ao vírus.
- Embriões infectados com BHV-5 apresentaram menor atividade mitocondrial.
- O BHV-5 não afetou a taxa de produção embrionária *in vitro*, após exposição de oócitos bovinos ao vírus.
- A histona 2a foi o melhor gene referência para o estudo de embriões bovinos e BHV-5 utilizando o método de detecção SYBR<sup>®</sup> Green .
- O BHV-5 inibiu passos da apoptose, pela diminuição na expressão dos genes Bax e caspase-2.
- O BHV-5 estimulou a expressão do gene Apaf-1, possivelmente, para facilitar a sua disseminação após a replicação viral.

## ANEXO 1

Primer desenhados no *Primer Express*® Software e produzidos pela Applied Biosystems™ para uso na qPCR

---

US9 BHV-5 (GU947818.1; Gene Bank accession number)

| <i>Primer</i>       | Forward 5`-3`        | Reverse 5` - 3`     |
|---------------------|----------------------|---------------------|
| Sequence            | ACACAGCGTCGTCAACGAAA | TGGTGAGCTCGAGGATGGG |
| Size                | 20                   | 19                  |
| Melting temperature | 57,4 °C              | 56,8 °C             |
| % CG                | 50 %                 | 59,2 %              |
| Product             | 110 bp               |                     |

---

Bovine beta actin (NM\_173979.3, Gene Bank accession number)

| <i>Primer</i>       | Forward 5´ - 3´      | Reverse 5´ - 3´      |
|---------------------|----------------------|----------------------|
| Sequence            | AGGTCATCACCATCGGCAAT | TGAATGCCGCAGGATTCCAT |
| Size                | 20                   | 20                   |
| Melting temperature | 56,7 °C              | 57,3 °C              |
| % CG                | 50 %                 | 50 %                 |
| Product             | 88 bp                |                      |

---

Histona 2a (AW461431, Gene Bank accession number)

| <i>Primer</i>       | Forward 5´ - 3´      | Reverse 5´ - 3       |
|---------------------|----------------------|----------------------|
| Sequence            | GTCTTGGAGTACCTGACCGC | ACAACGAGGGCTTCTTCTGA |
| Size                | 20                   | 20                   |
| Melting temperature | 56 °C                | 56 °C                |
| % CG                | 50 %                 | 50 %                 |
| Product             | 101 bp               |                      |

---

GAPDH (XM\_618013, Gene Bank accession number)

| <i>Primer</i>       | Forward 5´ - 3´      | Reverse 5´ - 3´      |
|---------------------|----------------------|----------------------|
| Sequence            | TTCAACGGCACAGTCAAGGA | ACATACTCAGCACCAGCATC |
| Size                | 20                   | 20                   |
| Melting temperature | 56,7 °C              | 57,3 °C              |
| % CG                | 50 %                 | 50 %                 |
| Product             | 88 bp                |                      |

---

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Susceptibility of neuron-like cells derived from bovine Wharton's jelly to bovine *herpesvirus* type 5 infections

Tereza C Cardoso<sup>1\*</sup>, Juliana B Novais<sup>1</sup>, Talita F Antello<sup>1</sup>, Camila Silva-Frade<sup>1</sup>, Marina C Ferrarezi<sup>1</sup>, Heitor F Ferrari<sup>1</sup>, Roberto Gameiro<sup>2</sup> and Eduardo F Flores<sup>3</sup>

## Abstract

**Background:** Bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5), frequently lethal in cattle, is associated with significant agricultural economic losses due to neurological disease. Cattle and rabbits are frequently used as models to study the biology and pathogenesis of BoHV-5 infection. In particular, neural invasion and proliferation are two of the factors important in BoHV-5 infection. The present study investigated the potential of bovine Wharton's jelly mesenchymal stromal cells (bWJ-MSCs) to differentiate into a neuronal phenotype and support robust BoHV-5 replication.

**Results:** Upon inducing differentiation within a defined neuronal specific medium, most bWJ-MSCs acquired the distinctive neuronal morphological features and stained positively for the neuronal/glial markers MAP2 (neuronal microtubule associated protein 2), N200 (neurofilament 200), NT3 (neutrophin 3), tau and GFAP (glial fibrillary acidic protein). Expression of nestin, N200,  $\beta$ -tubulin III (TuJ1) and GFAP was further demonstrated by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Following BoHV-5 inoculation, there were low rates of cell detachment, good cell viability at 96 h post-infection (p.i.), and small vesicles developed along neuronal branches. Levels of BoHV-5 antigens and DNA were associated with the peak in viral titres at 72 h p.i. BoHV-5 glycoprotein C mRNA expression was significantly correlated with production of progeny virus at 72 h p.i. ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** The results demonstrated the ability of bWJ-MSCs to differentiate into a neuronal phenotype *in vitro* and support productive BoHV-5 replication. These findings constitute a remarkable contribution to the *in vitro* study of neurotropic viruses. This work may pave the way for bWJ-MSCs to be used as an alternative to animal models in the study of BoHV-5 biology.

**Keywords:** BoHV-5, *in vitro* replication, Neuronal culture

## Background

The two most basic properties of stem cells are their capacity for indefinite self-renewal and differentiation into multiple cell or tissue types [1-3]. Embryonic stem cells are totipotent and can be maintained in culture in the presence of leukemia inhibitory factor (LIF) [4]. Withdrawal of LIF induces the formation of cellular aggregates called embryonic bodies. A wide variety of cell types migrate away from embryonic bodies, including some with neuron-like morphology [5]. In addition,

embryonic stem cells may be differentiated into neurons and glial cells with retinoic acid or basic fibroblast growth factor (bFGF) [6,7].

Neurons derived from embryonic stem cells express neurofilaments, neuron-specific class III  $\beta$ -tubulin (TuJ1) and a number of neuron-specific microtubule-associated proteins [8]. Neural stem cells (NSC) are immature, uncommitted cells that exist in both the developing brain and the adult nervous system [8]. These cells can undergo expansion and differentiate into neurons, astrocytes, and oligodendrocytes [8,9]. Stem cells differentiated into neurons from both these sources display a limited proliferation potential. Obtaining them requires invasive procedures and results in ethical limitations in their use [10]. Because

\* Correspondence: tcardoso@fmva.unesp.br

<sup>1</sup>UNESP – University of São Paulo State, Laboratory of Animal Virology and Cell Culture, São Paulo, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

neuroblastoma cells can mimic the morphological and biochemical characteristics of primary neurons, they have proved to be highly valuable models in analyzing the neuropathogenesis and neurotropism of a range of viruses [11]. To overcome ethical issues regarding the use of fetal and adult brain samples, mesenchymal cells (MSCs) isolated from the Wharton's jelly (WJ) of human and animal umbilical cords (UC) represent an attractive alternative. These cells are easily obtained, proliferate rapidly in culture, are immunologically compatible, and represent fetal adnexa that is usually discarded [1,5]. MSCs have been previously isolated from dogs, sheep, horses [2,3,12], and recently bovine WJ-UC [13]. The WJ-UC cell structure is embryonic in origin and encloses the yolk sac, which is the source of the primordial germ cells and the first hematopoietic stem cells [5].

The neurotropic RNA and DNA viruses that produce central nervous system (CNS) diseases employ a range of pathologic mechanisms in a variety of hosts. The useful biological models applied to isolate, propagate, and study biological properties of these viruses include mice, rabbits, monkeys and hamsters. The  $\alpha$ -herpesviruses, including human herpes simplex types 1 and 2 (HSV-1 and HSV-2), varicella-zoster virus (VZV), animal pathogens such as pseudorabies virus (PRV), bovine herpesvirus types 1 and 5 (BoHV-1 and BoHV-5), and Marek's disease virus are neurotropic viruses capable of invading the peripheral and central nervous systems to cause neurological disease [14]. BoHV-5 belongs to the family *Herpesviridae*, subfamily  *$\alpha$ -Herpesvirinae*, and genus *Varicellovirus*. BoHV-5 is genetically and antigenically closely related to BoHV-1, a highly prevalent virus responsible for respiratory and genital disease in cattle around the world [15].

BoHV-1, associated with respiratory and genital disease, and BoHV-5, associated with neurological disease, cause significant agricultural loss. [16]. Experimentally infected cattle and/or rabbits have been used to better understand the neural invasion and spread of BoHV-1 and BoHV-5 [16-19]. Indeed, rabbits have been used as an animal model to study selected aspects of acute and latent infections caused by BoHV-5 [19]. Unlike BoHV-1, BoHV-5 can be difficult to isolate from cell culture and animals presenting neurological symptoms after experimental inoculation [20-23]. These difficulties in viral isolation might be related to low virus titres present in tissue sections [18].

In contrast with *in vivo* studies, *in vitro* studies with Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cells and primary cell cultures of bovine origin represent adequate substrates for viral *in vitro* studies [24,25]. In cell culture, BoHV-1 and BoHV-5 share similar phenotypes and produce similar cytopathic effects (CPE). CPE are characterized by a round cell shape and presence of multinucleated and syncytial

cells [25]. In a previous report, the CPE observed in bovine lung cells infected with BoHV-1 were elongated and spindle-shape cells; in contrast, BoHV-5 infected cells showed syncytial-like CPE [26]. In spite of many reports describing the difficulty of re-isolating the virus from field samples and experimentally infected rabbits, the MDBK cell line has been used as a standard substrate for BoHV-5 isolation and propagation *in vitro* [25]. To date, no effort has been made to develop a better *in vitro* culture system for virus isolation/propagation. Optimizing viral culture would reduce the need for the use of animal models. In this context, the aim of the present study was to generate a novel *in vitro* biological model/substrate that would differentiate bovine WJ-MSC cells into neuron-like cells susceptible to neurotropic BoHV-5 replication. In addition, such a model would provide a means for rapidly examining key aspects of the interactions between BoHV-5 and bovine neuron-like cells. In particular, this model system may overcome many of the limitations of live animals, primary neuronal culture, or neural mesenchymal cells from fetuses with less costly experimentation and ethical constraints.

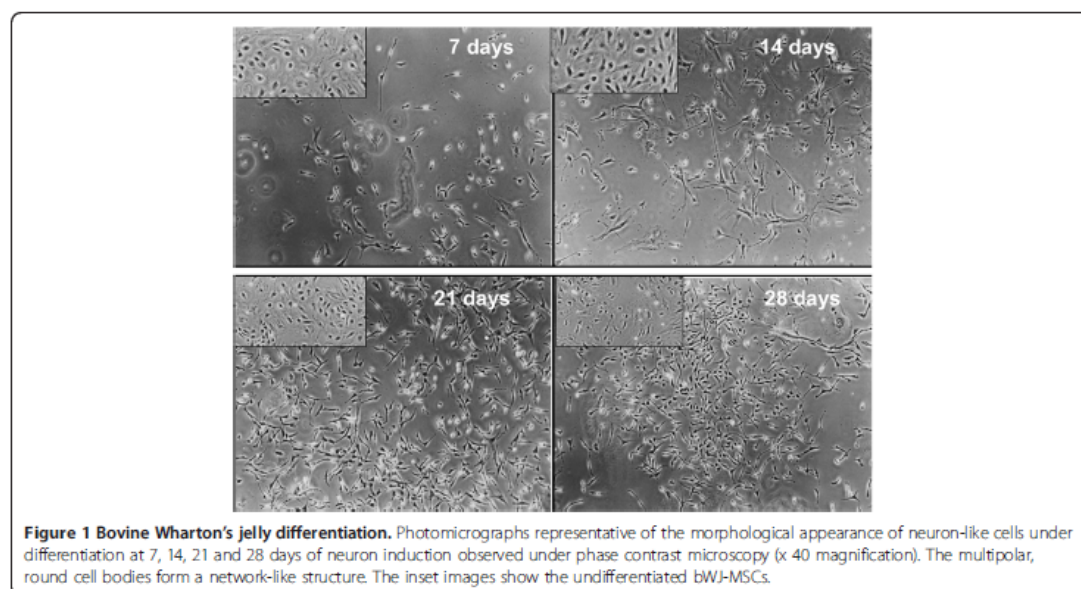
## Results

### Differentiation of stem cells into neuron-like cells

The main objective of the present study was to assess the full neural potential of bWJ-MSCs after culture in a retinoic acid-deprived reprogramming medium. Continuous culture for 28 days resulted in cells exhibiting varied morphologies, including cells with multiple long thin-axon-like processes at 7, 14, 21 and 28 days (Figure 1A-D). Furthermore, we observed the presence of neurons and oligodendrocytes based on morphology of spindle-like cells with multiple, network forming (Figure 2C and 2D), long-branch projections (Figure 2A). In addition, neural-like cells displayed distinct neuronal morphology, ranging from simple bipolar to large, extensively branched, multipolar cells (Figure 3). Thus, after 28 days of neuron induction, bWJ-Uc cells were capable of generating both neuron and glial-like cells.

### Characterization of differentiated neuron-like cells

The distribution of neural/glial cell markers in differentiated cells is shown in Table 1. Immunostaining for neuro-differentiation markers displayed 75-100% expression of N200, MAP2, NT3, Tau, and GFAP. Approximately 50-75% of differentiated cells were positive for nestin, CXCR4, and TuJ1. The ubiquitin marker was less frequently detected among differentiated cells (25-50%). Consistent with these observations, RT-PCR confirmed presence of nestin, N200,  $\beta$ -tubulin III (TuJ1), GFAP and NT3 mRNA (Figure 2E). Flow cytometric analysis was used to determine the phenotype of the neuron-like cells. Cell-surface markers that characterize neuro-differentiation at 28 days of culture were analyzed. The results showed that cells expressed at



least 70% of putative neuronal markers such as NT3, GFAP, MAP2, Tau and N200 (Figure 4). Nestin,  $\beta$ -tubulin III, ubiquitin, and CXCR4 were also expressed, but at lower rates (Figure 4). Our experiments confirmed previous studies demonstrating the ability of human MSCs derived from Wharton's jelly layer to generate neuron-like cells. Our results also demonstrated cross-reactivity among human and bovine monoclonal antibodies against these markers.

#### Susceptibility of neuron-like cells to BoHV-5 infection

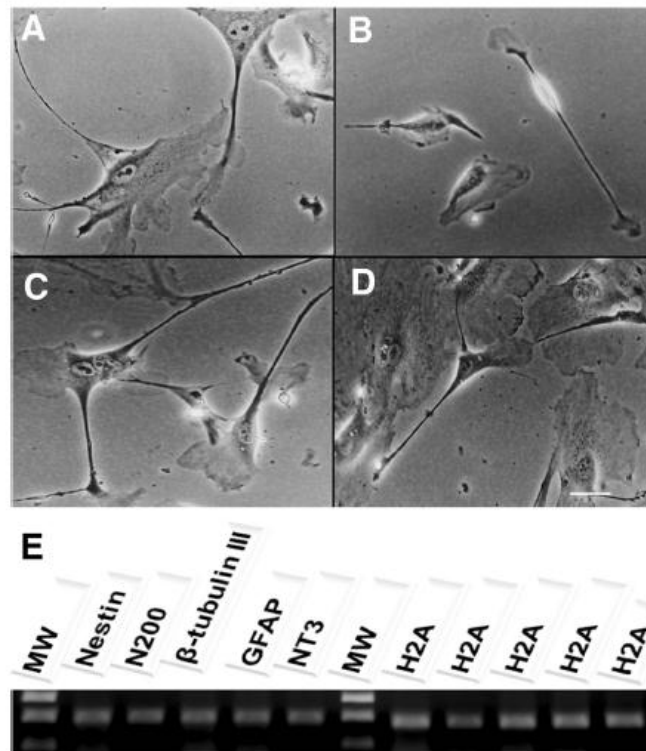
The susceptibility of neuron-like cells to BoHV-5 infection was investigated by assessing the viral growth curve, cell viability, and cytopathology. The one-step kinetic growth curve profile for infected neuron-like cells was established. CPE are an important parameter in the *in vitro* characterization of viral lytic potential. To study the CPE, an indirect measure of viral cell-to-cell spread – morphology, viral antigens, and DNA were monitored. Following infection, CPE was characterized by an enlargement of the neuronal branches (Figure 5A-D) and by appearance of small and large vesicles (Figure 5E-F). BoHV-5 antigens were detected by immunofluorescence at 96 h p.i. (Figure 6A) and active BoHV-5 replication was detected by ISH (Figure 6B). The viral DNA label was observed almost exclusively in the perinuclear region of infected neurons and ranged from sporadic to dense grain accumulations along neuron branches (Figure 6B). Almost 60% of neurons demonstrated active viral DNA replication by 72–96 h p.i. (500 cells per time-point in two parallel experiments) (Figure 6D). In the replication curve, maximum viral titre was observed at 72 h p.i. (Figure 6C) and

loss of cell viability occurred only after 96 h p.i. (Figure 5G). Altogether, these results demonstrate that differentiated bWJ-MSC cells support productive BoHV-5 replication.

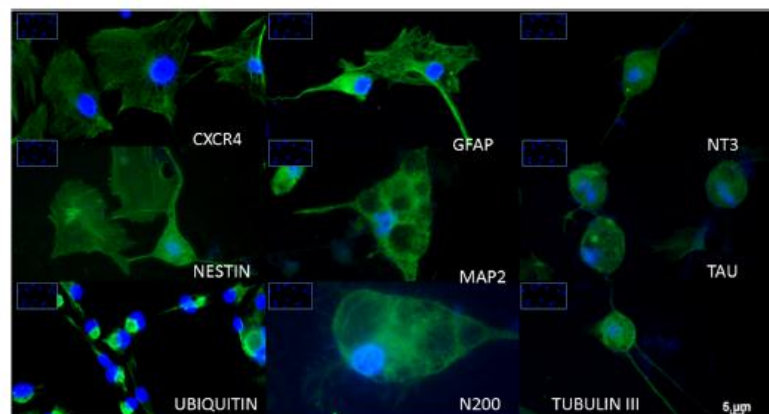
#### Discussion

Several studies have described the ability of Wharton's jelly cells from a variety of animal species to differentiate into neurons and/or glial cells *in vitro* [3]. The most commonly applied protocol to induce undifferentiated MSC cells to differentiate into neuron-like cells is based on treatment with bFGF (basic fibroblast growth factor), dimethylsulfoxide (DMSO) and butylatedhydroxyanisole (BHA) [7]. Some differences have also been described in the use of retinoic acid (RA) and/or insulin associated with hydrocortisone [26]. Retinoic acid is an oxidized derivative of retinol and is the active form of vitamin A. RA functions as a specific ligand for the retinoic acid receptor signaling pathway, which is required in embryonic development, bone formation, and in the maintenance of normal epithelial structures. The addition of RA to induction medium has been shown to influence neuronal differentiation and to improve cell survival [26].

The precise composition of the culture medium is critical to avoid inconsistent results, especially when the reagents are obtained from different sources. With regard to RA, most of the neural induction methods in rodent or human MSCs employ a combination of RA with other chemical agents, cytokines, and growth factors [7-9]. In the present study, a commercially defined medium with no supplement was used to facilitate the reproducibility of the culture system. Another advantage of the culture



**Figure 2 Neuron-like cells characterization.** After 28 days of neurogenic induction, a neuron-like morphology was visible under phase contrast microscopy. **A)** Neuron-like cells with triangular, round and cone-shaped morphology; **B)** Bi-polar neuron-like morphology; **C)** Network among neuron-like cells; **D)** Long axon of a Golgi neuronx 100 magnification; **E)** RT-PCR analysis of neuronal specific markers: nestin, N200,  $\beta$ -tubulin III, GFAP and NT3 transcript expression in neuron-like cells after differentiation were observed. The H2A gene was used as an internal control for the reverse transcription-polymerase chain reaction. MW-molecular weight 1 kb plus.



**Figure 3 Neuron-like cells surface markers.** Immunofluorescence images showing the expression of neuronal markers, such as CXCR4, GFAP, NT3, nestin, MAP2, Tau, ubiquitin, N200, and Tuj1, by immunofluorescence staining. DAPI indicates the nucleus. Inset images show the absence of neuronal markers in the undifferentiated bWJ-MSCs (scale bar: 20  $\mu$ m).

**Table 1 Incidence of various markers that neuron-like cells derived from bWJ-UC express after 28 days of differentiation visually counting under UV microscopy**

| Marker     | Neuron-like cells | bWJ-UC |
|------------|-------------------|--------|
| Nestin     | +++ <sup>a</sup>  | —      |
| MAP2       | ++++              | —      |
| GFAP       | ++++              | —      |
| N200       | ++++              | +      |
| NT3        | ++++              | —      |
| TuJ1       | +++               | —      |
| Tau        | ++++              | —      |
| Ubiquitin  | ++                | ++     |
| CXCR4      | +++               | —      |
| Bovine IgG | —                 | —      |
| Bovine IgM | —                 | —      |

<sup>a</sup>Values were determined by visually counting positive cells (—, 0%; +, 0-25%; ++, 25-50%; +++, 50-75%; +++, 75-100%).

system developed herein is the natural adherence of neuron-like cells to the plastic flasks. This phenotype is different from neuron-like cells derived from fetal brain tissue which require a specific substrate to initiate differentiation [10]. Collectively, the results presented here indicate that it is possible to derive neuron-like cells from bWJ-MSCs. These differentiated cells maintain identical morphology and cell viability after 28 days of *in vitro* culture with a commercial medium. Moreover, there are no ethical issues in using cells *in vitro* from umbilical cords versus fetal brains. Following neuronal differentiation, the neuron-like cells clearly exhibited their neurogenic potential by expressing classic neuronal markers such as N200, MAP2, NT3, Tau and GFAP. Nestin, CXCR4, and TuJ1 were also detected, but at lower intensities. Importantly, none of these neuronal markers were detectable in undifferentiated cells, suggesting the lack of spontaneous neuronal potential. However, a previous study using porcine bWJ-MSCs described similar expression levels of neuron-specific enolase (NSE) in differentiated and undifferentiated cells [9]. This finding has also been reported for bone marrow stromal cells isolated from rats, pigs, and humans [7,8]. Neurofilaments and GFAP, both considered important neuronal/glial proteins, were also found to be expressed in undifferentiated and differentiated MSCs using RA as a neuronal inducer for human bone marrow stromal cells [8]. Furthermore, flow cytometric analysis found that differentiated bWJ-MSCs expressed NT3, GFAP, MAP2, Tau, and N200. This indicates the presence of neural precursors, mature neurons, and glial cells in the same culture. Similar results have been reported with human neural progenitors obtained from umbilical cord blood; however, no GFAP expression could be detected in this experiment

[7,8]. Thus, phenotyping of neuron-like cells revealed that more than 80% of the initial cell population became differentiated and expressed neurological receptors after 28 days of induction. This time period was inferior when compared to neural stem cells produced from fetal brain in humans [10], but similar to one study performed in dogs using Wharton's jelly source [12].

The neurotropic RNA and DNA viruses that produce CNS diseases in humans and animals use a variety of pathological mechanisms. For members of the  $\alpha$ -*Herpesvirinae* subfamily, almost all types and areas of the nervous system have been identified as targets for viral replication [16,18]. Although many studies have been performed *in vivo* using rabbits and cattle, it is difficult to examine BoHV-1 replication *in vivo*. An *in vitro* culture of rabbit sensory neurons and ganglionic non-neuron cells to examine BoHV-1 replication [27].

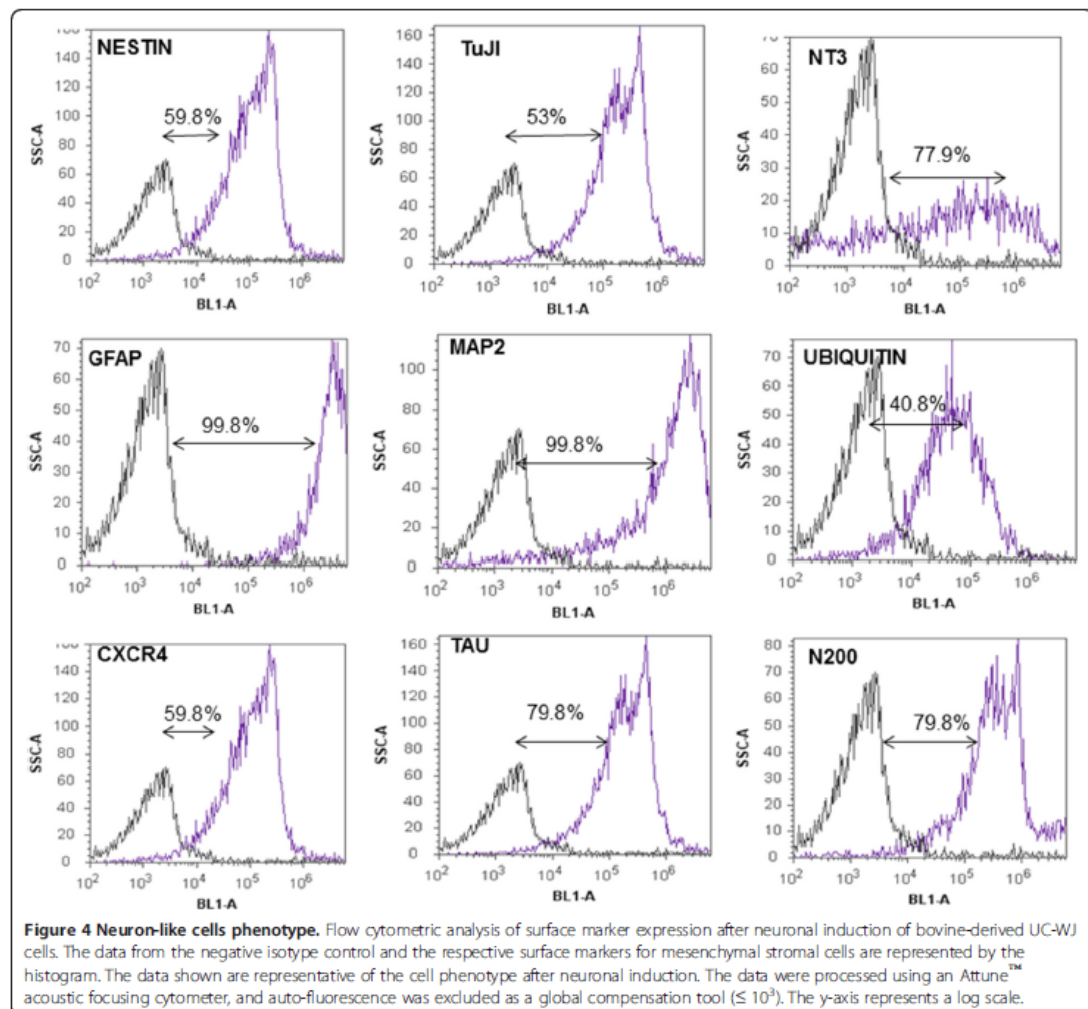
Because of this difficulty, suitable *in vitro* systems implementing the three R's principle of Russel and Burch (1959) are needed to study primary host-virus interactions [27]. Because of the clinical relevance of the  $\alpha$ -subfamily *Herpesvirinae*, *in vitro* models would be highly appreciated to replace animal studies. In addition to ethical considerations, *in vitro* studies would eliminate potential confounding factors such as individual animal variation and environmental factors [28].

Both herpes simplex virus 1 (HSV-1) and BoHV-1/5 establish lifelong latent infections in rabbit and cow sensory nerve ganglia [18,27]. Several days after infection by HSV-1 and BoHV-1/5, some neurons are productively infected (acute phase) [27]. Other neurons, however, become latently infected [18,23]. In the present study, the absence of floating neuron-like cells following BoHV-5 infection suggests a low rate of cell death. This was confirmed by MTT assay results showing high cell viability and 60% ISH positivity. These findings can be explained by the expression of a latency-associated region (LTR) gene that is involved in neuronal survival during HSV-1 infection *in vitro* [17]. In addition, *in vitro* replication does not always correlate with *in vivo* viral behavior. Thus, it is particularly important to note that data obtained from *in vitro* studies are not necessarily representative of viral host interactions occurring *in vivo* [27].

However, the molecular mechanisms by which productive and persistent viruses produce nervous system diseases are diverse and not completely understood. The results obtained in this investigation open the door to questions about neuronal death/survival mechanisms following BoHV-5 infection and replication.

## Conclusion

This report provides the first characterization of neuron-like cells derived from bWJ-MSCs. We have demonstrated that these cells are susceptible to BoHV-5 infection. These



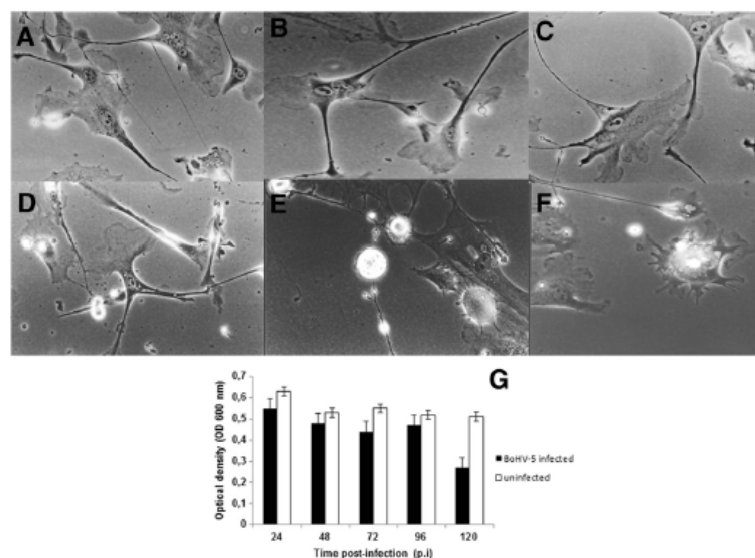
results open the door to replace animal models to study particular aspects of BoHV-5 biology and pathogenesis. Our *in vitro* model reduces the need for animal experimentation. The neuron-like cells developed herein can be used as a viable alternative to investigate several aspects of BoHV-5 biology including neurotropism, neurovirulence, and gene expression.

## Methods

### Bovine Wharton's jelly-derived multipotent mesenchymal stromal cells (bWJ-MSCs)

The bWJ-MSCs were isolated and characterized as previously described [13] according to the Animal Care Committee at the University of São Paulo State, Brazil. The cell monolayers have been maintained in the

laboratory of Animal Virology and Cell Culture since 2010 following standard procedures for seeding, freeze-thawing, and propagation. Passage 30 undifferentiated bWJ-MSCs were kept at  $3.5 \times 10^5$  cells/mL in 25-cm<sup>2</sup> tissue culture flasks (Falcon, BD) at 38.5°C in 5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator. The cells were seeded with Advanced-DMEM (Invitrogen®, Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA) with the addition of 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), 2 mM glutamine and 10 mM non-essential amino acids (Sigma-Aldrich®). The cells were then expanded until they reached subconfluence (80–90%) in serum-free conditions, at which point the supplement was switched to Xeno-Free™ (Invitrogen™) in lieu of FBS (Invitrogen™). The medium was refreshed every 24 h, and



**Figure 5 Bovine Herpesvirus type 5 infection.** Neuron-like cells infected with BoHV-5 demonstrating cytopathic effects **A)** at 24 h post-infection (p.i.) showing initial enlargement of cell branches; and **B and C)** Vesicles forming between networks at 48 h p.i.; **D-F)** Visible vesicles along cell branches, cell bodies and close to networks at 72 to 120 h p.i.; **G)** Viability of neuron-like cells was measured with a MTT-based assay in BoHV-5-infected and -uninfected cells at different times p.i. The data are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (s.d.).

pictures were taken to observe the morphology of undifferentiated bWJ-MSCs.

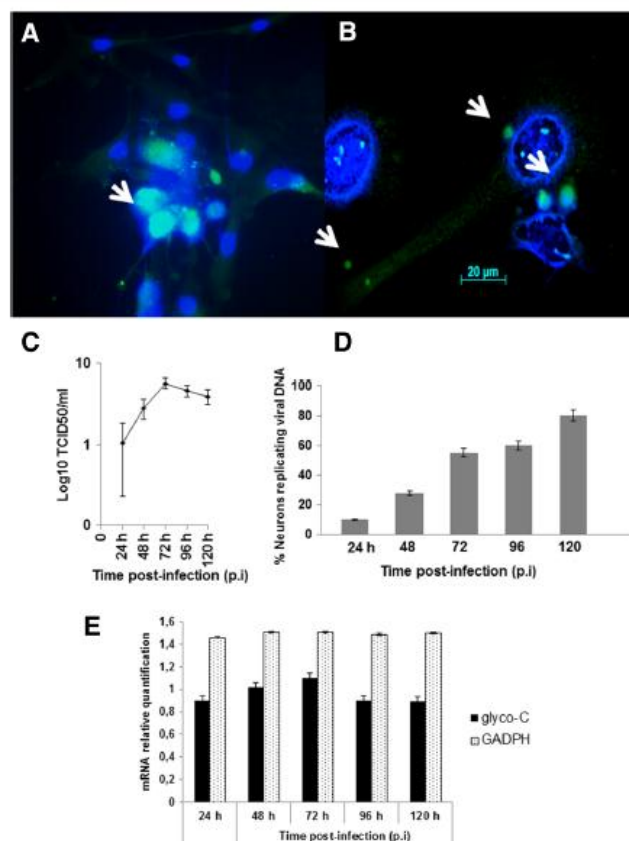
#### Differentiation of bWJ-MSCs

The differentiation protocol was divided into three stages. In stage I, bWJ-MSCs were resuspended at  $2.8 \times 10^4$  cells/mL in Neurobasal<sup>TM</sup> medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) for 24 h. Stage II consisted of replacing the culture medium with Neurobasal<sup>TM</sup> and B27 supplement (Invitrogen<sup>®</sup>). The medium was replaced after 24 h of induction; and stage III was started by replacing the old medium with Neurobasal<sup>TM</sup> with the addition of a neuro-differentiation supplement (Invitrogen<sup>®</sup>). Stage III was sustained for 15 consecutive days. The neuron-like cells were cultured both in 25-cm<sup>2</sup> flasks for the viability assay and on Lab-Tek<sup>®</sup> well chamber slides for immunostaining (Nunc<sup>TM</sup>, Rochester, NY, USA). All of the media were supplemented with penicillin (100 IU/mL) and streptomycin (100  $\mu$ g/mL). All cultures were incubated at 38.5°C in 5% CO<sub>2</sub> with 95% humidity.

#### Immunostaining for neural cell markers

Differentiated cells at 28 days of culture were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min in Lab-Tek<sup>®</sup> chamber slides (Nunc<sup>TM</sup>). The cells were permeabilized for 10 min at room temperature in 0.4% Triton X-100 diluted in phosphate buffered solution (PBS). The fixed neuron-like

cells were incubated overnight at 4°C with each of the primary antibodies anti-Nestin (cat # N5413, diluted at 1:100), anti-NT3 (neurotrophin 3; cat # SAB3300030, 1:50), anti-CXCR4 (chemokine receptor 4; cat # C3116, 1:20), anti-GFAP (cat # WH0002670M1, 1:50), anti-MAP2 (microtubule associated protein 2; cat # M1406, 1:20), anti-Tau (cat # T6402, 1:200), anti-ubiquitin (cat # GW10073E, 1:200), anti- $\beta$  tubulin III (neuronal TuJ1, cat # T8578, 1:100), and anti-N200 (neurofilament200k; cat # N4142, 1:200), all purchased from Sigma-Aldrich<sup>®</sup>. On the next day, after three washes, cells were incubated with the respective goat secondary antibody (1:100) anti-mouse, anti-rabbit and anti-chicken FITC (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>). For nuclear staining, DAPI (1 mg/mL) was diluted in Fluormount<sup>TM</sup> aqueous medium and loaded onto samples for 15 min. The images were collected under an AxioImager<sup>®</sup> A.1 light and an ultraviolet (UV) microscope connected to an AxioCam<sup>®</sup> MRC (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). The images were processed using AxioVision<sup>®</sup> 4.8 software (Carl Zeiss) for each antigen, whereas values were determined by visually counting positive cells (-, 0%; +, 0-25%; ++, 25-50%; +++, 50-75%; +++, 75-100%). The undifferentiated cells underwent the same staining procedure to assess for cross reactions among antibodies. The negative controls consisted of incubation of slides with bovine IgG and IgM isotypes as the primary antibodies.



**Figure 6 Identification of BoHV-5 infection.** Detection of BoHV-5 antigens, viral DNA and *glyco-C* mRNA expression in infected bWJ-MSCs differentiated into neuron-like cells. **A)** Intense fluorescence positive signal for BoHV-5 *glyco-C* protein at 72 h post-infection (arrow head); **B)** Positive grains observed in the neuron-like cell's nucleus, outside the nuclear membrane and along the axon branches (arrows head) using an *in situ* hybridization assay; **C)** Viral growth curve showing a peak of BoHV-5 antigens and cytopathic effect detection at 72 h p.i.; **D)** Percentage of neuron-like cells positively labeled for viral DNA at all p.i. time points; **E)** Real-time PCR was used to quantify the mRNA levels and fold-changes were calculated by  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method as compared with expression of endogenous bovine GAPDH mRNA level to normalization. The infected neuron-like cells revealed *glyco-C* mRNA synthesis at same levels from 24 h to 120 h post-infection ( $p < 0.05$ ).

#### Flow cytometric analysis for neural cell markers

Following differentiation at 28 days of culture,  $1 \times 10^6$  differentiated cells were harvested after being detached with 0.25% trypsin (Sigma-Aldrich®), washed with PBS, permeabilized in 4% of paraformaldehyde, and incubated for 18 h at 4°C with the monoclonal antibodies at the same dilutions described for immunostaining in 1% Triton X-100 and 0.5% bovine serum albumin (BSA). After incubation with the primary antibodies, the cells were washed three times with PBS plus 0.1% Triton X-100. Next, a 1:50 dilution of the secondary antibody was added to 100 µl of the cell suspension and then incubated at 37°C for 30 min. The cell suspension was washed as previously described. After the final wash, the cells were fixed with 4%

paraformaldehyde. Data were acquired with an Attune™ acoustic focusing cytometer system (Applied Biosystems™, Foster City, CA, USA) and at least 50,000 events were counted. The negative pattern was examined by applying the same cell suspension with the initial incubation with bovine IgG and IgM isotypes, and the result was included in the global compensation to exclude auto-fluorescence. A BL1-A (488 nm) filter was used in each analysis.

#### Reverse transcription-polymerase chain reaction

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis was used to evaluate the differentiation of bWJ-MSCs into neuron-like cells. Briefly, total RNA was extracted from the cell culture at 28 days using the

TRizol™ method (Invitrogen®). mRNA expression of the nestin, N200,  $\beta$ -tubulin III (TuJII), GFAP and NT3 genes was reverse transcribed using an enhanced avian RT first strand synthesis kit (STR-1, Sigma-Aldrich). The PCR reaction was conducted following JumpStart™ Taq ready mix according to manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich®) with the specific primers described in Table 2. A house-keeping gene, H2A (bovine histone), was used as an internal control. All of the primers were designed to amplify 207 to 209 bp and were electrophoresed on a 1.5% agarose gel. Samples were visualized by ethidium bromide staining and photographed.

#### Susceptibility of neuron-like cells to viral infection

After differentiation, neuron-like cells were maintained in a Neurobasal™ medium (Invitrogen™) plus B27 without FBS. The BoHV-5 strain used in the experiment was isolated from an outbreak of meningoencephalitis [22]. This strain has 90% sequence similarity to EVI99 based on the US9 region (GenBank accession number AY064172). The strain was kept for 9 consecutive cell passages in our laboratory [29]. For the infection, neuron-like cells were grown to 70% confluence in Lab-Tek® chambers slides (Nunc™) and infected with 100  $\mu$ l of a BoHV-5 suspension ( $10^{3.2}$  TCID<sub>50</sub>/ml), corresponding to a multiplicity of infection (m.o.i.) of 0.1. The viral suspension was allowed to adsorb for 1 h at 38.5°C. After incubation, the viral suspension was removed and the monolayers were supplemented with the same medium. Inoculated cells were monitored thereafter for cytopathic effect (CPE).

#### Viability assay and viral growth kinetics

The cell proliferation analysis was performed using an In Vitro Toxicology Assay® Kit, an MTT-based assay, in both infected and non-infected neuron-like cells at 0, 24, 48, 72, 96 and 120 h post-infection (p.i.) (TOXI-1 Kit; Sigma-Aldrich®). For each p.i. time point, the culture

supernatant was removed and 2 mL of MTT (tetrazolium salts) were added following the manufacturer's recommendations (Sigma-Aldrich®). Absorbance was measured at 600 nm with a Biophotometer (Eppendorf®, Hamburg, Germany). All reported values are means of triplicated samples.

One-step growth curve of the BoHV-5 in neuron-like cells was assayed in a multiplication kinetics experiment, followed by infection at 80% of monolayer confluence with m.o.i of 1. After 90 min of adsorption at 38.5°C, the inoculum was removed and fresh medium was added. The neuron-like cells were incubated at different time intervals (24, 48, 72, 96 and 120 h p.i.). After incubation, both supernatant and lysate cells were harvested and assayed for the presence of the virus by infecting (Madin-Darby bovine kidney cells) MDBK cells as described previously [30]. All experiments were performed in triplicate. Infectious virus titres were calculated according to the Spearman-Kärber method and expressed as Log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/mL.

#### Viral nucleic acid detection by in situ hybridization assay

To estimate the number of neurons actively replicating viral DNA, neuron-like cells grown on Lab-Tek® (Nunc™) chamber slides were infected with at least 1 TCID<sub>50</sub> per cell, incubated for 24, 48, 72, 96 and 120 h p.i. and fixed with 95% ethanol-glacial acetic acid (3:1) for 30 min in an ice bath. *In situ* hybridization assay (ISH) was performed as described previously [21,31,32]. To perform *in situ* hybridization, the DNA probe was prepared from PCR amplicons of BoHV-5 DNA glycoprotein-C gene according to previous study [28,29,32]. The 159 base pair (bp) amplicons were produced by primary forward PCR primer gl + (5'-GTG CTC TTC TCC ATC GCC-3') and reverse primer gl- (5'-GCG GAG GAGGAG TTG TCG G-3-bio') (Invitrogen™, Brazil). After DNA purification from agarose gel, the PCR product was linked into the TA-vector

**Table 2 Cell surface neurogenic markers analysed by RT-PCR**

| Genes                | Accession number | Primers sequence                                                            | Size (bp) |
|----------------------|------------------|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Nestin               | AB257750         | forward 5'-AGACTTCCTCAGCTTTTCAGG-3'<br>reverse 5'-GCCTGGAGGAATTCCTTGTT-3'   | 209       |
| N200                 | NM174121         | forward 5'-TAGCACATTTCAGGAAGCA-3'<br>reverse 5'-CGGCCAATTCCTCTGTAATG-3'     | 208       |
| $\beta$ -tubulin III | NM001077127      | forward 5'-AGATTCCGCTATTAGCTA-3'<br>reverse 5'-CGGTACCGGTTAATAGTAGT-3'      | 207       |
| GFAP                 | L19867           | forward 5'-TGCAACCTGACAGACGCTGTG-3'<br>reverse 5'-CTGCTAGAGGGCGAGGAGAACG-3' | 209       |
| NT3                  | NM001077988      | forward 5'-ATGCCGTAGCGGTTAATGCA-3'<br>reverse 5'-ATGCCGTAGCGGTTAATGCA-3'    | 208       |
| H2A                  | AW461431         | forward 3'-GTCTTGGAGTACCTGACCGC-5'<br>reverse 3'-AGTCTTCTTCGGGAGCAACA-5'    | 209       |

(pGEMTEasy, Promega, Madison, WI, USA) and ligation products were introduced into *E. coli* by heat shock. Positive colonies were confirmed by DNA sequencing. A confirmed positive colony was cultured and plasmid DNA was prepared using a commercially available kit (Promega Mini-Prep<sup>®</sup>, Promega, Madison, WI, USA). The probe was generated by PCR reaction [31] targeting the gC gene located in the plasmid as described before using the biotin labeled reverse primer (Invitrogen<sup>™</sup>).

Briefly, for ISH assay the infected and uninfected neuron-like cells were placed on glass slides (EasyPath<sup>®</sup>), pre-treated with pure poly-L-lysine (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) and fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) in phosphate-buffered saline (PBS) for 24 h at 4°C. Slides were treated with proteinase K (10 µg/mL, Invitrogen<sup>™</sup>) for 10 min at room temperature and washed in PBS. A 159-bp denatured biotin labeled probe consisting of 2 µL (2 ng/mL) of probe and 98 µL of pre-hybridization buffer (50% formamide, 5% bovine serum albumin, 1% N-lauroylsarcosine and 0.02% sodium dodecyl sulphate, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) was applied the slides. The slides were incubated overnight at 37°C under a plastic coverslip in a humidified chamber. The slides were then washed and excess probe was removed by washing in increasingly stringent solutions consisting of 1x SSC (saline sodium citrate) and 0.1x SSC for 10 min at 42°C. The detection system consisted of incubation with monoclonal antibody against biotin labeled to FITC (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>).

The ISH positive reaction was visualized after the slides were covered using Fluormount<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) medium and observed under a UV microscope. The images were collected under an Axio Imager A.1 light microscope connected to an AxioCamMRc (Carl Zeiss Oberkochen, Germany), and the micrographs were processed with AxioVision 4.7 software (Carl Zeiss). The results were expressed as the mean percentage of neurons positively marked.

#### Total RNA isolation and quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR)

Upon harvesting at 24, 48, 72, 96 and 120 h p.i., the cells, monolayers and respective supernatants, and total RNA was extracted using the Trizol LS<sup>™</sup> protocol according to manufacturer's instructions (Invitrogen<sup>®</sup>). An average of 150 ng of total RNA was used for first-strand cDNA synthesis with Enhanced Avian RT First Strand Synthesis (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>). The qPCR was carried out and analyzed by the software on a StepOnePlus<sup>®</sup> real time instrument (Applied Biosystems<sup>™</sup>). The real time PCR mixtures (50 µL) contained 1.2 µg of cDNA, 400 nM primers and 200 nM probes. The probes were FAM-label customized for glyco-C gene sequences according to a previous report [33]. The PCR was initiated by sequential amplification of 40 cycles at 95°C (15 s) and 60°C (60 s). The results were

obtained from three replicates of each sample to ensure representative and accuracy pipetting. The expression of bovine GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) gene was also quantified in a similar way for normalization. The comparative delta-delta C<sub>t</sub> method was used to analyze the results. The expression level of the BoHV-5 glyco-C gene at the corresponding time point in infected and uninfected neuron-like cells was quantified in comparison to GAPDH C<sub>t</sub> values.

#### Statistical analysis

All of the experiments were performed in triplicate or greater. Results of representative experiments are presented. Descriptive statistics include the mean ± standard deviation (s.d.). Statistical analysis was performed using ANOVA to evaluate the results. Student's *t*-test was used for comparison of uninfected (control) and BoHV-5 infected cells. Two-tailed *p* values < 0.05 were considered significant.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interest.

#### Authors' contributions

TCC, JBN and TFA designed and directed studies, and were involved in the interpretation of the data. MCF, CSF and HFF participated in immunofluorescence assay. RG and HFF performed cytometry analysis. EFF helped in the manuscript design and discussion of results. All authors read and approved the final manuscript.

#### Acknowledgements

This work was supported by FAPESP (Grants 2009/17635-3 and 2010/50782-7). The authors are grateful for the donation of the bovine umbilical cords. TC Cardoso and EF Flores are recipients of funding from the CNPq (Brazilian Council for Research).

#### Author details

<sup>1</sup>UNESP – University of São Paulo State, Laboratory of Animal Virology and Cell Culture, São Paulo, Brazil. <sup>2</sup>UNESP – University of São Paulo State, Embryology Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, São Paulo, Araçatuba 16050-680, Brazil. <sup>3</sup>UNESP – University of São Paulo State, Federal University of Santa Maria, Virology Section, Santa Maria, RS 97115-900, Brazil.

Received: 2 August 2012 Accepted: 3 December 2012

Published: 10 December 2012

#### References

- Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, Morales L, Helwig B, Beerenstrauch M, Abou-Easa K, Hildreth T, Troyer D: **Matrix cells from Wharton's jelly from neurons and glia.** *Stem Cells* 2003, 21:50-60.
- Corradetti B, Lange-Consiglio A, Cremonesi F, Bizzaro D: **Isolation, in vitro culture and characterization of foetal umbilical cord stem cells at birth.** *Vet Res Comm* 2008, 32:139-142.
- Cremonesi F, Corradetti B, Lange-Consiglio A: **Fetal adnexa derived stem cells from domestic animal: progress and perspectives.** *Theriogenology* 2011, 75:1400-1415.
- Guan K, Rohudel J, Wobus AM: **Embryonic stem cell differentiation models: cardiogenesis, myogenesis, epithelial and vascular smooth muscle differentiation in vitro.** *Cytotechnology* 1999, 30:211-226.
- Troyer DL, Weiss ML: **Concise review: Wharton's Jelly-derived cells are primitive stromal cell population.** *Stem Cells* 2008, 26:591-599.
- Bi Y, Gong M, Zhang X, Zhang X, Jiang W, Zhang Y, Chen J, Liu Y, He T-C, Li T: **Pre-activation of retinoic signaling facilitates neuronal differentiation of mesenchymal stem cells.** *Dev Growth Differ* 2010, 52:419-431.

7. Salgado AJ, Fraga JS, Mesquita AR, Neves NM, Reis RL, Sousa N: Role of human umbilical cord mesenchymal progenitors conditioned media in neuronal/glia cell densities, viability, and proliferation. *Stem Cells Dev* 2010, 19:1067-1074.
8. Chua SI, Bielecki R, Wong CJ, Yamanaka N, Rogers IM, Casper RF: Neural progenitors, neurons and oligodendrocytes from human umbilical cord blood cells in a serum-free, feeder-free cell culture. *Biochem Biophys Res Comm* 2009, 379:217-223.
9. Choong P-F, Mok P-L, Cheong S-K, Leong C-F, Then K-Y: Generating neuron-like cells from BM-derived mesenchymal stromal cells in vitro. *Cytotherapy* 2007, 9:170-183.
10. Pugazhenthil S, Nair S, Velmurugan K, Liang Q, Mahalingam R, Cohrs RJ, Nagel MA, Gilden D: Varicella-zoster virus infection of differentiated human neural stem cells. *J Virol* 2011, 85:6678-6686.
11. Christensen J, Steinhilber M, Slobedman B, Abendroth A: Differentiated neuroblastoma cells provide a highly efficient model for studies of productive varicella-zoster virus infection of neuronal cells. *J Virol* 2011, 85:8436-8442.
12. Uranio MF, Valentini L, Lange-Consiglio A, Calra M, Guaricci AC, Lobbato A, Catacchio CR, Ventura M, Cremonesi F, Dell'Aquila ME: Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adnexa: a comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matrix. *Mol Reprod Dev* 2011, 78:361-373.
13. Cardoso TC, Ferrari HF, Garcia AF, Novais JB, Silva-Frade C, Ferrarezi MC, Andrade AL, Gameiro R: Isolation and characterization of wharton's jelly-derived multipotent mesenchymal stromal cells obtained from bovine umbilical cord and maintained in a defined serum-free three-dimensional system. *BMC Biotechnol* 2012, 12:8.
14. Pellet PE, Roizman B: The family Herpesviridae: a brief introduction. In *Fields Virology*. Edited by Knipe DM, Howley PM. Philadelphia: Lippincott Williams & Williams; 2007:734-736.
15. Delhon GA, Moraes MP, Lu Z, Afonso CL, Flores EF, Weiblen R, Kutish GF, Rock DL: Genome of Bovine Herpesvirus 5. *J Virol* 2003, 77:10339-10347.
16. Chowdhury SI, Onderci M, Bhattacharjee PS, Al-Mubarak A, Weiss ML, Zhou Y: Bovine herpesvirus 5 (BHV-5) US9 is essential for BHV-5 neuropathogenesis. *J Virol* 2002, 76:3839-3851.
17. Delhon GA, Gozález MJ, Murda PR: Susceptibility of sensory neurons to apoptosis following infection by bovine herpesvirus type 1. *J Gen Virol* 2002, 83:2257-2267.
18. Flores FS, Flores V, Caron L, Flores EF, Weiblen R, Winkelmann ER, Mayer SV, Bastos RG: Distribution of Bovine Herpesvirus type 5 DNA in the central nervous systems of latently experimentally infected calves. *J Clin Microbiol* 2003, 41:4512-4520.
19. Valera AR, Pidone CL, Massone AR, Quiroga MA, Riganti JG, Corva SG, Galosi CM: A simple method of infecting rabbits with bovine herpesvirus 1 and 5. *J Virol Meth* 2008, 150:77-79.
20. Cardoso TC, Ferrari HF, Garcia AF, Bregano LC, Andrade AL, Nogueira AHC: Immunohistochemical approach to the pathogenesis of clinical cases of Bovine Herpesvirus type 5 infections. *Diag Pathol* 2010, 5:57.
21. Cardoso TC, Gomes DE, Ferrari HF, Silva-Frade C, Rosa ACG, Andrade AL, Luvizotto MCR: A novel in situ polymerase chain reaction hybridization assay for the direct detection of bovine herpesvirus type 5 in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Virol Meth* 2010, 163:509-512.
22. Ferrari HF, Luvizotto MCR, Rahal P, Cardoso TC: 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* 2007, 146:335-340.
23. Meyer 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. *Arch Virol* 2001, 146:633-652.
24. Ladelfa MF, Del MédicoZajac MP, Kotsias F, Delgado F, Muyikens B, Thiry J, Thiry E, Romero SA: Comparative study on the in vitro and in vivo properties of two bovine herpesvirus-5 reference strains. *Acta Vet Scand* 2011, 53:37.
25. Marín MS, Leunda MR, Verna AE, Faverin C, Pérez SE, Odeón AC: In vitro replication of bovine herpesvirus types 1 and 5. *J Virol Meth* 2012, 181:80-85.
26. Seal BS, Whetstone CA: Immediate early gene expression and gene mapping comparison among isolates of bovine herpesvirus 1 and 5. *Vet Microbiol* 1994, 38:369-384.
27. Perez SE, Bretschneider G, Leunda MR, Osorio FA, Flores EF, Odeón AC: Primary infection, latency, and reactivation of Bovine Herpesvirus type 5 in bovine nervous system. *Vet Pathol* 2002, 39:437-444.
28. Stelkers L, Vandekerckhove AP, Van den Broeck AP, Glorieux S, Nalrynck HJ: Characteristics of BoHV-1 subtypes in bovine respiratory and genital mucosa explants: a phylogenetic enlightenment. *Vet Res* 2001, 42:33.
29. Vogel FSF, Caron L, Flores EF: Distribution of bovine herpesvirus type 5 in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. *J Clin Virol* 2003, 77:10339-10347.
30. Silva-Frade C, Martins Júnior A, Borsanelli AC, Cardoso TC: Effects of bovine Herpesvirus type 5 on development of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology* 2010, 73:324-331.
31. Silva-Frade C, Gameiro R, Martins Júnior A, Cardoso TC: Apoptotic and developmental effects of bovine Herpesvirus type-5 infection on in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology* 2010, 74:1296-1303.
32. Silva MS, Brum MCS, Loreto ELS, Weiblen R, Flores EF: Molecular and antigenic characterization of Brazilian bovine herpesvirus type 1 isolates recovered from the brain of cattle with neurological disease. *Virus Res* 2007, 129:191-199.
33. Diallo IS, Corney BG, Rodwell BJ: Detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 using multiplex real-time polymerase chain reaction. *J Virol Meth* 2011, 175:46-52.

doi:10.1186/1746-6148-8-242

Cite this article as: Cardoso et al: Susceptibility of neuron-like cells derived from bovine Wharton's jelly to bovine herpesvirus type 5 infections. *BMC Veterinary Research* 2012 8:242.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit



RESEARCH

Open Access

# Evaluation of developmental changes in bovine in vitro produced embryos following exposure to bovine *Herpesvirus* type 5

Mariana PC Brenner<sup>1</sup>, Camila Silva-Frade<sup>1</sup>, Marina C Ferrarezi<sup>1</sup>, Andrea F Garcia<sup>1</sup>, Eduardo F Flores<sup>2</sup> and Tereza C Cardoso<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** Bovine *Herpesvirus* type-5 (BoHV-5) is a neurovirulent  $\alpha$ -*Herpesvirus* which is potentially pathogenic for cows and suspected to be associated with reproductive disorders. Interestingly, natural transmission of BoHV-5 by contaminated semen was recently described in Australia. Additionally, BoHV-5 was also isolated from the semen of a healthy bull in the same country and incriminated in a natural outbreak of reproductive disease after artificial insemination. In contrast with BoHV-1, experimental exposure of in vitro produced bovine embryos to BoHV-5 does not affect embryo viability and seems to inhibit some pathways of apoptosis. However, the mechanisms responsible for these phenomena are poorly understood. In this study, we examined mitochondrial activity, antioxidant protection, stress response and developmental rates of in vitro produced bovine embryos that were exposed and unexposed to BoHV-5.

**Methods:** For this purpose, bovine embryos produced in vitro were assayed for cell markers after experimental infection of oocytes ( $n = 30$ ; five repetitions), in vitro fertilization and development. The indirect immunofluorescence was employed to measure the expression of superoxide dismutase 1 (SOD1), anti-oxidant like protein 1 (AOP-1), heat shock protein 70.1 (Hsp 70.1) and also viral antigens in embryos derived from BoHV-5 exposed and unexposed oocytes. The determination of gene transcripts of mitochondrial activity (SOD1), antioxidant protection (AOP-1) and stress response (Hsp70.1) were evaluated using the reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). MitoTracker Green FM, JC-1 and Hoechst 33342-staining were used to evaluate mitochondrial distribution, segregation patterns and embryos morphology. The intensity of labeling was graded semi-quantitatively and embryos considered intensively marked were used for statistical analysis.

**Results:** The quality of the produced embryos was not affected by exposure to BoHV-5. Of the 357 collected oocytes, 313 ( $\pm 6.5$ ; 87.7%) were cleaved and 195 ( $\pm 3.2$ ; 54.6%) blastocysts were produced without virus exposure. After exposure, 388 oocytes were cleaved into 328 ( $\pm 8.9$ , 84.5%), and these embryos produced 193 ( $\pm 3.2$ , 49.7%) blastocysts. Viral DNA corresponding to the US9 gene was only detected in embryos at day 7 after in vitro culture, and confirmed by indirect immunofluorescence assay (IFA). These results revealed significant differences ( $p < 0.05$ ) between exposed and unexposed oocytes fertilized, as MitoTracker Green FM staining Fluorescence intensity of Jc-1 staining was significantly higher ( $p < 0.005$ ) among exposed embryos (143  $\pm 8.2$ ). There was no significant difference between the ratios of Hoechst 33342-stained nuclei and total cells in good-quality blastocysts (in both the exposed and unexposed groups). Using IFA and reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) for the set of target transcripts (SOD1, AOP-1 and Hsp 70.1), there were differences in the mRNA and respective proteins between the control and exposed embryos. Only the exposed embryos produced anti-oxidant protein-like 1 (AOP-1). However, neither the control nor the exposed embryos

\* Correspondence: [tcardsoso@fmva.unesp.br](mailto:tcardsoso@fmva.unesp.br)

<sup>1</sup>UNESP, Laboratory of Animal Virology, University of São Paulo State, College of Veterinary Medicine, Araçatuba, SP 16050-680, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

produced the heat shock protein *Hsp 70.1*. Interestingly, both the control and the exposed embryos produced superoxide dismutase (*SOD1*), revealing intense mitochondrial activity.

**Conclusion:** This is the first demonstration of *SOD1* and *AOP-1* production in bovine embryos exposed to BoHV-5. Intense mitochondrial activity was also observed during infection, and this occurred without interfering with the quality or number of produced embryos. These findings further our understanding on the ability of  $\alpha$ -Herpesviruses to prevent apoptosis by modulating mitochondrial pathways.

**Keywords:** BoHV-5, Infection, Bovine embryos, Apoptosis

## Background

Many calves are produced by in vitro embryo production (IVP) and transferred worldwide [1]. However, the production of blastocysts from mature in vitro oocytes has only a modest success rate [2]. Despite many efforts to improve IVP techniques, the successful development of only 30% to 40% of blastocysts appears to be the limit [1]. A number of factors can influence the culture environment, such as media composition, protein supplementation, the number of embryos present in the culture drop and gas atmosphere. Among those factors, oxidative stress induced by greater oxygen tension has received special attention in the last few years [3-6]. Generally, higher oxygen ( $O_2$ ) tension (5%  $CO_2$  in air) than that of the *in vivo* environment employed for in vitro culture (IVC) is responsible for the increased generation of reactive oxygen species in cells, which can lead to DNA damage, lipid peroxidation and oxidative modification of proteins [4]. The role of mitochondria in the all-aerobic cell system has been widely studied, and these organelles play a well-known role as the energy-ATP resource for most of the reactions occurring in cells, including metabolic pathways, fatty acid metabolism, urea metabolism and the metabolism of specific hormones [7].

Concerning to oocytes and embryos, mitochondria are important organelle not only for competence but also for adequate reproduction [8]. During early development, the role of maternal mitochondria dominates over paternal mitochondria because sperm mitochondria are ubiquitinated and eliminated when the sperm enters the ooplasm [9]. Although distinct patterns of mitochondrial distribution and activity have been described at different stages of bovine embryonic development, it is still an important parameter for assessing the potential competence of the oocytes and embryos [9].

Latent infection is a hallmark of the *Herpesviridae* family [10]. It is noteworthy that BoHV-5 can be reactivated from a persistent state and excreted without clinical signs, consistent with the low incidence of apoptotic embryos derived from oocytes exposed to virus infection in previous studies [11,12]. Moreover, cattle are considered the natural host of BoHV-5, and latently infected animals constitute natural reservoirs of the virus [13-15].

Thus, biological products derived from latently infected sources may be potentially contaminated with the virus and, therefore, represent a potential source of contamination for IVC procedures [12]. Despite numerous reports of BoHV-5 in bull semen, the significance of BoHV-5 in semen is unknown [16-20]. Recently, an association between venereal disease in cows and artificial insemination with semen contaminated with BoHV-5 has been described in Australia [18,21].

Viral infection typically results in the perturbation of cellular processes that can serve to trigger cell death via the mitochondrial pathway [18]. Successful replication of many viruses, therefore, depends on the ability of the virus to prevent apoptosis induced by the mitochondrial pathway [7]. The maintenance of mitochondrial respiration during viral infection is essential for ensuring that sufficient ATP is available for viral replication to proceed, while concomitantly inhibiting apoptosis induced by oxidative stress [22]. Interestingly, experimental infection of bovine gametes with BoHV-5 led to the infection of in vitro-produced embryos without interference to embryonic development, and infection with BoHV-5 suppressed specific apoptotic pathways [11,23]. Determining how BoHV-5 interferes with cell-death pathways will not only improve our understanding of viral pathogenesis but also has the potential to advance our understanding of the processes that normally control of cellular death pathways. For example, oxidative stress is essential for apoptotic induction to proceed in response to many stimuli [23]; however, the mechanisms by which BoHV-5 inhibits bovine embryo apoptosis or induces mitochondrial dysfunction are unknown.

The objective of this study was to investigate the role of mitochondrial activity, antioxidant protection, and the stress response in bovine embryos exposed to BoHV-5 and healthy IVC embryo controls. For this purpose, bovine oocytes were experimentally exposed to BoHV-5. The presence of viral antigens, superoxide dismutase 1 (*SOD1*), anti-oxidant like protein 1 (*AOP-1*) and heat shock protein 70.1 (*Hsp70.1*) in both exposed and unexposed embryos were confirmed by indirect immunofluorescence and by assessing transcription of related genes. BoHV-5 viable particles were recovered from infected embryos by virus re-isolation in MDBK cells

and by polymerase chain reaction (PCR) targeting the US9 gene.

## Methods

### Reagents and media

Unless otherwise stated, all chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and Invitrogen (Grand Island, NY, USA) at the highest available purity. The basic dilutions and culture media were cell culture grade, which are routinely used in our laboratory.

### Oocyte collection, in vitro fertilization and maturation

Oocyte collection, in vitro maturation (IVM), sperm and in vitro fertilization procedures were followed as previously described [11,12]. The study was conducted with presumptive zygotes produced from oocytes exposed or unexposed ( $n = 30$ /per slide; in five repetitions) to BoHV-5 (the latter underwent the same protocol but without exposure to BoHV-5). Frozen-thawed sperm for IVF were derived from 0.5 mL straws of bovine (*Bos indicus*) semen collected from a single bull. Semen was centrifuged on a Percoll (Nutricell<sup>®</sup>, Campinas, SP, Brazil) gradient at 700  $\times$  g for 20 min. The resulting sperm pellet was washed in TALP medium (Tyrode medium with added bicarbonate buffer and supplemented with 6 mg BSA per milliliter) and centrifuged at 200  $\times$  g for 5 min. The pellet was diluted in IVF medium (TALP medium supplemented with 3 mg/mL heparin and PHE solution: 2 mM penicillamine, 1 mM hypotaurine, and 250 mM epinephrine) to a final concentration of  $1 \times 10^5$  sperm/mL in drops of 100  $\mu$ L. After 24 h of maturation, the oocytes were transferred to drops containing IVF medium. For IVF, oocytes and sperm were co-incubated in the IVF medium for 20 h under the same conditions used for IVM. Afterward, presumptive zygotes (PZ) were placed in in vitro culture medium (IVC) up to day 7 (day 0 = day of fertilization). After blastocyst production on day 7 post-fertilization, only embryos graded as Code 1 (Excellent or Good) or Code 2 (Fair) following the IETS guidelines [1] were used. Similarly, only oocytes and presumptive zygotes classified as good quality were used. All uninfected cells and reagents used in this study were assayed for bovine *herpesvirus* types 1 and 5 (BoHV-1 and 5), bovine viral diarrhea (BVD), and others pathogens, e.g., *Mycoplasma* by the use of molecular search [11].

### Virus infection and embryo development

Stocks of BoHV-5, isolated in 2007 from outbreaks in Araçatuba, SP, Brazil [24], were propagated in Madin-Darby bovine kidney (MDBK, ATCC CCL-2) cells, which were cultured in minimum essential medium (MEM) [25,26]. The tissue culture infective dose per 50  $\mu$ L

(TCID<sub>50</sub>) of stock virus was determined by virus titration infection of confluent monolayers of MDBK cells [25,26] at a multiplicity of infection (MOI) of 1. Aliquots of stock virus (100  $\mu$ L) with  $10^{3.3}$  TCID<sub>50</sub>/50  $\mu$ L were frozen at  $-86^\circ\text{C}$  prior to use. Only COCs with several layers of compact cumulus cells and homogeneous cytoplasm were used, divided into drops of 30 oocytes each for experimental use. The culture consisted of oocytes maintained in 100  $\mu$ L TCM-199 (GIBCO-BRL, Grand Island, NY, USA), supplemented with 10% FBS, 2.2 mg/mL sodium bicarbonate, 0.02 mg/mL sodium pyruvate, 0.05 mg/mL gentamicin sulfate, 0.5  $\mu$ g/mL FSH (Pluset, Calier, Barcelona, Spain), and 50  $\mu$ g/mL LH (Lutropin-V, Bioniche Inc., Belleville, ON, Canada) for 24 h at  $39^\circ\text{C}$  in 5% CO<sub>2</sub>-air. Selected oocytes ( $n = 30$ ) were washed in maturation medium consisted of TCM-199 (GIBCO-BRL, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% FBS (Nutricell<sup>®</sup>), 2.2 mg/mL sodium bicarbonate, 0.02 mg/mL sodium pyruvate, 0.05 mg/mL gentamicin sulfate, 0.5  $\mu$ g/mL FSH (Pluset<sup>®</sup>, Calier, Barcelona, Spain) and 50  $\mu$ g/mL LH (Lutropin-V<sup>®</sup>, Bioniche Inc., Belleville, ON, Canada). Oocytes were transferred to drops containing 100  $\mu$ L of MM in five repetitions in a total number of 150 oocytes. Oocytes were experimentally exposed by co-incubation with 10  $\mu$ L BoHV-5 ( $10^{2.3}$  TCID<sub>50</sub> corresponding to 1 MOI) for 1 h at  $39^\circ\text{C}$  in 5% CO<sub>2</sub>-air. The oocytes were subsequently washed three times and transferred to new, virus-free maturation drops for further in vitro development, as previously described [11,12].

### BoHV-5 molecular detection

The viral DNA detection was applied to detect the *US9* gene among exposed and unexposed derived-embryos, follicular liquid, oocytes and sperm, as described previously [27]. A 250-bp amplicon was generated based on the sequence of US9 region (GenBank accession number AY064172). Procedures for DNA purification and PCR were previously described [10]. The PCR was performed using 12.5  $\mu$ L of 2 $\times$  Platinum Taq Polymerase High-Fidelity Master Mix (Invitrogen<sup>™</sup>, Carlsbad, CA, USA), and 10 pmoles of each primer (US9-For: 5'-AGAGTCCACACAGCGTCGTCAA-3' and US9-Rev 5'-CTACAGCGAGAGCGACAGCGAGA-3'). The reverse primer (US9-Rev) was purchased by Invitrogen. In addition, 2.5  $\mu$ L of nuclease-free water and 8  $\mu$ L of the DNA sample (positive reference strain AY064172) consisting of 3  $\mu$ L of DMSO plus 5  $\mu$ L of DNA were added to the master mix. In an automated thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany), the reactions were incubated at  $98^\circ\text{C}$  for 5 min; 34 cycles of  $94^\circ\text{C}$  for 30 s,  $60^\circ\text{C}$  for 1 min, and  $72^\circ\text{C}$  for 2 min, and finally  $72^\circ\text{C}$  for 5 min. The PCR products were visualized on a 1.5% (w/v) agarose gel after staining with SYBR green at 0.5  $\mu$ g/mL of concentration.

### Virus isolation

Embryos derived from oocytes directly exposed to BoHV-5 and observed during in vitro production were collected and freeze-thawed (1 h under  $-86^{\circ}\text{C}$  and 1 h under room temperature) three times. Monolayer cultures of MDBK cells at 80% confluence were prepared, according to standard procedures, to be free of BoHV-1 and any other potential pathogens [12]. Adsorption was allowed for 90 min at  $38.5^{\circ}\text{C}$ . Then, fresh medium was added, and for the next 7 days, cultures were examined for cytopathic effect (CPE). After an additional passage, the cultures with no evidence of CPE were considered negative. When CPE was observed, the respective cells were removed and submitted to virus titration and identification. Virus titration was conducted with infected embryo suspensions and 96-well plates previously seeded with MDBK cells. Serial dilutions, from  $10^{-2}$  to  $10^{-8}$ , of infected embryo suspensions were prepared and used for BoHV-5 titration onto a single well in triplicate. The plate was incubated for 1 h at  $38.5^{\circ}\text{C}$  prior to adding 100  $\mu\text{L}$  of supplemented MEM. The plates were incubated for 7 d and examined every 24 h for evidence of CPE. Infectious virus was calculated according to the Spearman-Kärber method, as described [26].

### MitoTracker green FM, jc-1 and Hoechst 33342 staining

To evaluate the number of embryos/slide, intensively labeled with MitoTracker Green FM, Jc-1 and Hoechst 33342 probes, 30 selected embryos, in five repetitions, from oocytes exposed or unexposed to BoHV-5 were washed in PBS and then fixed with 4% (w/v) formaldehyde. This procedure was similar for all dyes used to assay exposed and unexposed embryos. MitoTracker Green FM (Invitrogen, Eugene, OR, USA) was used to evaluate mitochondrial distribution and segregation patterns. The MitoTracker Green FM was diluted in DMSO at 10 nM per slide direct applied on fixed embryos (30 per slide, in a total of 150 analyzed) and incubated for 10 min at  $38.5^{\circ}\text{C}$ . The mitochondrial distribution in the cytoplasm of embryos appeared as increased areas of fluorescence intensity or aggregates detected by fluorescence. Mitochondrial activity was qualified based on Jc-1 (5,5', 6,6'-tetrachloro-1,1', 3,3'-tetraethyl-benzimidazolyl-carbocyanine iodide) staining. Jc-1 monomers were detected with a green filter. Jc-1 dimers that formed on mitochondrial membranes with high potential were detected via a red filter. Mitochondria distribution in the embryonic cytoplasm was evaluated by the intensity of the green/red fluorescence. To observe the embryo quality, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  per slide of Hoechst 33342 at  $38.5^{\circ}\text{C}$  for 30 min was used. The fixed embryos were washed again to remove excessive Hoechst 33342 and then mounted onto slides under coverslips to evaluate the nuclear

configuration. To measure the fluorescence intensity (MitoTracker Green FM emission 500 nm, Jc-1 red filter 515 nm and green filter 488 nm, and Hoechst 33342, emission 488 nm, stained slides were observed under an AxioImager A.1 light and ultraviolet microscope connected to an AxioCam MRc camera (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), and micrographs were processed with AxioVision 4.8 software (Carl Zeiss).

### Indirect immunofluorescence to assay *SOD1*, *AOP-1*, *Hsp70.1* and BoHV-5 antigens

Exposed and unexposed embryos ( $n=30/\text{slide}$ ; in five repetitions) were washed three times in PBS and fixed in 4% formaldehyde for 24 h at  $4^{\circ}\text{C}$ . The samples were then rinsed with PBS and permeabilized with proteinase K (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Invitrogen) for 15 min at room temperature. After pre-treatment with proteinase K (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) at  $4^{\circ}\text{C}$ , the slides were incubated overnight with primary antibodies against mitochondrial superoxide dismutase, antioxidant protein 1 and stress response heat shock protein 7 (mouse anti-*SOD1*; anti-*AOP-1* and anti-*Hsp70.1*, respectively) diluted 1:50 in antibody diluent (PBS plus 0.1% of Tween 20). The viral antigens were detected by reacting exposed and unexposed embryos to monoclonal anti-BoHV-5 diluted in PBS plus 0.1% Tween 80 at 1:5 [26]. The slides were then incubated for 24 h at  $4^{\circ}\text{C}$  with secondary antibody (FITC-goat anti-mouse IgG; Zymed, South San Francisco, CA, USA). Omission of the primary antibody was used as a negative control. Subsequently, all samples were counterstained with 1 mg/mL of DAPI (4'-6-diamino-2-phenylindole; Sigma-Aldrich®) for 15 min at room temperature before mounting the slides in the dark [11].

### Determination of gene transcripts of mitochondrial activity (*SOD1*), antioxidant protection (*AOP-1*) and stress response (*Hsp70.1*)

The abundance of transcripts for genes related to mitochondrial activity antioxidant protection, manganese-superoxide dismutase (*SOD1*) sense 5'-CCCATGAAGCCTTTCTAATCCTG-3' and antisense 5'-TTCAGAGGCGCTACTATTTTCCTTC-3' primers (accession no. L22092.1) and antioxidant protein like 1 (*AOP-1*) sense 5'-CCTAGGTTATTTAGCGCGT-3' and antisense 5'-TTTCGCTAGCGCTTATT-3' primers were evaluated using the reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), and these primers generated amplicons of 297 and 310 bp, respectively. The stress response gene transcription was performed by amplification of heat shock protein 70.1 (*HSP 70.1* accession no. U09861) sense 5'-AAGGTGCTGGAGTAGGCT-3' and antisense 5'-ACTTGGAAGTAAACAGAAGC-3' primers producing an amplicon of 312 bp. Total RNA was isolated from 7 pools of 10 exposed and unexposed embryos using the

PureLink<sup>®</sup> viral RNA/DNA extraction kit, according to the manufacturer's protocol (Invitrogen). The total RNA was eluted in 20  $\mu$ L of ultra-pure water and treated with 0.5 IU DNase. The reverse transcriptase reaction (RT) was immediately performed using 0.5  $\mu$ g oligo (dT) primers (Invitrogen). The reaction mix consisted of 200  $\mu$ M of each dNTP, 1  $\times$  RT buffer, 2  $\mu$ L DTT 0.1 M, 40 IU RNase inhibitor and 200 IU SuperScript II (Invitrogen). The RT reaction was performed at 42°C for 52 min, with a final incubation at 70°C for 15 min. Polymerase chain reaction was conducted, as previously described in the Materials and Methods section. The PCR products were visualized on a 1.5% (w/v) agarose gel after staining with SYBR green (Invitrogen) at 0.5  $\mu$ g/mL of concentration.

#### Semi quantitation and data analysis

The levels of *SOD1*, *AOP-1*, *Hsp70.1* and viral antigens were semi-quantitated according to the intensity of the immunofluorescence reactions. Two standard filters were employed: a DAPI filter (emission wavelength: 425 nm) was used to determine quality and a fluorescein isothiocyanate (FITC) filter (emission wavelength, 512 nm) was used to detect *SOD1*, *AOP-1*, *Hsp70.1* and BoHV-5 antigens. Bovine embryos were examined on two separate occasions by two observers without prior knowledge of the classification. The intensity of labeling was graded and only embryos considered marked labeled were included in a semi-quantitative analysis. Differences in the respective mean values ( $n=30$  in five repetitions) were tested using ANOVA, with the primary effects as morphological quality groups, followed by a multiple pair-wise comparison using Student's *t*-test for independent samples and the Bonferroni *t*-test. Differences of  $P<0.05$  were considered significant. The images were collected under an AxioImager A.1 light and ultra-violet microscope connected to an AxioCam MRc (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), and the micrographs were processed using the Axiovision 4.7 software (Carl Zeiss). The results are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. *p* values  $<0.05$  were considered significant.

## Results

#### Embryo development and virus detection

From 357 unexposed oocytes and 388 oocytes exposed to BoHV-5 infection, 131  $\pm$  6.5 and 328  $\pm$  8.9 were cleaved, respectively (Table 1). There was no significant difference relative to the total number of unexposed oocytes when compared with those exposed to BoHV-5. There was no significant effect of virus infection on embryonic development, including proportions of oocytes that developed into blastocysts: unexposed 195  $\pm$  3.2 (54.6%) and exposed 193  $\pm$  3.2 (49.7%). The quality of the infected and uninfected embryos was considered to be similar, and both groups were rated as Code 1

(excellent or good). To confirm virus infection, BoHV-5 antigens were identified by indirect immunofluorescence assay (IFA) and PCR amplification in all infected embryos (Figure 1B and C, line 3). No evidence of BoHV-5 infection was observed among the unexposed oocytes (Figure 1C, line 1), sperm (Figure 1C, line 2) and presumptive embryos (Figure 1C, line 4). BoHV-5 was recovered from exposed embryos after infection of MDBK monolayers (data not shown).

#### Expression of MitoTracker green FM, jc-1 and Hoechst 33342 labels

The results revealed differences ( $p<0.05$ ) between exposed (123  $\pm$  8.5) and unexposed (53  $\pm$  3.9) for MitoTracker Green FM staining (Figure 2; Table 2). Cytoplasmatic fluorescence intensity was higher in exposed embryos (inner mass) than in unexposed ones (Figure 2). In addition, in the results observed for Jc-1 labeling exposed embryos had an intense red label, which was different (143  $\pm$  8.2;  $p<0.05$ ) from that of unexposed embryos (Table 2; Figure 2). Moreover, among the exposed and unexposed embryos, three patterns of mitochondrial distribution were observed: (1) Jc-1 staining was diffuse with mitochondria distributed throughout the cytoplasm, (2) pericytoplasmic and (3) perinuclear. The exposed embryos showed a pericytoplasmatic pattern in contrast to unexposed embryos that revealed a perinuclear and diffuse pattern (Figure 2). There was no significant difference between the ratios of Hoechst 33342-stained nuclei and total cells in good-quality among exposed and unexposed groups (Table 3; Figure 2).

#### Antigens and genes related to mitochondrial activity, antioxidant protection and the stress response

The relative expression of each cell marker and gene transcript studied, *SOD1*, *AOP-1* and *Hsp70* is depicted in Figures 3 and 4. Embryos exposed to BoHV-5 had an increased expression of *SOD1* (Figures 3A-C) compared with the unexposed group (Figures 3D and E). *SOD1* gene transcription was only detected in exposed embryos (Figure 3F; line 3). The *AOP1* antigens were detected in high amounts in the pericytoplasm and perinuclear regions of the exposed embryos (Figures 4 A-C). However, *AOP-1* transcription was observed in both groups of exposed and unexposed embryos (Figure 4F, lines 3 and 4). No detectable signal or positive amplicon for *Hsp70* protein was obtained in this study.

## Discussion

The successful replication of a virus within a cell requires a remarkable cascade of interactions between virus and host. As part of their arsenal, many viruses

**Table 1 Comparison of development rates of exposed and unexposed bovine embryos submitted to BoHV-5 unexposed or exposure**

| Groups    | Total number of oocytes | Embryonic development (mean $\pm$ sd) |                                   |
|-----------|-------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
|           |                         | Cleaved, n (%)                        | Blastocysts, n (%)                |
| Unexposed | 357                     | 313 $\pm$ 6.5 <sup>a</sup> (87,7)     | 195 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup> (54,6) |
| Exposed   | 388                     | 328 $\pm$ 8.9 <sup>b</sup> (84,5)     | 193 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup> (49,7) |

<sup>a,b</sup> Within a column, values without a common superscript differ ( $p < 0.05$ ).

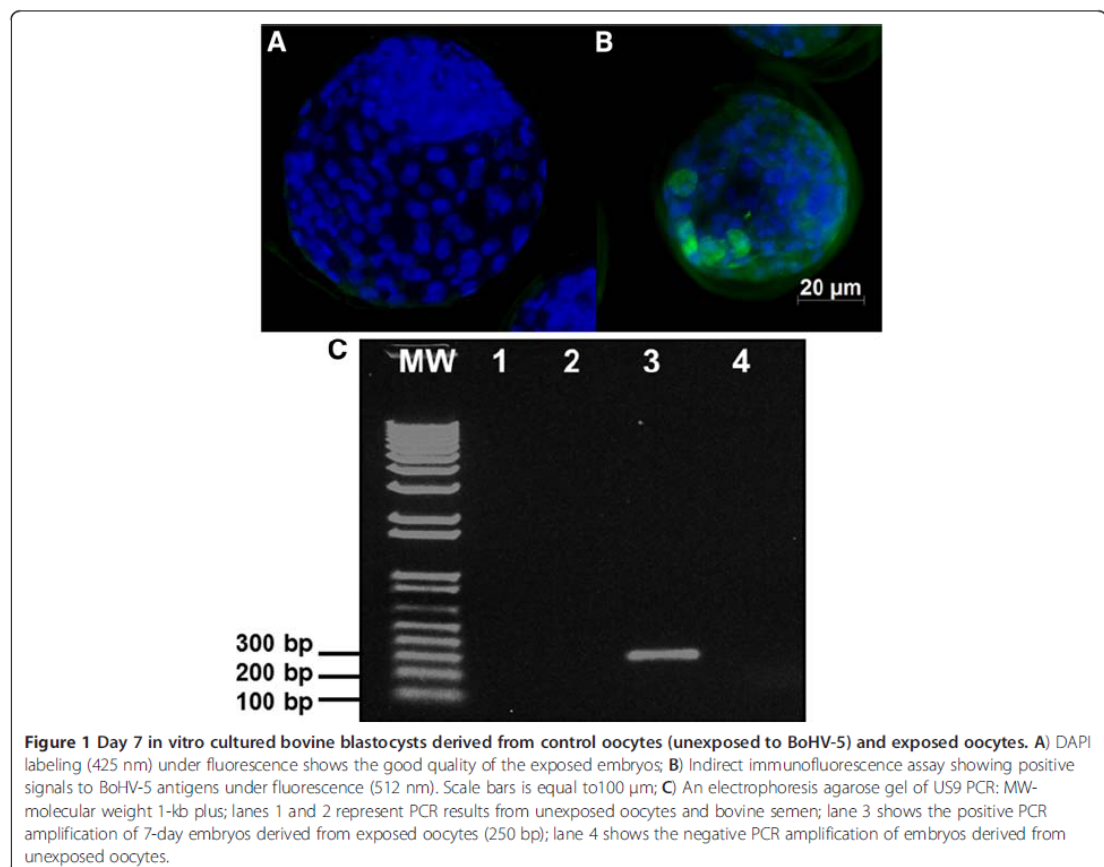
maintain the ability to modulate cell metabolism to produce viral particles [7,10,23,28].

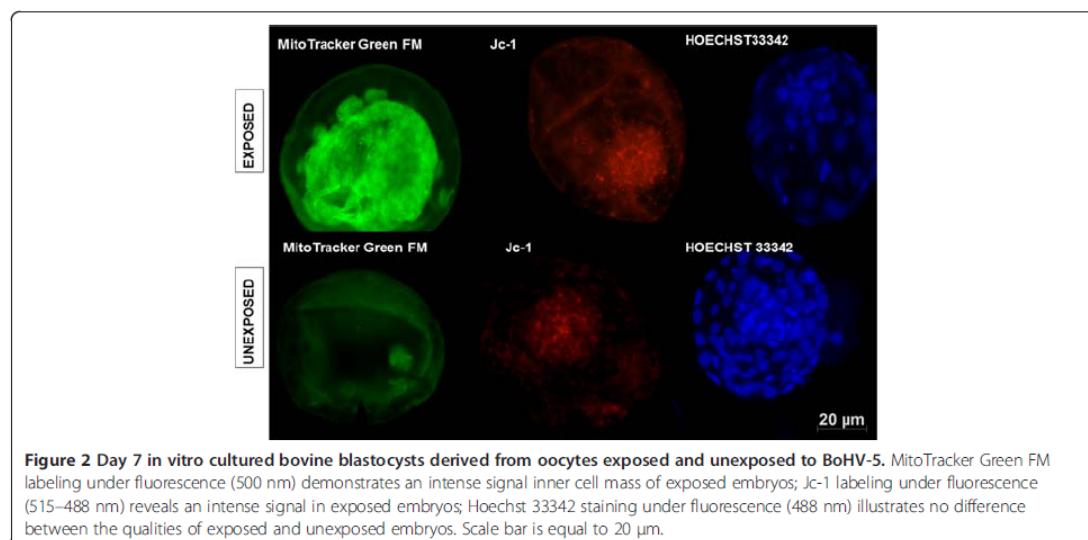
Experimental infection of bovine embryos with BoHV-5 in this study appeared not to interfere with the in vitro production of embryos. These results are consistent with our previous results that also showed that BoHV-5 exposure had no impact on the development in vitro of bovine embryos [11,12]. These observations contrast with the findings that BoHV-1 directly affects the fertilization process, supported by the observation of a strong decrease in the embryonic development rate

when bovine IVF was performed in the presence of BoHV-1 [1]. Therefore, the potential of BoHV-5 to induce bovine reproductive disorders should not be underestimated, and a review of the sanitary measures required for international marketing of biological products should be considered [21].

In this respect, the regulation of the expression of genes related to the stress response, such as heat shock proteins (*Hsp*), could also be affected by different embryonic densities and inadequate culture conditions [4]. This condition was excluded in the present investigation because the exposed and unexposed embryos did not express mRNA and antigens related to *Hsp 70.1*. As the embryos produced for this analysis were not under stress caused by the IVC system, other parameters could be directly compared based on BoHV-5 exposure.

The abundance of *SOD1* antigens and the respective transcripts were not similar in both groups of embryos. Some studies revealed that higher levels of *SOD1* transcription may be an indicator of lower mitochondrial activity [5]. Furthermore, differences in oxygen concentration may





also contribute to altered mitochondrial activity [6]. The IVC system applied in this study did not appear to affect the embryonic development. However, physiologically, the abundance of *SOD1* mRNA tended to decrease from the zygote to the initial blastocyst stage [8,9]. However, the correct sequence of this event is not fully understood. In addition, *SOD1* gene expression has been associated with good-quality, in vitro-produced embryos [9]. Moreover, an increase in *SOD1* expression has been related to a reduction in both the number of apoptotic cells and atresic follicles in mouse ovaries, showing that this gene is related to cell quality [3].

Recently, it has been described that bovine oocytes exposed to BoHV-5 after embryonic development show a reduction in the number of apoptotic cells [3]. Another parameter to be considered is the higher fluorescence intensity of MitoTracker Green FM probe, as well as Jc-1 labeling, among the exposed embryos. These two dyes are considered to be important for the qualitative and quantitative measure of mitochondrial activity [7]. In fact, mitochondria itself do not multiply until embryo hatching. These organelles are responsible for energy production

until genome activation begins. According to a previous study, the blastocyst hatch is characterized by a mitochondrial distribution pattern changing from perinuclear to pericytoplasmic localization, while in the cells of the inner mass, the distribution remains unchanged [9]. This pattern was observed in embryos exposed to BoHV-5, where the inner mass was intensively labeled by MitoTracker Green FM probe compared with unexposed embryos, and the label was more evident in the pericytoplasmic area. Moreover, the exposed embryos were also intensively labeled by the Jc-1 probe, demonstrating pericytoplasmic localization, which was in contrast with the unexposed embryos that were markedly labeled in the inner mass compartment. These patterns are considered physiological since trophoblastic cells start expressing adhesion proteins and other molecules important for maternal recognition of the embryos [9]. One possible explanation for the intense mitochondrial activity among exposed embryos is that virus replication demands more energy than usual. However, this activity does not seem to interfere with embryonic development. Taken together, these observations suggest that exposure of bovine embryos to BoHV-5 increases mitochondrial activity without any adverse physiological effect on the developing embryo, an important characteristic among the viruses from the *Herpesviridae* [10,28].

Reactive oxygen metabolites (ROS) appear to play a role in the cause and progression of several reproductive events both in humans and animals, such as fertilization and early development [5,7]. Recently, oxidative stress has been proposed as responsible for and as a possible cause of embryonic mortality in dairy cows [29]. The oxidative stress condition is thought to result from an

**Table 2 Comparison of fluorescence intensity among the unexposed and exposed bovine embryos to BoHV-5 suspension after MitoTracker Green FM and Jc-1 staining**

| Groups    | Total number of embryos | Number of embryos intensively labeled $\pm$ sd |                            |
|-----------|-------------------------|------------------------------------------------|----------------------------|
|           |                         | MitoTracker Green FM                           | Jc-1                       |
| Unexposed | 150                     | 53 $\pm$ 3.9 <sup>a</sup>                      | 40 $\pm$ 4.5 <sup>a</sup>  |
| Exposed   | 150                     | 123 $\pm$ 8.5 <sup>b</sup>                     | 143 $\pm$ 8.2 <sup>b</sup> |

<sup>a,b</sup> Within a column, values without a common superscript differ ( $p < 0.05$ ).

**Table 3 Comparison of the number of nuclei in unexposed and exposed of bovine embryos after Hoechst 33342 staining**

| Groups    | Number of embryos | Number of embryos mean $\pm$ sd |
|-----------|-------------------|---------------------------------|
| Unexposed | 150               | 107 $\pm$ 10.2 <sup>a</sup>     |
| Exposed   | 150               | 85 $\pm$ 4.5 <sup>a</sup>       |

<sup>a,b</sup> Within a column, values without a common superscript differ ( $p < 0.05$ ).

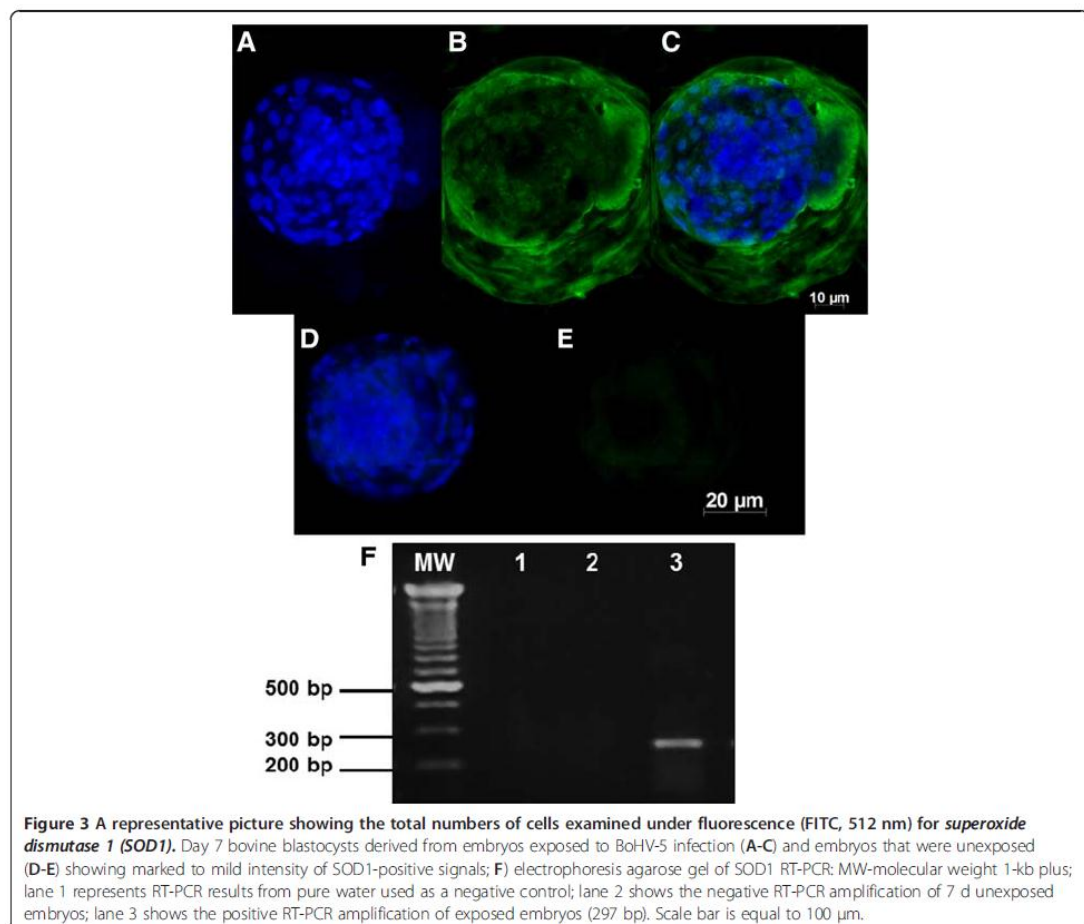
imbalance between the production of ROS and the neutralizing capacity of antioxidant mechanisms [7]. However, the significant induction of ROS or the depletion of cellular antioxidants induces cell death, and ROS are likely to act as signaling intermediates that are involved in the signal transduction mechanism of apoptosis [3,22,23]. The (*AOP-1*) functions as a thioredoxin-dependent peroxidase that scavenges ROS, such as  $H_2O_2$  [30,31]. Remarkably, we were only able to detect the

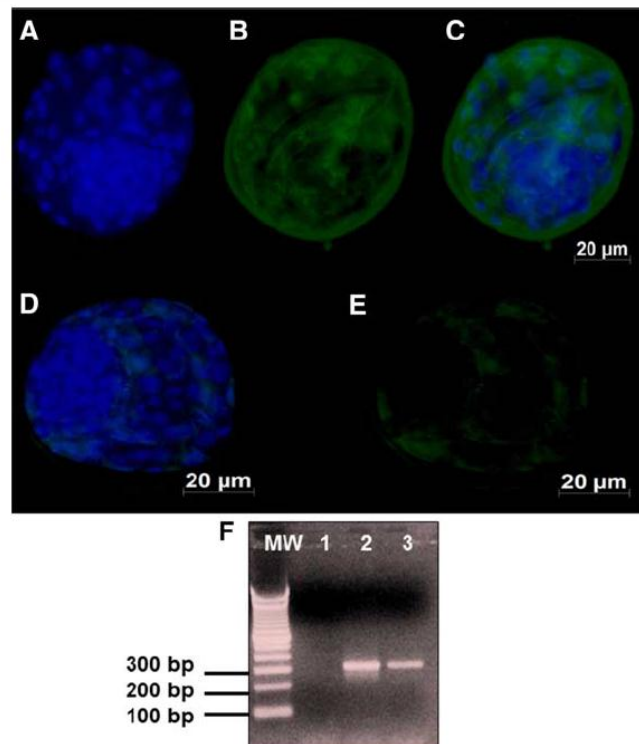
antigens and mRNA of *AOP-1* among embryos exposed to BoHV-5. The role of *AOP-1* in viral infections has previously been demonstrated; however, this is the first report of the association between *AOP-1* and in vitro-produced bovine embryos [30-32].

In summary, this study confirmed that BoHV-5 is capable to infect bovine oocytes. Furthermore, we conclude that experimental infection of oocytes with BoHV-5 does not interfere with cell viability, which facilitates viral replication by modulating mitochondrial function and producing antioxidative factors. However, multiple mechanisms are involved in cell survival during viral infection, and the majority of these mechanisms remain unclear.

### Conclusions

This is the first demonstration of *SOD1* and *AOP-1* production in bovine embryos exposed to BoHV-5. Intense mitochondrial activity was also observed during infection,





**Figure 4** A representative picture showing total numbers of cells examined under fluorescence (FITC, 512 nm) for AOP-1: A-C) Day 7 bovine blastocysts derived from oocytes exposed to BoHV-5 infection showing marked signals to AOP-1; D-E) Day 7 blastocysts derived from oocytes unexposed to BoHV-5 infection showing mild signals to AOP-1. Electrophoresis agarose gel of AOP-1 RT-PCR: MW-molecular weight 1-kb plus; lane 1 represents RT-PCR results from pure water used as a negative control; lane 2 shows the AOP-1 negative RT-PCR amplification of unexposed embryos (310 bp); lane 3 shows the positive RT-PCR amplification of exposed embryos (310 bp). Scale bar is equal to 100  $\mu$ m.

and this occurred without interfering with the quality or number of produced embryos. These findings further our understanding on the ability of  $\alpha$ -Herpesviruses to prevent apoptosis by modulating mitochondrial pathways.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Authors' contributions

MCPB and C SF prepared the in vitro-produced embryos and performed the exposure to BoHV-5. MCF performed the IFA and RT-PCR. AFG discussed the mitochondrial functions and statistical analyses. TCC and EFF were responsible for the funding and performed the final version of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Grants number 2010/52465-9 and 2010/03204-8). The authors are grateful to JBS for the ovary donation. TC Cardoso and EF Flores are recipients of CNPq (Brazilian Council for Research) funding.

#### Author details

<sup>1</sup>UNESP, Laboratory of Animal Virology, University of São Paulo State, College of Veterinary Medicine, Araçatuba, SP 16050-680, Brazil. <sup>2</sup>Department of

Preventive Veterinary Medicine, Federal University of Santa Maria, UFSM, College of Veterinary Medicine, Santa Maria, RS 97115-900, Brazil.

Received: 12 April 2012 Accepted: 31 May 2012

Published: 23 July 2012

#### References

- Robertson A, Nelson RE: Certification and identification of the embryo. In *Manual of the International Embryo Transfer Society Volume 3*. Edited by Stringfellow DA, Seidel SM, Savoy IL. 116: 116; 1998:103-116.
- Jeong WJ, Cho SJ, Lee HS, Deb GK, Lee YS, Kwon TH, Kong IK: Effect of cytoplasmic lipid content on in vitro developmental efficiency of bovine IVP embryos. *Theriogenology* 2009, **72**:584-589.
- Tilly JL, Tilly KI: Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle stimulating bovine to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. *Endocrinology* 1995, **136**:242-252.
- Corrêa AG, Rumpf R, Mundim TCD, Franco MM, Dode MAN: Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. *Anim Reprod Sci* 2008, **104**:132-142.
- Balasubramanian S, Son WJ, Kumar BM, Ock SA, Yoo JG, Im GS, Choe SY, Rho GJ: Expression pattern of oxygen and stress-responsive gene transcripts at various developmental stages of in vitro and in vivo preimplantation bovine embryos. *Theriogenology* 2007, **68**:265-275.

6. Rodina TM, Cooke FNT, Hansen PJ, Ealy AD: Oxygen tension and medium type actions on blastocyst development and interferon-tau secretion in cattle. *Anim Reprod Sci* 2009, **111**:173-188.
7. Scott I: The role of mitochondria in the mammalian antiviral defense system. *Mitochondrion* 2010, **10**:316-320.
8. Crocco M, Alberio RH, Lauria L, Mariano MI: Effect of serum on the mitochondrial active area on developmental days 1 to 4 in vitro produced bovine embryos. *Zygote* 2011, **19**:297-306.
9. Tarazona AM, Rodriguez JJ, Restrepo LF, Olivera-Angel M: Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced in vitro. *Reprod Dom Anim* 2006, **41**:5-11.
10. Paroli M, Schiaffella E, Di Rosa F, Barnaba V: Persisting viruses and autoimmunity. *J Neuroimmunol* 2000, **107**:201-204.
11. Silva-Frade C, Martins Júnior A, Borsanelli AC, Cardoso TC: Effects of bovine Herpesvirus type 5 on development of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology* 2010, **73**:324-331.
12. Silva-Frade C, Gameiro R, Martins A Jr, Cardoso TC: Apoptotic and developmental effects of bovine Herpesvirus type-5 infection on in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* 2010, **74**:1296-1303.
13. Varela APM, Holz CL, Cibulski SP, Teixeira TF, Antunes AC, Franco AC, Roehle LR, Oliveira MT, Campos FS, Dezen D, Cenci A, Brito WD, Roehle PM: Neutralizing antibodies to bovine herpesvirus types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) and its subtypes. *Vet Microbiol* 2010, **142**:254-260.
14. Maidana SS, Ladelfa MF, Pérez SE, Lomónaco PM, Del Médico Zajac MP, Odeón A, Blanco Viera J, Combessies G, Fondevila N, Palacios M, Thiry J, Muykens B, Thiry E, Romera AS: Characterization of BoHV-5 field strains circulation and report of transient specific subtype of bovine herpesvirus 5 in Argentina. *BMC Vet Res* 2011, **7**:8.
15. Cardoso TC, Gomes DE, Ferrari HF, Silva-Frade C, Rosa ACG, Andrade AL, Luvizotto MCR: 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* 2010, **163**:509-512.
16. Oliveira MT, Campos FS, Dias MM, Velho FA, Freneau GE, Brito WM, Rijsewijk FA, Franco AC, Roehle PM: Detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in semen from Brazilian bulls. *Theriogenology* 2011, **75**:1139-1145.
17. Warthall AE, Simmons HA, Van Soom A: Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilization with virus-infected semen. *Theriogenology* 2006, **65**:247-274.
18. Kirkland PD, Poynting AJ, Gu X, Davis RJ: Infertility and venereal disease in cattle inseminated with semen containing bovine Herpesvirus type 5. *Vet Rec* 2009, **165**:111-113.
19. Diallo IS, Hewitson GR, Hoad J, Turner S, Corney BG, Rodwell BJ: Isolation of bovine herpesvirus type 5 from the semen of a healthy bull in Australia. *Aust Vet J* 2010, **88**:93-95.
20. Souza DG, Silva-Frade C, Martins A Jr, Cardoso TC: Bull semen variables after experimental exposure with Bovine Herpesvirus type 5. *Anim Reprod Sci* 2011, **124**:55-60.
21. Tiede LM, Cook EA, Morsey B, Fox HS: Oxygen matters: tissue culture oxygen levels affect mitochondrial function and structure as well as responses to HIV viroproteins. *Cell Death Dis* 2011, **2**. doi:10.1038/cddis.2011. Macmillan Publishers limited.
22. Tiede LM, Cook EA, Morsey B, Fox HS: Oxygen matters: tissue culture oxygen levels affect mitochondrial function and structure as well as responses to HIV viroproteins. *Cell Death Dis* 2011, **2**:e246.
23. Hay S, Kannourakis G: A time to kill: viral manipulation of the cell death program. *J Gen Virol* 2002, **83**:1547-1564.
24. Diallo IS, Corney BG, Rodwell BJ: Detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 using a multiplex real-time polymerase chain reaction. *J Virol Meth* 2011, **175**:46-52.
25. Del Médico Zajac MP, Romera SA, Ladelfa MF, Kotsias F, Delgado F, Thiry J, Meurens F, Keil G, Thiry E, Muykens 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* 2011, **7**:19.
26. Ferrari HF, Luvizotto MCR, Rahal P, Cardoso TC: 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* 2007, **143**:335-340.
27. Cardoso TC, Antello TF, Vieira FV, Machado ST, de Campos Nogueira AH: 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* 2011, **44**:379-382.
28. Griffin BD, Verweij MC, Wiertz EJJH: Herpesvirus and immunity: art of invasion. *Vet Microbiol* 2010, **143**:89-100.
29. Celi P, Merlo M, Da Dalt L, Stefani A, Barbato O, Gabai G: Relationship between late embryonic mortality and the increase in plasma advanced oxidized protein products (AOPP) in dairy cows. *Reprod Fert Develop* 2011, **23**:527-533.
30. Bregano LC, Agostinho SD, Roncatti FLBT, Pires MC, Riva HG, Luvizotto MCR, Cardoso TC: 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* 2011, **49**:41-48.
31. Cardoso TC, Ferrari HF, Garcia AF, Bregano LC, Andrade AL, Nogueira AH: Immunohistochemical approach to the pathogenesis of clinical cases of bovine Herpesvirus type 5 infections. *Diagn Pathol* 2010, **5**:57.
32. Derakhshan M: Effect of measles virus (MV) on mitochondrial respiration. *Indian J Med Res* 2010, **131**:97-100.

doi:10.1186/1477-7827-10-53

Cite this article as: Brenner et al.: Evaluation of developmental changes in bovine in vitro produced embryos following exposure to bovine Herpesvirus type 5. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2012 **10**:53.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit

