

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

AVALIAÇÃO DE GAMETAS E EMBRIÕES BOVINOS
PRODUZIDOS IN VITRO APÓS EXPOSIÇÃO
EXPERIMENTAL AO BoHV-5

Camila da Silva Frade

Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP

2009

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

AVALIAÇÃO DE GAMETAS E EMBRIÕES BOVINOS
PRODUZIDOS IN VITRO APÓS EXPOSIÇÃO
EXPERIMENTAL AO BoHV-5

Camila da Silva Frade

Orientadora: Profa. Dra. Tereza Cristina Cardoso

Co-orientador: Prof. Adjunto Alicio Martins Júnior

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

ARAÇATUBA – SP

2009

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CAMILA DA SILVA FRADE – nascida em 05 de janeiro de 1982, na cidade de Araçatuba-SP, formada em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – Araçatuba – SP, em 2007. Possui iniciação científica na área de Microbiologia Animal e Biotecnologia Aplicada à Reprodução Animal, ambas com bolsa FAPESP. Apresenta seis trabalhos completos publicados em periódicos e trinta trabalhos publicados em anais de eventos (resumo).

“O futuro pertence àqueles que
acreditam na beleza de seus sonhos”
(Eleanor Roosevelt)

DEDICATÓRIA

- Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pois sem Ele, nada seria possível e não estaríamos aqui reunidos, desfrutando juntos, deste momento tão importante.
- Aos meus pais, Marcos e Marina, ao meu irmão Marcos Júnior e ao meu esposo Marcelo, que de maneira especial contribuíram para realização deste sonho.
- Aos meus amigos, 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

- A 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. Além disso, agradeço pela amizade conquistada neste período;
- Ao Professor Adjunto ALICIO MARTINS JÚNIOR, pelos ensinamentos e pela atenção dedicada a minha formação profissional, além de todo apoio e amizade;
- Ao Curso de Pós-graduação em Ciência Animal do Curso de Medicina Veterinária da UNESP – Câmpus de Araçatuba pela aceitação do meu nome como aluna regular no Mestrado, e por tornar real mais uma conquista;
- Aos amigos que fiz junto ao Laboratório de Virologia do Curso de Medicina Veterinária da FOA – UNESP – Câmpus de Araçatuba: Deriane Elias Gomes, Gilmara Castilho, Ana Carolina Guedes Rosa, Heitor Ferrari, Rodrigo Lopes e a todos os alunos de iniciação científica;
- Aos amigos que fiz junto ao Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal do Curso de Medicina Veterinária da FOA – UNESP – Câmpus de Araçatuba: Ana Carolina Borsanelli, Heloise Paulo Pazian, Margareth (Margô), Martha Pato, Renata Sanches Calegari, José Antônio Tanajura Neto e Diego Gouvêa Souza;

- Aos funcionários da seção de pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, Câmpus de Araçatuba: Diogo e Valéria;
- Aos professores (Maria Cecília Rui Luvizotto, Alexandre Lima de Andrade, Roberto Gameiro e Sílvia Helena Venturolli) e a todos os amigos do Programa de Pós-graduação pelo convívio, amizade e carinho;
- Aos funcionários do Curso de Medicina Veterinária da FOA – UNESP – Câmpus de Araçatuba: Elza Branco, Isabel Pereira, Fátima Maria Berttoluci e Valdemar (*in memoria*);
- À FAPESP pelo apoio financeiro (processo: 2007/57774-7).

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	5
1. Exposição de oócitos, espermatozóides e embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> pelo BoHV-5	5
2. Conceitos sobre os marcadores pro e anti-apoptose	11
2.1. TUNEL	11
2.2. Anexina-V	12
2.3. Caspase-2 e -3	12
2.4. Bcl-2	13
3. Referências	14
CAPÍTULO 2	22
Resumo	22
Summary	23
2.1. Introdução	24
2.2. Material e Métodos	25
2.2.1. Titulação Viral	26
2.2.2. Experimento I	26
2.2.3. Experimento II	28
2.2.4. Experimento III	28
2.2.5. Detecção do vírus	29
2.2.6. Reação em Cadeia da Polimerase	29
2.2.7. Hibridização <i>in situ</i>	31
2.2.8. Análise estatística	33
2.3. Resultados	33
2.3.1. Exposição Experimental com BoHV-5	33
2.3.2. Desenvolvimento e produção <i>in vitro</i> de embriões	36
2.4. Discussão	39
2.5. Conclusão	42
2.6. Referências	43
CAPÍTULO 3	48
Resumo	48

	Página
Summary	49
3.1. Introdução	50
3.2. Material e Métodos	52
3.2.1. Titulação Viral	52
3.2.2. Experimento I	53
3.2.3. Experimento II	53
3.2.4. Experimento III	55
3.2.5. Teste de TUNEL	56
3.2.6. Imunofluorescência Indireta para Anexina-V, caspases e Bcl-2	56
3.2.7. Semi quantificação e análise dos dados	57
3.3. Resultados	58
3.4. Discussão	60
3.5. Conclusão	63
3.6. Referências	63
APÊNDICES	69

ABREVIATURAS

ANOVA – análise de variância
BoHV-5 – *Herpesvirus* bovino tipo 5
BoHV-1 – *Herpesvirus* bovino tipo 1
BSA – albumina sérica bovina
BVDV – vírus da diarreia viral bovina
CIV – cultivo *in vitro*
COC – complexo *cumulus* oócitos
CO₂ – dióxido de carbono
DMSO – dimetilsulfóxido
DNA – ácido dextrorribonucléico
FIV – fecundação *in vitro*
FSH – hormônio folículo estimulante
gC – glicoproteína C
HIV – vírus da imunodeficiência humana
IETS – *International Embryo Transfer Society*
IP – iodeto de propídio
ISH – hibridização *in situ*
LH – hormônio luteinizante
MDBK – Madin Darby bovine kidney
MEM – minimum essential medium
MgCl₂ – cloreto de magnésio
MIV – maturação *in vitro*
MM – meio de maturação
pb – pares de base
PBS – tampão fosfato salina
PCR – reação em cadeia da polimerase
PHE – penicilamina, hipotaurina e epinefrina
PIV – produção *in vitro*

PS - fosfatidilserina
PVA – álcool polivinílico
RNA – ácido ribonucléico
SFB – soro fetal bovino
SOF – synthetic oviduct fluid
SPTZ – espermatozóide
SSC – solução citrato salina
TALP – Tyrode albumina lactato e piruvato
TBE – tampão tris, ácido bórico e EDTA
TCID – tissue culture infective dose
TCM – tissue culture medium
TE – transferência de embriões
ZP – zona pelúcida
w/v – weight/volume (peso/volume)

AVALIAÇÃO DE GAMETAS E EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN VITRO APÓS EXPOSIÇÃO EXPERIMENTAL AO BoHV-5

RESUMO – A produção in vitro (PIV) de embriões e a transferência de embriões (TE) tratam-se de biotecnologias da reprodução, as quais são rotineiramente aplicadas no melhoramento genético da espécie bovina. No entanto, resta determinar até que ponto sua utilização implica na disseminação de patógenos no rebanho. A fim de elucidar a possibilidade de transmissão do BoHV-5 através de células germinativas e/ou embriões, após exposição experimental in vitro, uma série de 3 experimentos foram realizados. Estes consistiram na exposição de oócitos, espermatozóides e embriões bovinos ao BoHV-5, tendo como critério de avaliação o desenvolvimento embrionário, bem como a detecção do vírus através de emprego da técnica de hibridização in situ (ISH) e PCR, além da apoptose, determinada pelo teste de TUNEL e pela imunomarcagem dos fatores pro-apoptóticos (anexina-V, caspase-2 e -3) e anti-apoptóticos (Bcl-2). O experimento I foi realizado durante o período de maturação oocitária, sendo dividido em I (controle + 10% SFB), II (vírus + 10% SFB; BoHV-SFB) e III (vírus + 1 mg/mL PVA; BoHV-PVA); o experimento II foi realizado na etapa de fertilização, sendo dividido em I (controle) e II (exposto; BoHV-SPTZ); e o experimento III foi feito no período de cultura embrionária, sendo dividido em I (controle) e II (exposto; BoHV-PZ). A análise estatística para os resultados de desenvolvimento embrionário será feita pela ANOVA e teste-t de Bonferroni para os dados dos oócitos infectados e pelo teste t não pareado para os resultados de espermatozóides e embriões infectados, já para a análise da apoptose e marcadores apoptóticos será empregado o teste de Kruskal-Wallis e Dunn, diferenças serão consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Palavras-Chave: Apoptose, BoHV-5, embriões, ISH e PCR

AVALIATION OF BOVINE GAMETES AND EMBRYOS IN VITRO PRODUCED AFTER EXPERIMENTAL EXPOSURE TO BoHV-5

SUMMARY – The *in vitro* production (IVP) of embryos and embryo transfer (ET) are reproduction biotechnologies, which are routinely applied in breeding bovine. However, it remains to determine if these techniques can promote spread of pathogens in the herd. In order to elucidate the possibility of transmission of BoHV-5 by germ cells and/or embryos after *in vitro* experimental exposure, a total of 3 experiments were performed. These consisted of exposure of oocytes, sperm and embryos to BoHV-5, with the evaluation embryonic development, and detection of the virus through use of the technique of *in situ* hybridization (ISH) and PCR, in addition to apoptosis, determined by TUNEL test and by immunostaining of the factors pro-apoptotic (annexin-V, caspase-2 and -3) and anti-apoptotic (Bcl-2). The first experiment was conducted during the period of oocyte maturation and was divided into I (control + 10% FBS), II (virus + 10% fetal calf serum; BoHV-SFB) and III (virus + 1 mg / ml PVA, BoHV-PVA), the second trial was conducted at the stage of fertilization, was divided into I (control) and II (exposure, BoHV-SPTZ), and experiment III was done during the growing stage, and divided into I (control) and II (exposure; BoHV-PZ). Statistical analysis for the results of embryo development will be made by ANOVA and Bonferroni-t test to the data from exposed oocytes and the unpaired t test for the results of sperm and embryos exposed, as for the analysis of apoptosis will be used the Kruskal-Wallis and Dunn, differences are considered significant when $p < 0.05$.

Keywords: Apoptosis, BoHV-5, embryos, ISH e PCR

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. EXPOSIÇÃO DE OÓCITOS, ESPERMATOZÓIDES E EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* AO BoHV-5

A produção *in vitro* (PIV) de embriões e a transferência de embriões (TE) são biotécnicas de reprodução artificial comumente utilizadas no melhoramento genético de bovinos. Porém, ainda permanece incerto até que ponto a aplicação das mesmas pode influenciar na disseminação de patógenos no rebanho. Todavia, quando monitoradas corretamente, podem ser empregadas para prevenir a propagação de agentes infecciosos, embora, não representem uma rota natural para a transmissão de doenças (GARD et al., 2007).

A garantia de segurança sanitária no comércio de embriões bovinos é importante para aumentar o número de exportações e importações, e minimizar a ocorrência de surtos de doenças ou até mesmo a introdução de uma nova enfermidade no rebanho.

A Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) apresentou dados de 2003, mostrando que, aproximadamente 694.000 embriões bovinos produzidos *in vivo* foram transferidos para receptoras em todo o mundo. Além disso, cerca de 331.000 embriões bovinos foram obtidos através da PIV (THIBIER, 2004).

O uso de embriões tornou-se amplamente aceito como um meio seguro, eficiente e prático para o deslocamento de germoplasma. Entretanto, os procedimentos de TE e de PIV de embriões podem facilitar a disseminação de alguns patógenos, os quais podem ser transmitidos ocasionalmente pelo sêmen ou embriões (GARD et al., 2007).

Portanto, há a necessidade de protocolos eficientes para a PIV de embriões bovinos que, além de favorecer a sanidade do rebanho, ofereçam resultados satisfatórios, taxas constantes de produção embrionária e produtos saudáveis (SILVA, 2005).

O primeiro vírus considerado pela IETS (1998) como de ocorrência em oócitos e embriões de zona pelúcida intacta, é o vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV). Além disso, muitos patógenos têm sido relatados no sêmen de bovinos e de outros animais domésticos (AFSHAR et al., 1990; PHILPOTT, 1993; EAGLESOME et al., 1997).

Considerando que a PIV de embriões é também realizada a partir de oócitos bovinos colhidos de animais de abatedouros com controle sanitário desconhecido, fica evidente o risco potencial de transmissão de patógenos como o *Herpesvirus* bovino tipo 1 (D'ANGELO et al., 2002). Porém, comercialmente, os oócitos recuperados são de doadoras com sanidade comprovada, o que dificulta a disseminação de agentes infecciosos. O risco de transmissão de doenças deve-se, provavelmente, aos produtos de origem animal que são utilizados no processo de produção *in vitro* de embriões (SILVA, 2005), além da manipulação indiscriminada dos gametas e embriões.

Alguns vírus como o BoHV-1 e o BVDV podem estar presentes no soro (KNIAZEFF et al., 1975), fluido folicular (STRINGFELLOW e GIVENS, 2000a) ou células da granulosa de oócitos bovinos (BIELANSKI et al., 1997), assim como nas células do oviduto (GIVENS et al. 2002), indicando que animais infectados tem um potencial em transmitir a doença (BIELANSKI e DUBUC, 1994).

Esses relatos servem para destacar a necessidade de considerar o material de origem animal empregado na fecundação *in vitro* (FIV) e TE, bem como a saúde do touro, da doadora, dos embriões e receptoras quando se deseja produzir embriões livres de patógenos.

A PIV de embriões bovinos requer que o sistema e seus componentes estejam livres de doenças específicas e que garantam uma elevada porcentagem de produção embrionária com resultados repetíveis. O uso de macromoléculas não protéicas, especialmente do álcool polivinílico (PVA), tem sido discutido, a fim de eliminar o uso de produtos de origem animal nos meios de cultura *in vitro* (CIV) de embriões, os quais representam uma ameaça quanto a disseminação de patógenos. Segundo Seidel et al. (1990) e Nowshari

e Brem (2000) o PVA pode substituir o soro fetal bovino (SFB) nos protocolos de PIV.

Além do BVDV e BoHV-1, há também uma preocupação com a possível transmissão do BoHV-5, devido sua grande similaridade genômica com o BoHV-1, observada por Abdelmagid et al. (1995); dessa forma, é possível que o BoHV-5, após a reativação viral, tenha tropismo pelo aparelho genital, levando a comprometimentos na esfera reprodutiva, assim como observado para o BoHV-1. Dessa maneira, o desenvolvimento de experimentos usando o BoHV-5 pode elucidar a susceptibilidade do aparelho reprodutor de bovinos ao vírus.

O BoHV-5, vírus DNA de dupla fita, membro da família *Herpesviridae* e subfamília *Alphaherpesvirinae*, é o agente etiológico da meningoencefalite nos bovinos (RISSI et al., 2007), o qual causa perdas econômicas significantes para o gado de corte no sul da América (CARDOSO et al., 2007). Essa enfermidade é de curso geralmente fatal e afeta principalmente animais jovens (LOVATO, 1998; ROEHE et al., 1998).

Recentemente, o BoHV-5 foi classificado como a segunda maior causa de encefalite letal, em bovinos (SANCHES et al., 2000), com tendência a ser reativado da latência, após uma situação de estresse, incluindo infecções por outros agentes etiológicos (OSÓRIO, 1998). A infecção causada pelo BoHV-5 tem sido 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).

Os genomas do BoHV-1 e BoHV-5 apresentam uma homologia de aproximadamente 85%, de acordo com testes de cruzamento-hibridização do genoma completo (ABDELMAGID et al., 1995; ENGELHARDT e KEIL, 1996). Ambos BoHV-5 e BoHV-1 são vírus neurotrópicos que estabelecem latência no gânglio trigeminal (CHOWDHURY et al., 2000).

Em bovinos, o BoHV-1 causa uma variedade de problemas respiratórios e reprodutivos (vulvovaginites, endometrites, aborto e balanopostite). Em touros, o vírus geralmente replica na mucosa do prepúcio, pênis e uretra. O

sêmen é provavelmente contaminado pelo vírus presente na mucosa durante a ejaculação (WRATHALL et al., 2006).

O BoHV-5, o qual é potencialmente neuropatogênico, foi detectado em amostras de sêmen de animais infectados com BoHV-5 sem sintomatologia clínica, usando o sistema “nested polimerase chain reaction” (nested - PCR), amplificando o gene US4, diretamente e após o isolamento em cultura de células (GOMES et al., 2003).

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

O BoHV-5 foi isolado em fetos abortados (SCHUDEL et al., 1986), em amostras de sêmen frescas (ESTEVES et al., 2003) e em amostras de sêmen congeladas (KIRKLAND et al., 2009), sugerindo que o BoHV-5 pode estar associado a enfermidades reprodutivas, assim como o BoHV-1 (GOMES et al., 2003).

Diversos autores têm relatado a presença do BoHV-1 no sêmen bovino, empregando a técnica de PCR, mas a detecção do BoHV-5 foi descrita pela primeira vez por Gomes et al. (2003). Sendo assim, a infecção experimental com BoHV-5 em sêmen, oócitos e embriões bovinos pode determinar a susceptibilidade destes ao vírus e, talvez, medidas profiláticas possam ser tomadas, além de verificar se o vírus causa danos no desenvolvimento embrionário.

Apesar do grande número de embriões bovinos, oriundos de TE, que são transferidos anualmente, em todo o mundo, somente dois pesquisadores demonstraram a transmissão do BVDV através dessa 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 contaminado foi mencionado como possível origem do vírus.

Nussbaum et al. (1993) concluíram que, espermatozóides podem facilmente servir como carreadores de genes virais, especialmente de vírus

envelopados como os *Herpesvírus*. Além disso, Bacceti et al. (1994) encontraram partículas virais do vírus da imunodeficiência adquirida humana (HIV) em zigotos humanos, morfologicamente similares às visualizadas nos espermatozóides. Concluíram que, o vírus foi carregado pelos espermatozóides infectados para dentro dos oócitos durante a fertilização. Segundo Wrathall et al. (2006), o carregamento de vírus pela zona pelúcida de oócitos, através da fecundação *in vitro*, nunca foi descrito na espécie bovina.

Vanroose et al. (2000) estudaram os poros externos da zona pelúcida e mostraram que estes são largos o suficiente para permitir a entrada do BoHV-1 (180 – 200 nm). Também observaram em alguns zigotos fertilizados, a formação de escavações e fissuras na zona pelúcida com dimensão exata da cabeça espermática, podendo proporcionar um ponto de entrada para o vírus no momento da fecundação. Nesse local o vírus encontra-se protegido contra eventuais medidas sanitárias, como por exemplo, lavagens e tratamento com tripsina (KUBOVICOVA, 2008).

Dessa maneira, a tripsina não é suficiente para remover o BoHV-1 do embrião (BIELANSKI e DUBUC, 1994; BIELANSKI et al., 1997; D'ANGELO et al., 2002; EDENS et al., 2003; D'ANGELO et al., 2008) sugerindo uma interação entre o vírus e o embrião. Segundo Gillespie et al. (1990) o BoHV-1 adere ao embrião após exposição artificial. Sendo assim, o embrião pode funcionar como vetor na transmissão de patógenos.

O risco de introduzir agentes infecciosos na PIV de embriões é fato. Lavagens e tratamentos com tripsina são utilizados de maneira empírica e seguem o mesmo protocolo utilizado para os embriões produzidos *in vivo*, que não são efetivos para os embriões produzidos *in vitro* (STRINGFELLOW e GIVENS, 2000b), 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 PIV apresentam maior susceptibilidade a 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 BoHV-1, após exposição experimental ao vírus, sendo mais difícil de removê-los por meio do protocolo de tratamento com tripsina recomendado pela IETS (1998).

Guerin et al. (1990) estudaram o efeito do BoHV-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 BoHV-1 não somente foi adsorvido ao 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 morfológicamente normais foi reduzida quando esses foram produzidos no sistema de PIV, infectado com BoHV-1. Assim como, Makarevich (2007) observou comprometimento no desenvolvimento embrionário pré-implantação após exposição ao BoHV-1 e ele conclui que a consequência da infecção viral na viabilidade dos embriões pode depender do título viral.

Os embriões com zona pelúcida intacta foram protegidos contra a exposição, contudo, os blastocistos expandidos, expostos ao BoHV-1, apresentaram 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 FIV.

Vanroose et al. (2000) usaram espermatozóides previamente incubados com BoHV-1 na FIV, encontrando uma redução de até 60% no número de espermatozóides aderidos na ZP, quando comparada ao grupo controle (sem exposição ao vírus).

Gomes et al. (2003) e Schudel et al. (1986) demonstraram que o BoHV-5 também pode comprometer o aparelho reprodutor, semelhante ao BoHV-1.

É fato que embriões livres de patógenos podem ser produzidos; porém, não estão estabelecidos os melhores métodos que podem prover tal condição.

Segundo a IETS (1998), são necessárias mais pesquisas sobre a interação de patógenos com oócitos fecundados *in vitro*.

Com base na literatura, constata-se uma escassez de trabalhos direcionados para a pesquisa da transmissão viral, *in vitro*, em oócitos, espermatozóides e embriões bovinos, bem como da inexistência de relatos dessa forma de disseminação quando o agente viral é o *Herpesvirus* bovino tipo 5.

Dessa forma, o presente estudo foi delineado com o objetivo de buscar informações a respeito da susceptibilidade de gametas e embriões produzidos *in vitro*, na expectativa de comprovar a possibilidade de propagação desse agente viral, *in vitro*, além de procurar elucidar a forma de interação com os gametas e/ou embriões. Os resultados, independentemente da comprovação de transmissão e/ou de danos causados pelo vírus citado, podem trazer significativa contribuição para a área de TE e PIV de embriões.

A hipótese de trabalho é que oócitos, espermatozóides e prováveis zigotos expostos ao BoHV-5 diminui a produção *in vitro* de embriões bovinos, além de interferir no processo de apoptose acelerando a morte celular.

2. CONCEITOS SOBRE OS MARCADORES PRO E ANTI-APOPTOSE

2.1 Técnica de TUNEL

A apoptose é um processo fisiológico ativo da condensação da cromatina, redução do volume celular e formação de vesículas na membrana denominadas de corpos apoptóticos, tendo como resultado a fragmentação e eliminação da célula (SCHWARTZMAN E CIDLOWSKI, 1993).

A apoptose envolve dois mecanismos: intrínseco, dependente da mitocôndria, sendo iniciada por sinais intracelulares pro-apoptóticos levando a liberação do citocromo c e ativação das caspases, e extrínseco, que ocorre ligação receptor-ligante levando à ativação das caspases (Figura 1).

Considerando a grande complexidade do processo de apoptose, não é possível determinar o grau de apoptose das células utilizando apenas um único teste, portanto, foram utilizados outros quatros marcadores de apoptose mencionados a seguir, a fim de melhor elucidar o estudo da apoptose.

A técnica de TUNEL detecta a fragmentação de DNA das células apoptóticas por meio de rupturas do DNA, expondo um grande número de hidroxila final 3'. Estes grupos de hidroxila servem de terminais iniciadores para a deoxinucleotídeo transferase (TdT), a qual adiciona deoxiribonucleotídeos. Posteriormente, a BrdUTP marca os sítios de quebra do DNA, sendo detectada com o uso de anticorpo anti-BrdU por meio do Alexa Flúor® 488 dye conjugado ao anticorpo anti-BrdU, visualizando a reação em microscopia de fluorescência.

2.2 Anexina-V

A Anexina-V pertence a uma classe de proteínas dependentes de Ca^{2+} , mostrando estar envolvida na exocitose, inibição da proteína quinase C e na atividade dos canais de cálcio. Todas essas funções estão relacionadas com a habilidade da anexina ligar-se a fosfolipídios ácidos. A Anexina-V tem afinidade pela fosfatidilserina, normalmente este fosfolípídeo se encontra na parte interna da membrana citoplasmática. Durante o estágio de apoptose inicial a fosfatidilserina é translocada da parte interna para externa da membrana, levando a exposição deste fosfolípídeo, o qual pode ser reconhecido pela Anexina-V (HAYES et al., 2004), tal processo caracteriza a perda da simetria da membrana.

2.3 Caspase-2 e 3

As caspases são proteases cisteínas as quais são essenciais no processo de apoptose. Elas são sintetizadas como precursores inativos e podem ser caracterizadas como iniciadoras ou efetoras da cascata das

caspases (TORNBERY E LAZEBNIK, 1998). As iniciadoras (caspase-2, 8, 9 e 10) clivam as caspases efetoras inativas, ativando-as. Em contraste, 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 das células.

A procaspase 2 está localizada na mitocôndria e é liberada no citosol após ativação por vários estímulos fisiológicos e patológicos. A procaspase 3 é uma proteína citosólica (EARNSHAW et al., 1999).

2.4 Bcl-2

O regulador da morte celular nos mamíferos é o protooncogene Bcl-2, a expressão do gene Bcl-2 tem como função proteger as células da morte prevenindo ou impedindo o processo de apoptose. O Bcl-2 é uma proteína localizada na membrana externa da mitocôndria e essencial na regulação da liberação da citocromo *c* (YANG et al., 1997). Uma vez liberada, a citocromo *c* ativa os efetores da apoptose (caspases).

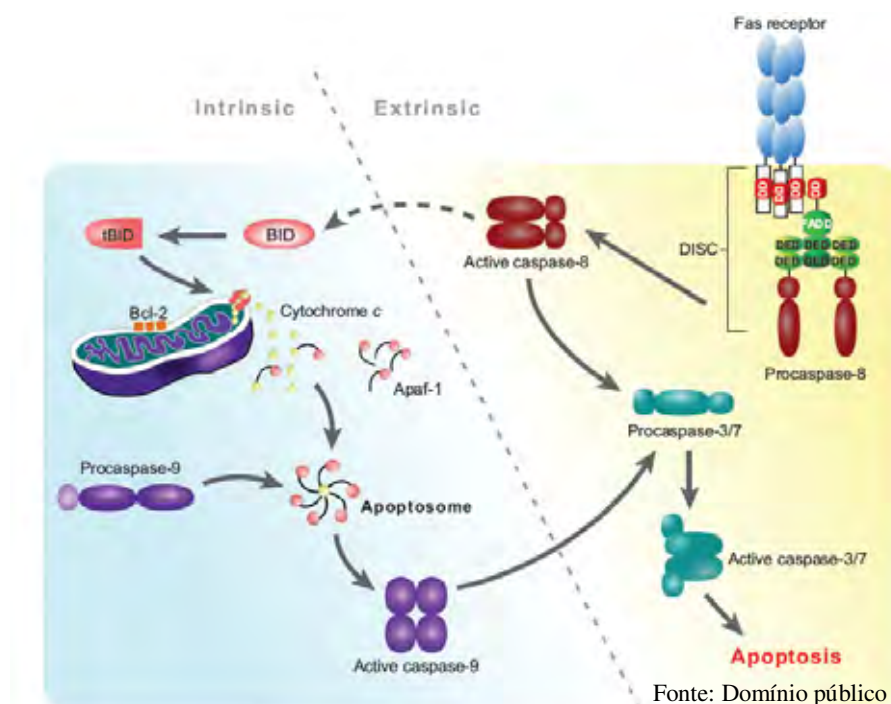


Figura 1. Representação esquemática do mecanismo de apoptose: extrínseco e intrínseco.

3. REFERÊNCIAS

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

AFSHAR, A.; EAGLESOME, M.D. Viruses associated with bovine semen. *Vet. Bull*, v.60, p.93-109, 1990.

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

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

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

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

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

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

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

D'ANGELO, M.; VISINTIN, J.A.; RICHTZENHAIN, L.J.; GONÇALVES, R.F. Evaluation of trypsin treatment on the inactivation of bovine herpesvirus type 1 on in vitro produced pre-implantation embryos. *Reprod. Domest. Anim*, v.44, p.536-9, 2008.

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

DREW, T.W.; SANDVIK, T.; WAKELEY, P.; JONES, T.; HOWRAD, P. BVD virus genotype 2 detected in British cattle. *Vet. Rec*, p.151:551, 2002.

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

EARNSHAW, W.C.; MARTINS, L.M.; KAUFMANN S.H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annual Reviews of Biochemistry*, v.68, p.383-424, 1999.

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

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

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

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

GILLESPIE, J.H.; SCHLAFFER, D.H.; FOOTE, R.H.; QUICK, S.; DOUGHERTY, E.; SCHIFF, E.; ALLEN, S. 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; RIDDELL, K.P.; GALIK, P.K.; STRINGFELLOW, D.A.; BROCK, K.V.; LOSKUTOFF, N.M. Diagnostic dilemma encountered when detecting bovine viral diarrhea virus in IVF embryo production. *Theriogenology*, v.58 p.1399-1407, 2002.

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

GUERIN, B.; Le GUIENNE, B.; ALLEITTA, M.; HARLAY, T.; THIBIER, M. Effets de la contamination par le BHV-1 sur la maturation et fécondation in vitro des ovocytes des bovines. *Rec. Med. Vet*, v.66, p.911-917, 1990.

HAYES, M.J.; MOSS, S.E. Annexins and disease. *Biochem Biophys Res Commun*, v.322, p.1166-1170, 2004.

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

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

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

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

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

LINDBERG, A.; ORTMAN, K.; ALENIUS, S. Seroconversion to bovine viral diarrhea virus (BVDV) in dairy heifers after embryo transfer. In: 14th international congress on animal reproduction, v.1; 2000. p. 250 [abstract], 2000.

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

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

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

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

PARSONSON, I.M.; SNOWDON, W.A. The effect of natural and artificial breeding using bulls infected with, or semen contaminated with, infectious bovine rhinotracheitis virus. *Australian Veterinay Journal*, v.51, p.365-369, 1975.

PHILPOTT, M. The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. *Br. Vet. J.*, v.149, p.339-69, 1993.

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

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

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

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

SEIDEL, G.E Jr; ELSDEN, R.P.; BRINK, Z. Cryopreservation of bovine embryos in media with chemically defined macromolecules. *Theriogenology*, v.33, p.322 (abstract), 1990.

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, 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.

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

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

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

THIBIER, M. Data retrieval committee annual report. *Embryo Transfer Newsletter*, v.25, p.12-9, 2004.

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

VANROOSE, G.; NAUWYNCK, H.; VAN SOOM, A.; VANOPDENBOSCH, E.; de KRUIF, A. Comparison of the susceptibility of in vitro produced hatched

blastocysts for an infection with bovine herpesvirus-1 and herpesvirus-4. In: Proceedings of the 12th Reunion of European Embryo Transfer Association. (abstract 206), 1996.

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

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

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

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

YANG, L.; LIU, X.; BHALA, A.J.; KIM, C.N.; IBRADO, A.M.; CAI, J.; PENG, T.I.; JONES, D.P.; WANG, X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, v.275, p.1129-1132, 1997.

CAPÍTULO 2 - ARTIGO

Estudos *In Vitro* Sobre a Interação de Gametas e Embriões Bovinos Expostos Experimentalmente ao BoHV-5

RESUMO - O *Herpesvirus* bovino pode estar associado a distúrbios reprodutivos. O Tipo 1 (BoHV-1) é a espécie mais estudado. Embora o tipo 5 tenha sido detectado em fetos abortados e sêmen bovino, nenhum relato comprovou a presença do vírus em gametas e embriões. Este estudo foi dividido em três experimentos, os quais avaliaram: I) oócitos expostos experimentalmente ao BoHV-5 (em meio contendo SFB ou PVA) fecundados por espermatozóides livre de vírus; II) oócitos fecundados por espermatozóides expostos ao BoHV-5; e III) prováveis zigotos expostos ao BoHV-5. A presença do BoHV-5 foi detectada pela PCR e hibridização *in situ*, e a capacidade de fecundação e desenvolvimento embrionário foi avaliada utilizando o procedimento de cultivo *in vitro* (CIV). A exposição experimental foi detectada em todos os experimentos e, a transmissão vertical do BoHV-5 pelos gametas foi confirmada, já que a exposição realizada nos oócitos e espermatozóides produziu embriões com presença de vírus. A taxa de fecundação foi reduzida (9,5%) no grupo de oócitos expostos ao vírus em meio contendo SFB (Bonferroni teste-*t*, $P < 0,05$), mas a produção de embriões resultantes deste grupo foi semelhante aos demais (Bonferroni teste-*t*, $P > 0,05$). A exposição dos gametas ao BoHV-5 não comprometeu o desenvolvimento embrionário, já prováveis zigotos expostos ao vírus no 1º dia pós-fecundação produziram um menor (11,4%) número de embriões (Student *t*-test, $P < 0,05$). Estes resultados sugerem que o BoHV-5 pode interagir com gametas e prováveis zigotos e, que pode ocorrer a propagação do vírus para o embrião durante o desenvolvimento *in vitro*.

Palavras-chave: bovino, embriões, *Herpesvirus*, hibridização *in situ* e PCR

In Vitro Studies About Bovine Gametas and Embryos Interaction Experimentally Exposed to BoHV-5

SUMMARY - Bovine *Herpesviruses* may be associated to reproductive disorders. Type 1 (BoHV-1) is the most studied strain. Although the type 5 strain has been detected in bull semen and aborted fetuses, it has not been found in gametes and embryos. This study consisted of three experiments that evaluated: I) BoHV-5-exposed oocytes (in medium with FBS or PVA) fertilized by normal sperm; II) normal oocytes fertilized by BoHV-5-exposed sperm; and III) exposition of presumptive zygotes by BoHV-5. BoHV-5 exposition was detected by PCR and *in situ* hybridization assay, and fertilization capacity and embryonic development was assessed using the *in vitro* culture procedure. Experimentally induced exposition was obtained in all experiments, and vertical transmission of BoHV-5 by the gametes was confirmed, the oocytes and spermatozoa exposed to BoHV-5 produced embryos with presence of virus. The fertilization rate was reduced (9,5%) only in oocytes exposed in FBS medium (Bonferroni *t*-test, $P < 0.05$), but the resulting embryo production of this group was similar to the others (Bonferroni *t*-test, $P > 0.05$). The development of embryos exposed by any of the gametes was not compromised, but presumptive zygotes directly exposed on day 1 post-fertilization produced a lower (11,4%) number of embryos *in vitro* (Student *t*-test, $P < 0.05$). These results show that BoHV-5 can interact gametes and presumptive zygotes, and then the virus can be transmitted to the embryo during *in vitro* development.

Keywords: bovine, embryos, *Herpesvirus*, *in situ* hybridization and PCR

2.1 Introdução

O *Herpesvirus* bovino é um patógeno que acomete a espécie bovina, podendo presente em animais aparentemente saudáveis. Existem três tipos conhecidos de *Herpesvirus* bovino (BoHV-1, 4 e 5), que estão associados a distúrbios reprodutivos (SMITH, 1997). O BoHV-1 é o mais investigado, tendo grande impacto econômico na pecuária (MUYLKENS et al., 2007; WRATHALL et al., 2006). Sua ocorrência foi relacionada a rinotraqueíte infecciosa bovina, endometrite, aborto, vulvovaginite pustulosa infecciosa, balanopostite, e a 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).

Oócitos, espermatozóides e embriões bovinos produzidos *in vitro* representam um risco potencial de transmissão do BoHV-1, visto que, o vírus pode ser carregado por animais clinicamente saudáveis (WRENZYCKY et al., 2007). O BoHV-1 pode ser encontrado no líquido folicular e em células epiteliais de oviduto bovino (D'ANGELO et al., 2009). Nos machos, o vírus pode ser liberado 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 (MUYLKENS et al., 2007; WRENZYCKI et al., 2007). Embriões também podem ser infectados pelo BoHV-1 através dos componentes de origem animal presentes nos meios utilizados para produção *in vitro* (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 2000). O soro fetal bovino (SFB), comumente utilizado na PIV de embriões, pode ser responsável por carrear fungos, bactérias e vírus (CARDOSO et al., 2005; MAKOSCHEY et al., 2002), para os meios em que é utilizado. Por esta razão, o PVA é uma alternativa sintética para substituir o SFB, já que ambos

são macromoléculas, no entanto o PVA apresenta menor possibilidade de contaminação (NOWSHARI e BREM, 2000; MERTEN et al., 1999).

O BoHV-5 e o BoHV-1, são *alfa-herpesvirus*, e apresentam 85% de similaridade genômica (CHOWDHURY, 1995). Assim, apesar das escassas informações disponíveis a respeito do BoHV-5 relacionado com o sistema reprodutivo, supõe-se que, após a reativação e replicação viral o mesmo possa causar distúrbios reprodutivos em bovinos. O BoHV-5 é o agente causador da segunda mais importante doença infecciosa cerebral, denominada de encefalite herpética, a qual afeta o rebanho bovino na América Latina. O vírus é caracterizado por uma rápida replicação lítica em cultura de células e, como BoHV-1, estabelece latência nos gânglios sensoriais do sistema nervoso do hospedeiro (RISSI et al., 2007). O BoHV-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 bovino.

O presente estudo tem como objetivo investigar se há interação entre oócitos, espermatozóides e/ou zigotos bovinos com o BoHV-5, como também avaliar os efeitos da propagação do vírus durante o desenvolvimento embrionário.

2.2 Material e Métodos

O delineamento experimental incluiu gametas e zigotos bovinos expostos experimentalmente ao BoHV-5, e subsequente detecção do DNA viral pelo uso da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e hibridização *in situ* (ISH), bem como avaliação da taxa de fecundação e o desenvolvimento embrionário *in vitro*. No Experimento I, oócitos expostos ao vírus foram fecundados com espermatozóides livre do vírus e no Experimento II oócitos sadios foram fecundados com espermatozóides contaminados com BoHV-5. O Experimento III testou a exposição pelo BoHV-5 nos prováveis zigotos.

2.2.1 Titulação Viral

Amostras do *Herpesvirus* bovino tipo 5 (BoHV-5), isoladas de bovinos acometidos pela infecção na região de Araçatuba, São Paulo, Brasil, em 2007 (FERRARI et al., 2007) foi propagado em células “Madin Darby Bovine Kidney” (MDBK, ATCC) e cultivado em “minimum essential medium” (MEM). A dose infectante da cultura de tecidos por 50 µL (TCID₅₀) da amostra de vírus foi determinada pela técnica de neutralização em células MDBK (CARDOSO et al., 2007). Alíquotas da amostra viral (100 µL), com 10^{3,3} TCID₅₀/50µL foram mantidas em freezer a -86°C até o uso.

2.2.2 Experimento I

O Experimento I objetivou avaliar os efeitos da exposição de oócitos bovinos pelo BoHV-5 na produção *in vitro* de embriões. Os oócitos utilizados foram obtidos a partir de ovários de animais mestiços abatidos no frigorífico Brasfrigo. Os ovários foram transportados para o laboratório no prazo de 1 h *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. Apenas os COC que apresentavam 3 a 4 camadas ou mais de células *cumulus* compacta e citoplasma homogêneo, foram selecionados. Estes foram divididos em gotas com 15 a 20 oócitos para serem utilizados nos experimentos.

Os oócitos (n = 542) foram distribuídos equitativamente em três grupos, sendo: meio de maturação (MM) acrescido de SFB (controle, n = 179), MM acrescido de SFB com BoHV-5 (BoHV-SFB, n = 185) e MM acrescido de PVA com BoHV-5 (BoHV-PVA, n = 178).

O meio de maturação era constituído de 100 µL TCM-199 (GIBCO-BRL, Grand Island, E.U.A.), 2,2 mg/mL de bicarbonato de sódio, 0,02 mg/mL de piruvato de sódio, 0,05 mg/mL de sulfato de gentamicina, 0,5 mg/mL de FSH e 50 mg/mL de LH, suplementado com 10% SFB ou 1 mg/mL de PVA (cat # P8136 Sigma-Aldrich, St. Louis, MA). As gotas de maturação eram cobertas com óleo mineral e levadas para estufa de CO₂ por 2 horas antes de receber os oócitos para a estabilização do meio com relação à temperatura e pH.

Os oócitos dos grupos BoHV-SFB e BoHV-PVA foram expostos experimentalmente com 10 µL de BoHV-5 (FERRARI et al., 2007), sendo estes co-incubado por 1 h a 39°C e 5% de CO₂ em ar. Em seguida, os oócitos foram lavados sequencialmente em MM por três vezes e, posteriormente, transferidos para gotas de MM livre de vírus, a fim de prosseguirem o desenvolvimento *in vitro*. O grupo controle foi submetido ao mesmo protocolo, exceto à exposição ao BoHV-5. Após 24 h de maturação, os oócitos foram transferidos para gotas contendo meio de fertilização *in vitro* (FIV).

As doses de sêmen (0,5 mL/dose) foram obtidas de um único touro *Bos indicus*, sendo todas as amostras pertencentes à mesma partida. Antes de iniciar os experimentos, o sêmen foi avaliado quanto à concentração, motilidade e patologia, e observou-se 20 x 10⁶ espermatozóides por dose, 60% de movimento progressivo e 90% de espermatozóides com ausência de patologia, apresentando-se apto para o procedimento de fertilização *in vitro* (FIV).

Para a realização da FIV, uma amostra (palheta 0,5 mL) de sêmen foi descongelada a 37°C por 30 segundos e centrifugada em gradiente Percoll (45% e 90%; Nutricell®, Campinas, Brasil) a 700 X g durante 20 min. O “pellet” de espermatozóides resultante foi lavado em meio TALP (Tyrode albumina lactato piruvato suplementado com 6 mg/mL de BSA) a 200 X g por 5 min. O sedimento foi diluído em meio FIV (meio TALP suplementado com 3 mg/mL de heparina e solução PHE: 2 mM penicilamina, 1 mM hipotaurina e 250 mM de epinefrina, Sigma-Aldrich®), para obter uma concentração final de 1x10⁵ espermatozóides em 100 µL de meio FIV.

Posteriormente, os oócitos e espermatozóides foram co-incubados no meio FIV por 20 h, nas mesmas condições utilizadas para maturação *in vitro* (MIV). A capacidade de fertilização foi determinada pela taxa de clivagem, e o desenvolvimento embrionário foi avaliado pelo número de oócitos que atingiram o estágio de mórula (Mo)/blastocisto (Bl), Bl/blastocisto expandido(Bx) e Bl/Bx/blastocisto eclodido (Be) às 72, 144 e 168 h pós-fecundação, respectivamente. Após a produção dos blastocistos no dia 7 pós-fecundação

(GONÇALVES et al., 2008), apenas os embriões classificados como grau 1 (excelente), 2 (bom) (ROBERTSON e NELSON, 1998) foram utilizados para a pesquisa viral.

2.2.3 Experimento II

Para avaliar a exposição dos espermatozóides ao BoHV-5 um total de 289 oócitos foram divididos equitativamente em dois grupos para receberem um dos seguintes tratamentos: sêmen controle (controle, n = 148) e sêmen contaminado com BoHV-5 (BoHV-SPTZ, n = 141). A obtenção, seleção e maturação dos oócitos, bem como o procedimento de FIV, foram realizados segundo o Experimento I, descrito acima.

Para a exposição dos espermatozóides foram utilizadas duas palhetas de sêmen (1 mL) sendo estas colocadas em um mesmo tubo e, posteriormente, dividida em duas partes iguais de 0,5 mL. Todavia apenas uma das partes da amostra foi co-incubada com 5 µL do vírus (diluição 1:10) por 1 h à temperatura ambiente e protegida da luz. Após este período as amostras de sêmen foram depositadas sobre o gradiente Percoll, centrifugadas e utilizadas para fertilizar os oócitos. A taxa de fertilização e o desenvolvimento embrionário foram avaliados como no Experimento I.

2.2.4 Experimento III

Os mesmos procedimentos utilizados no Experimento I foram empregados neste experimento. As gotas com os prováveis zigotos (n = 327), produzidos no dia 1 pós-fecundação foram divididas em dois grupos: ausência vírus (controle, n = 164) e expostos ao BoHV-5 (BoHV-PZ, n = 163). O grupo BoHV-PZ foi co-incubado com o vírus na diluição de 1:10, nas mesmas condições utilizadas no Experimento I. Após o período de adsorção (1 h), os prováveis zigotos foram lavados sequencialmente por três vezes em meio de cultivo e transferidos para gotas de meio SOF (fluido sintético de oviduto) livre de vírus, por sete dias, nas mesmas condições utilizadas para a MIV e FIV. O desenvolvimento embrionário foi avaliado como no Experimento I e II.

2.2.5 Detecção do Vírus

A presença do BoHV-5 e BoHV-1 foi avaliada em todos os reagentes utilizados durante o procedimento de PIV de embriões bovinos, já que estes apresentam grande homologia.

Foram testados: soro fetal bovino (SFB, Nutricell®), hormônio folículo-estimulante (FSH, Pluset®, Calier, Espanha), hormônio luteinizante (LH, Lutropin-V®, Bioniche Inc., Canadá), sêmen, células (gametas e embriões) e células MDBK pela técnica de PCR, visando o gene da glicoproteína-C como descrito abaixo. A presença do vírus em oócitos, espermatozóides e embriões produzidos *in vitro* foi determinada pela técnica de PCR e ISH.

As amostra de oócitos, sêmen e embriões foram obtidas após o período de maturação (24 h), após realização do gradiente de Percoll e após 168 h pós-fecundação, respectivamente.

2.2.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA dos oócitos, espermatozóides e embriões foram extraídos com uso de Mini Kit PureLink™ Viral RNA/DNA (Invitrogen™, cat # 12280-050), seguindo as recomendações do fabricante (Figura 1). A reação de PCR foi realizada utilizando o sistema GeneAmp® *High Fidelity* (Applied Biosystems, Califórnia, E.U.A.). Resultando um volume final de 25 µL composto por 10 µL da amostra de DNA, 2,5 µL de DMSO (dimetilsulfóxido), 10 pmol de cada primer, 10 mM de dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 2,5 µL do tampão 10X GeneAmp® *High Fidelity* e 1,0 µL da enzima GeneAmp® *High Fidelity*. O conjunto de "primers" escolhido foi B5 específico para o BoHV-5 (5'-CGG ACG AGA CGC CCT TGG-3' nt 322-339) e o consenso denominado Bcon (5'-AGT GCA CGT ACA GCG GCT CG-3' nt 519-538) capaz de amplificar 159 bp do BoHV-5 (gene da gC).

A reação de PCR seguiu as seguintes condições:

1º. - 94°C durante 5 minutos – desnaturação inicial

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

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

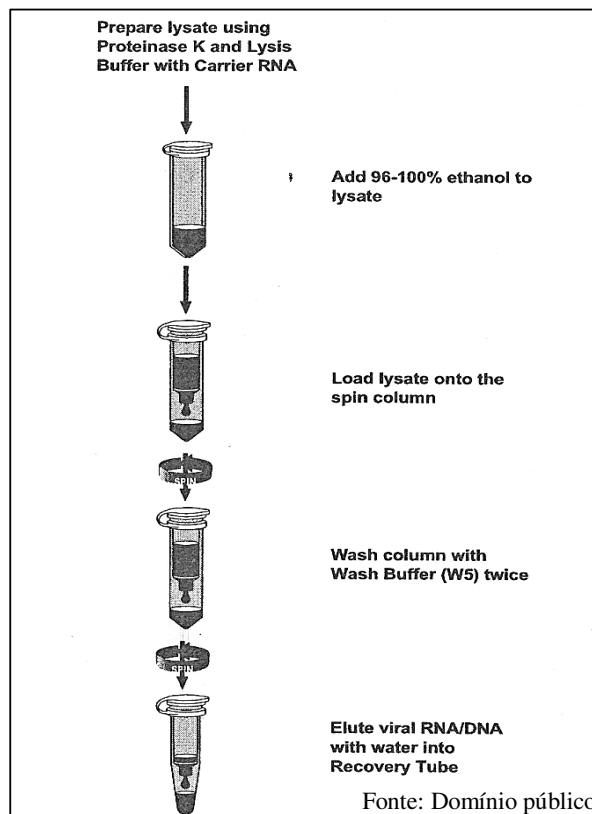
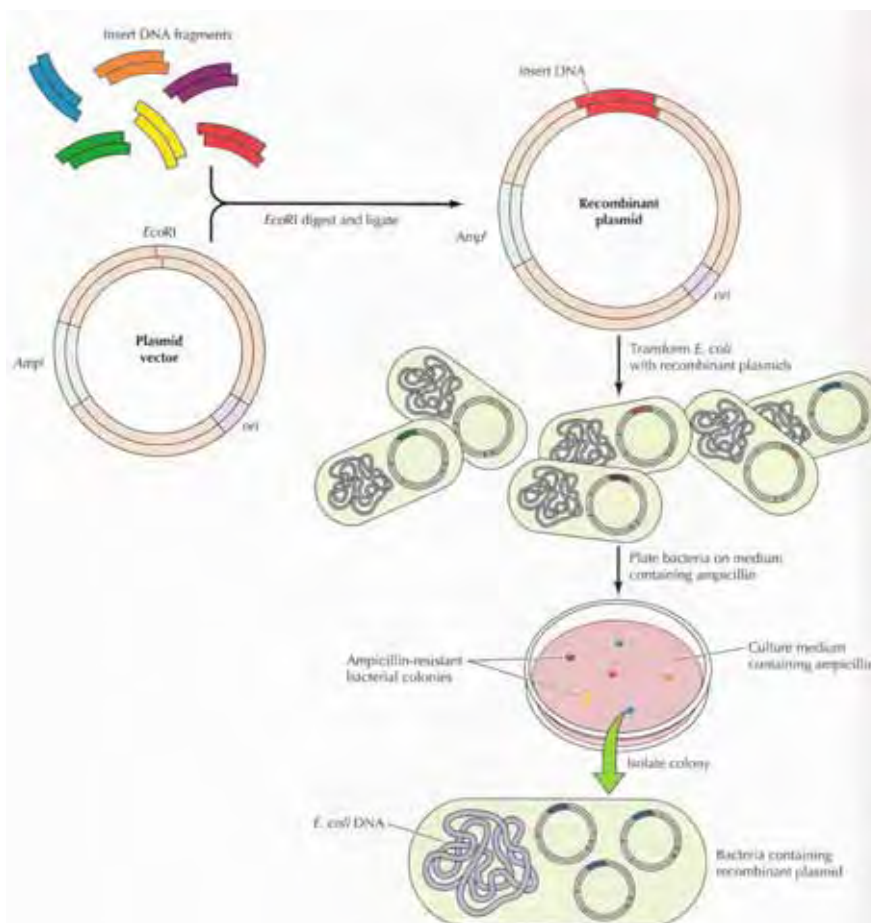


Figura 1. Extração de DNA viral usando o PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit.

2.2.7 Hibridização *in situ*

Para a realização da hibridização *in situ*, a sonda de DNA foi preparada a partir dos produtos da PCR do gene da gC (CHOWDHURI et al., 2000) do DNA viral (FERRARI et al., 2007). Produtos de 159 pares de base (pb) foram produzidos pela técnica de PCR pelos “primers” senso gl + (5´-GTG CTC TTC TCC ATC CCG-3») e anti-senso gl-(5´-GCG GAG GAGGAG TCG TTG G-3”) (InvitrogenTM, Brasil). Após a purificação do DNA em gel de agarose, o produto da PCR foi ligado ao TA-vetor (pGEMTEasy, Promega, Madison, WI, E.U.A.) e ligação dos produtos foi introduzida em *E. coli* por choque térmico. Colônias positivas foram confirmadas pelo sequenciamento do DNA (Figura 2). A colônia positiva foi cultivada e o DNA do plasmídio foi preparado utilizando um kit comercialmente disponível (Promega Mini-Prep, Promega, Madison, WI, E.U.A.). A sonda foi gerada pela reação de PCR, visando o gene da gC localizado no plasmídio como descrito anteriormente, usando a biotina marcada com o “primer” anti-senso (InvitrogenTM).



Fonte: Domínio público

Figura 2. Representação esquemática da técnica utilizada para reprodução do fragmento de DNA (sonda).

Para a realização da técnica de ISH os oócitos, espermatozóides e embriões, com os respectivos meios de manutenção, foram colocados em lâminas de vidro, pré-tratadas com poli-L-lisina pura (Sigma-Aldrich®) e estes foram fixados com 4% (w/v) de paraformaldeído (Sigma -Aldrich®) diluído em tampão fosfato salina (PBS) por 24 horas a 4 °C. Os oócitos e embriões foram lavados antes da fixação por três vezes em gotas contendo 500 µL de PBS. Para iniciar o procedimento de ISH as lâminas foram tratadas com proteinase K (10 mg/mL, Invitrogen™) durante 10 minutos a temperatura ambiente e, em seguida lavadas com PBS. A sonda denaturada de 159-pb ligada a biotina foi diluída no volume de 2 µL (2 ng/mL) para 98 µL de tampão pré-hibridação

(formamida 50%, 5% soroalbumina bovina, 1% N-lauroilsarcosina e sulfato dodecil de sódio 0,02%) . As lâminas com a sonda foram incubadas por 12 h a 37°C, mantidas em câmara úmida. Em seguida, estas foram lavadas em soluções de concentração decrescente: 1 x SSC (solução salina de citrato de sódio) e 0,1 x SSC por 10 min a 42°C. O sistema de detecção consistiu de estreptavidina conjugada à fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich®, cat # S2890) por 2 horas a 37°C, seguido de incubação com o substrato *SIGMA FAST*TM (Fast Red TR/Naphthol AS-MX fosfatase alcalina, cat # F4648) por 20 minutos em temperatura ambiente. As lâminas foram cobertas com lamínulas usando glicerol em solução tamponada (pH 7.0) e foram analisadas em microscopia óptica.

2.2.8 Análise Estatística

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

As taxas de fertilização e desenvolvimento embrionário foram analisadas utilizando ANOVA e teste-*t* de Bonferroni para Experimento I. Para os dados do Experimento II e III foi utilizado o teste-*t* de Student para amostras independentes. $P > 0,05$ foi considerado como diferença estatística.

2.3 Resultados

2.3.1 Exposição Experimental ao BoHV-5

O gene da gC foi amplificado pela técnica de PCR em oócitos e embriões (Experimento I); espermatozóides e embriões (Experimento II) e embriões (Experimento III) co-incubados com BoHV-5, sendo possível a visualização dos produtos com 159 pb (Figura 3).

A ISH para detecção do BoHV-5 foi positiva em todos os Experimentos (I, II e III). A presença do vírus foi evidenciada pela deposição de pigmento

vermelho nos oócitos, espermatozóides e embriões infectados. O vírus foi detectado predominantemente nas células do *cumulus* e no citoplasma dos CCO (Figura 4), ligado à membrana externa da cabeça e cauda dos espermatozóides, (Figura 5), bem como no trofoblasto e embrioblasto (Figura 6 e 7).

A amplificação do gene e os depósitos de pigmento vermelho nas células não foram detectados em nenhuma estrutura do grupo controle para os Experimentos I, II e III.

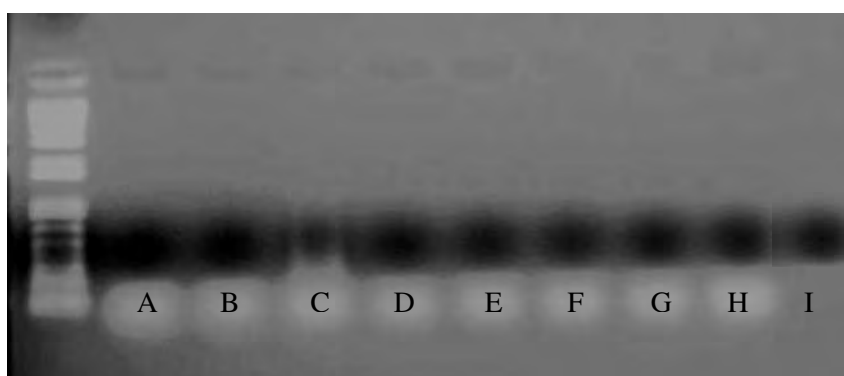


Figura 3. Amostras analisadas pela técnica de PCR para pesquisa do BoHV-5: A. oócitos (BoHV-SFB), B. oócitos (BoHV-PVA), C. embriões (BoHV-SFB), D. embriões (BoHV-PVA), E. sêmen (BoHV-SPTZ), F. embriões (BoHV-SPTZ), G. embriões (BoHV-PZ), H. controle positivo e I. controle negativo.

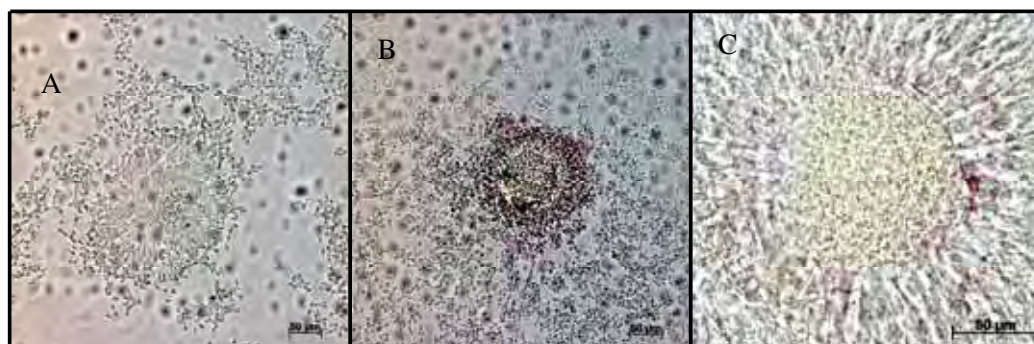


Figura 4. Infecção experimental de oócitos bovino pelo BoHV-5 submetidos à técnica de ISH: (A) controle, (B) BoHV-SFB e (C) BoHV-PVA. Sinais positivos de ISH são representados pela deposição de pigmentos vermelhos nos grupos infectados.

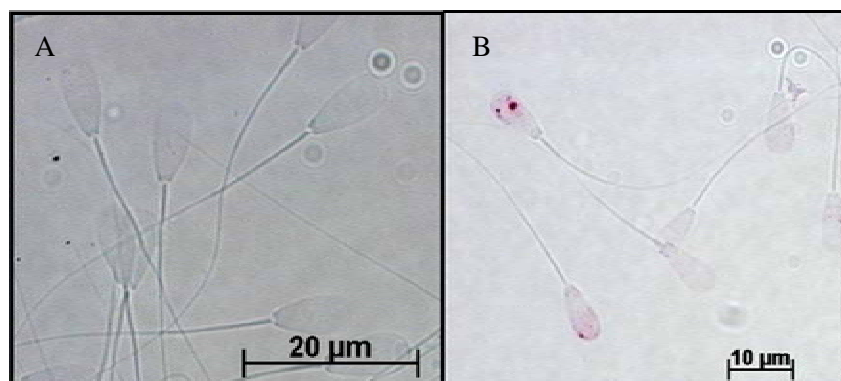


Figura 5. Infecção experimental de espermatozoides bovino pelo BoHV-5 submetidos à técnica de ISH: (A) espermatozoides controle e (B) espermatozoides infectados. Sinais positivos na ISH são representados pela deposição de pigmentos vermelhos no grupo infectado.

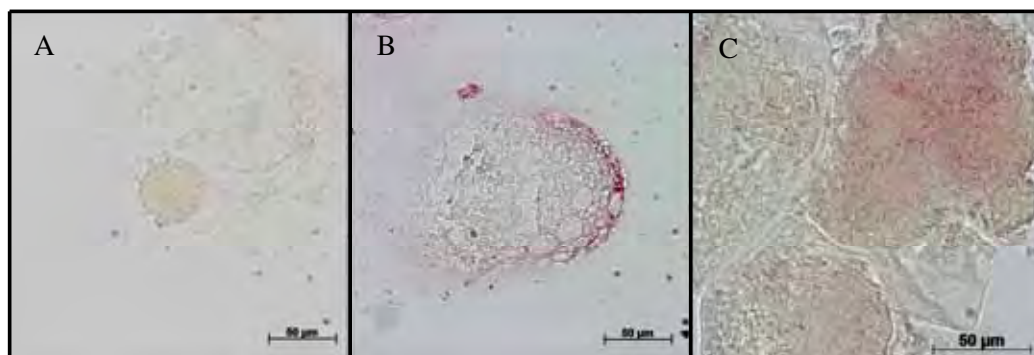


Figura 6. Embriões bovino oriundos de ócitos infectados com BoHV-5 e submetidos à técnica de ISH: (A) controle, (B) BoHV-SFB e (C) BoHV-PVA. Sinais positivos de ISH são representados pela deposição de pigmentos vermelhos nos grupos infectados.

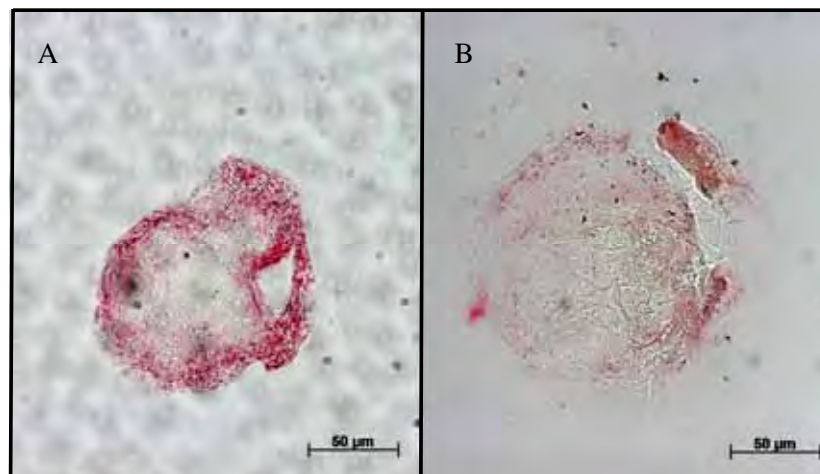


Figura 7. Embriões bovinos oriundos de (A) fertilização com espermatozoides infectados com BoHV-5 e (B) PZ infectados às 20h pós-fecundação. Os sinais positivos obtidos pela ISH são representados por depósitos de pigmento vermelho nos embriões.

2.3.2 Desenvolvimento e Produção *in Vitro* de Embrião

No experimento I (Tabela 1, Figura 8 e 9) observou-se que a taxa de fertilização no grupo BoHV-SFB foi menor quando comparado ao grupo controle ($P < 0,05$), e ambos não diferiram do grupo BoHV-PVA. Não houve diferença estatística entre os diferentes grupos de tratamento para a produção *in vitro* de embriões ($P > 0,05$). No experimento II (Tabela 1, Figura 10) não houve diferença significativa na taxa de fertilização e desenvolvimento embrionário entre os diferentes grupos ($P > 0,05$). No Experimento III (Tabela 1, Figura 11) não houve diferença estatística entre os grupos para a taxa de fertilização ($P > 0,05$), todavia houve menor ($P < 0,05$) produção de embriões no grupo infectado quando comparado ao grupo controle.

Tabela 1 – Produção *in vitro* de embriões bovino após exposição de oócitos, espermatozóides e prováveis zigotos ao BoHV-5, respectivamente (N=9 por tratamento)

Tratamentos	Número total de oócitos	Desenvolvimento embrionário (média ± S)		
		Fertilização	Mo/BI/Bx*	BI/Bx/Be*
Experimento I – Infecção dos oócitos				
Controle-SFB	179	89.9 ± 6.5 ^a	31.1 ± 7.7	28.8 ± 9.2
BoHV-SFB	185	80.4 ± 8.9 ^b	31.2 ± 8.2	29.3 ± 8.2
BoHV-PVA	178	87.3 ± 7.1 ^{ab}	37.5 ± 13.0	35.6 ± 13.1
Experimento II – Infecção do sêmen				
Controle	141	87.5 ± 7.5	41.7 ± 9.9	39.6 ± 10.3
BoHV-5	148	92.2 ± 5.5	44.3 ± 7.7	40.8 ± 9.2
Experimento III – Infecção dos prováveis zigotos				
Controle	164	83.8 ± 7.6	31.6 ± 4.6 ^a	31.6 ± 4.6 ^a
BoHV-5	163	80.5 ± 8.7	25.0 ± 5.5 ^b	20.2 ± 5.4 ^b

^{a,b} Valores seguidos por letras diferentes na mesma coluna e experimento indicam diferença estatística entre os tratamentos (P>0.05)

*mórula (Mo), blastocisto (BI), blastocisto expandido (Bx) e blastocisto eclodido (Be)

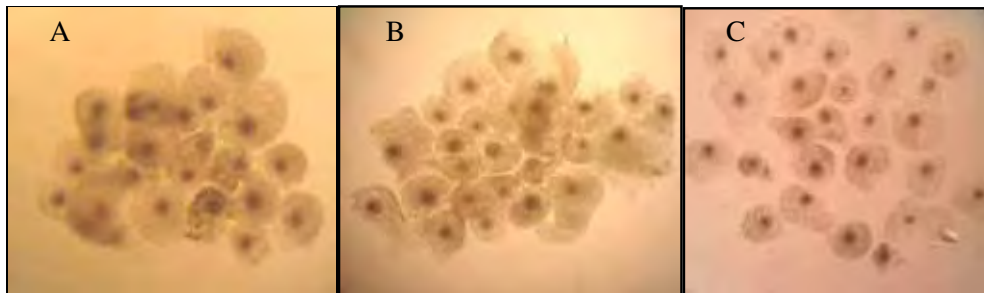


Figura 8. Oócitos bovinos maturados por 24 h, após infecção dos oócitos com BoHV-5, sendo: A: controle; B: BoHV-SFB e C: BoHV-PVA.

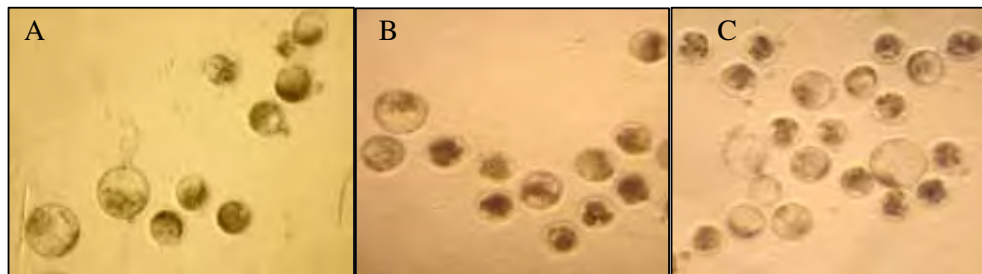


Figura 9. Embriões bovinos 168 h pf, após infecção dos oócitos com BoHV-5, sendo: A: controle; B: BoHV-SFB e C: BoHV-PVA.

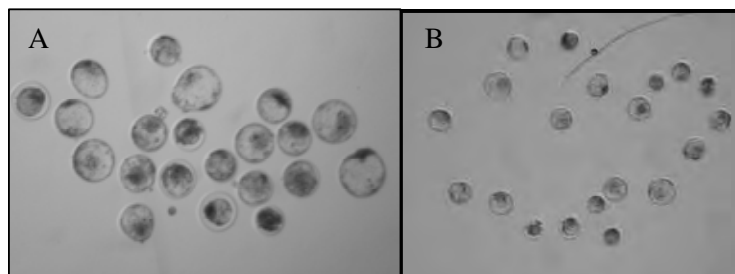


Figura 10. Embriões bovinos 168 h pós-fecundação, após infecção dos espermatozoides com BoHV-5, sendo: A: controle; B: infectado.

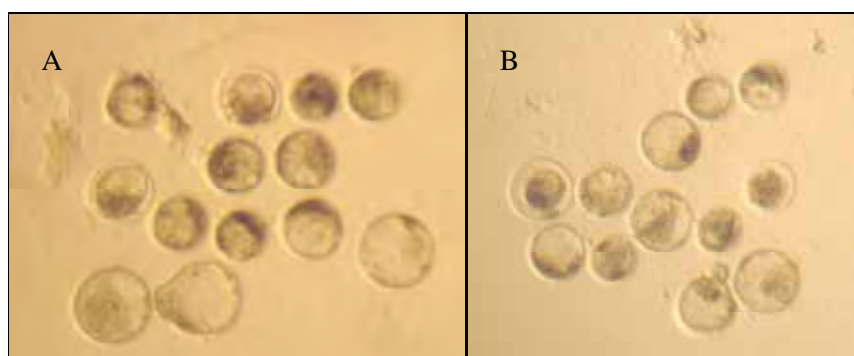


Figura 11. Embriões bovinos 168 h pós-fecundação, após infecção dos PZ com BoHV-5, sendo: A: controle; B: infectado.

2.4 Discussão

Observou-se que os oócitos, espermatozóides e embriões bovinos são susceptíveis à exposição pelo BoHV-5. A exposição experimental dos oócitos diminuiu a taxa de fecundação *in vitro*, entretanto este resultado não comprometeu o desenvolvimento embrionário e a produção *in vitro* de embriões. O vírus não afetou a fertilização e produção embrionária quando co-incubado com espermatozóides bovino. No entanto, zigotos infectados no dia 1 pós-fecundação apresentaram comprometimento no desenvolvimento embrionário com redução no número de embriões produzidos.

A ISH foi utilizada para detectar o BoHV-5 em oócitos, espermatozóides e embriões, e mostrou ser superior a outras técnicas, tais como PCR (WRENZYCKI et al., 2007), a qual é sensível, mas não possibilita identificar com precisão as células positivas *in situ* (SEGALÉS et al., 1999). De acordo com os resultados de ISH, a exposição experimental apresentou marcação positiva em todos os Experimentos (I, II e III), confirmando a eficiência do protocolo utilizado para a exposição experimental.

Estudos recentes sobre causas de alterações reprodutivas no rebanho bovino têm focado o *Herpesvirus* bovino tipo 1, por ser este o agente viral mais comumente conhecido na esfera reprodutiva (BROCK, 1998). Apesar da grande similaridade genômica com o BoHV-5, este encontra-se restrito a

enfermidades do sistema nervoso central. Portanto, o BoHV-1 está provavelmente mais adaptado ao sistema reprodutivo que o tipo 5. Tal fato pode explicar as diferenças encontradas entre os dados apresentados para o tipo 5 e os dados da literatura sobre o tipo 1. O título viral também pode influenciar os resultados, uma vez que, a diminuição da ligação do espermatozóide à zona pelúcida diminuiu com o aumento do título viral para o BoHV-1 (TANGHE et al., 2005). Embora o BoHV-5 apresente características que o difira do BoHV-1 é possível inferir que o título viral tenha influenciado nos resultados.

Guerin et al. (1990) usando espermatozóides infectados com BoHV-1 e oócitos expostos ao BoHV-1 para a produção *in vitro* de embrião demonstraram que o BoHV-1 não interfere na maturação oocitária, mas reduz significativamente a FIV. O BoHV-1 não é somente adsorvido aos gametas, como também prejudica a fertilização *in vitro*, possivelmente devido a efeito sobre a penetração espermática ou a interação com mecanismos intracelulares de fusão (GUERIN et al., 1990). Na verdade, o BoHV-1 pode reduzir até 60% da ligação do espermatozóide à zona pelúcida (VANROOSE et al., 2000). De acordo com Choi et al. (2008), o BoHV-1 pode modificar as propriedades elétricas da membrana plasmática através de alterações nos gradientes de catiônicos ou interações com as proteínas da membrana que modulam os canais iônicos. No presente estudo, observou-se que o BoHV-5 não afetou a morfologia e os movimentos dos espermatozóides, porém diminuiu a FIV dos oócitos infectados (BoHV-SFB). Esta observação pode estar relacionada com o mecanismo de fusão (oócito-espermatozóide) ou com as propriedades elétricas da membrana plasmática do oócito, entretanto o ponto é que o estresse imposto pelo vírus pode ter prejudicado a fecundação. O efeito negativo da infecção ocorreu apenas em oócitos maturados em meio contendo SFB, enquanto que oócitos infectados maturados em meio com PVA tiveram taxa de fertilização semelhante ao grupo controle. A viabilidade viral em meio com PVA é reduzida (MERTEN et al., 1999), provavelmente porque o PVA é composto de moléculas não protéicas, dificultando a adsorção viral. Além disso, PVA

pode fornecer maior estabilidade à membrana do oócito favorecendo a fecundação.

Durante a fecundação, os espermatozóides podem prontamente servir como um carreador do gene viral, especialmente para os vírus envelopados, como o *Herpesvirus* (NUSSBAUM et al., 1993). Tal fato foi confirmado com o BoHV-5, o qual foi transmitido verticalmente para os embriões através de espermatozóides infectados (Fig. 5). O BoHV-5 infectando o espermatozóide também provou que o gradiente de Percoll, o qual normalmente é utilizado para reduzir ou eliminar a carga viral no sêmen (MAKAREVICH et al., 2007) não é eficiente para a remoção do BoHV-5. Contudo, os embriões produzidos por espermatozóides infectados apresentaram desenvolvimento semelhante ao grupo controle, sendo obtido resultados similares às 144 e 168 h pf. Os oócitos infectados também transmitiram verticalmente o BoHV-5, sem comprometer o desenvolvimento dos embriões. Espermatozóides expostos ao BoHV-1 durante a FIV levaram a comprometimento no desenvolvimento embrionário (MAKAREVICH et al., 2007), além de reduzirem a taxa de clivagem e de formação de blastocistos (VANROOSE et al., 1999). A infecção em oócitos com BoHV-1 levou a diminuição na taxa de formação de blastocistos (BIELANSKI e DUBUC, 1994). O presente resultado pode ser divergente dos achados da literatura usando BoHV-1, devido a não adaptabilidade do BoHV-5 ao trato genital, característica esta intrínseca de cada tipo viral.

O desenvolvimento embrionário foi comprometido quando os prováveis zigotos foram co-incubado com o vírus às 24 h pós-fecundação. Este resultado provavelmente possa ser em decorrência da fase escolhida para a infecção, já que os prováveis zigotos foram infectados durante o estágio de bloqueio das oito células, em que o genoma do embrião é ativado. As informações genéticas materna são responsáveis pela manutenção do embrião até o estágio de oito células, a partir desta fase o genoma embrionário é ativado, e o desenvolvimento genético torna-se dependente da transcrição de proteínas utilizando as informações genéticas do embrião (YU et al., 2007). Tanto o vírus quanto o embrião necessitam das mesmas organelas para replicação e

desenvolvimento celular, respectivamente. Por conseguinte, problemas intrínsecos ou extrínsecos ocorridos nesta fase podem levar ao bloqueio do desenvolvimento embrionário (MEIRELLES et al., 2004).

Os resultados obtidos através da ISH confirmam que a zona pelúcida não é uma barreira eficaz para proteger oócitos e prováveis zigotos da infecção pelo BoHV-5. A zona pelúcida é comumente conhecida pelo seu importante papel na proteção de oócitos e embriões na etapa pré-implantacional contra a infecção viral, no entanto mostrou-se ineficaz na proteção contra o BoHV-1 (MAKAREVICH et al., 2007), o qual transpõe os grandes poros externo da zona pelúcida (180 a 200 nm) (VANROOSE et al., 2000).

No nosso estudo encontramos a primeira evidência de que gametas e embriões bovinos são susceptíveis ao BoHV-5. A exposição dos gametas não compromete a produção *in vitro* de embriões. Apesar da taxa de clivagem de oócitos cultivados em meio de maturação contendo SFB ter sido diminuída, ainda assim a produção de embriões foi mantida, sem diferir do grupo controle. Todavia, quando infecção ocorreu nos prováveis zigotos, o desenvolvimento dos embriões foi comprometido.

Por esta razão, as boas práticas de cultivo celular devem ser adotadas para garantir que a cultura, reagentes e equipamentos, bem como o ambiente de trabalho estejam livres de patógenos. Embora o BoHV-5 não tem sido considerado importante na esfera reprodutiva, este pode representar um problema sanitário emergente com consequências econômicas para a pecuária.

2.5 Conclusão

O BoHV-5 possivelmente pode ser transmitido diretamente e verticalmente durante a produção *in vitro* de embriões bovino, a partir de oócitos, espermatozóides e prováveis zigotos contaminados, sendo possível obter embriões viáveis após a infecção dos gametas. No entanto, a infecção no

dia 1 pós-fecundação compromete o desenvolvimento embrionário diminuindo o número de embriões produzidos.

2.6 Referências

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

Brock KV. Quality control for materials of animal origin used in embryo production and transfer. In: Stringfellow D.A., Seidel S.M. (eds.), *Manual of the International Embryo Transfer Society*, IETS, Savoy, IL, p.151-163, 1998.

Cardoso TC, Teixeira MCB, Fachin N, Camargo TL, Gomes DE, Junior ACO, Anselmo B. 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.

Cardoso TC, Ferrari HF, Luvizotto MCR, Arns CW. Bio-safety technology in production of bovine *Herpesvirus* type 5 (BoHV-5) using an alternative serum-free medium. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, v.3, p125-130 2007.

Choi B, Fermin CD, Comardelle AM, Haislip AM, Voss TG, Garry RF. Alterations in intracellular potassium concentration by HIV-1 and SIV. *Nef. Virol. J*, .v.19, n.5, p.60, 2008.

Chowdhury SI. 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.

Chowdhury SI, Lee BJ, Onderci M, Weiss ML, Mosier D. Neurovirulence of glycoprotein C (gC)-deleted bovine herpesvirus type-5 (BHV-5) and BHV-5 expressing BHV-1 gC in a rabbit seizure model. *Journal of NeuroVirology*, v.6, p.284-295, 2000.

D'Angelo M, Visintin JA, Richtzenhain LJ, Gonçalves RF. 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.

Ferrari HF, Luvizotto MCR., Rahal P, Cardoso TC. 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.

Gomes LI, Rocha MA, Souza JG, Costa EA, Barbosa-Stancioli EF. Bovine Herpesvirus 5 (BoHV-5) in bull semen: amplification and sequence analysis of the US4 gene. *Veterinary Research Communications*, v.27, p.495-504, 2003.

Gonçalves RF, Chapman DA, Bertolla RP, Eder I, Killian GJ. Pre-treatment of cattle semen or oocytes with purified milk osteopontin affects in vitro fertilization and embryo development. *Anim. Reprod. Sci*, v.108, p.375-83, 2008.

Guerin B, Le Guienne B, Allietta M, Harlay T, Thibier M. Effets de la contamination par le BHV-1 sur la maturation et fécondation in vitro des ovocytes des bovines. *Rec. Med. Vet. Ec. Alfort*, v.66, p.911–917, 1990.

Kirkland PD, Poynting AJ, Gu X, Davis RJ. Infertility and venereal disease in cattle inseminated with semen containing bovine herpesvirus type 5. *Veterinary Record*, v.165, p.111-113, 2009.

Makarevich AV, Pivko J, Kubovicova P, Slezakova M, Louda F, Development and viability of bovine preimplantation embryos after the in vitro infection with bovine herpesvirus-1 (BHV-1): immunocytochemical and ultrastructural studies. *Zygote*, v.15, p.307-315, 2007.

Makoschey B, Patel JR, Van Gelder PTJA. 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.

Meirelles FV, Caetano AR, Watanabe YF, Ripamonte P, Carambula SF, Merighe GK, Garcia SM. Genome activation and developmental block in bovine embryos. *Anim Reprod Sci*, v.82-83, p.13-20, 2004.

Merten OW, Kallel H, Manuguerra JC, Tardy-Panet M, Crainic R, Delpeyroux F, Van der Werf S, Perrin P. The new medium MDSS2N, free of any animal protein supports cell growth and production of various viruses. *Cytotechnology*, v.30, p.191-201, 1999.

Muylkens B, Thiry J, Kirten P, Schynts F, Thiry E. Bovine herpesvirus 1 infection bovine rhinotracheitis. *Vet. Res*, v.38, p.181–209, 2007

Rissi DR, Rech RR, Flores EF, Kommers GD, Barros CSL. Meningoencefalite por herpesvirus bovinos-5. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.27, n.7, p.251-260, 2007.

Nowshari MA, Brem G. The protective action of polyvinil alcohol during rapid freezing of mouse embryos. *Theriogenology*, v.53, n.5, p.1157-1166, 2000.

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

Robertson A, Nelson RE. Certification and identification of the embryo. In: Stringfellow DA, Seidel SM (eds.), *Manual of the International Embryo Transfer Society*, IETS, Savoy, IL, v.3, p.103–116, 1998.

Segalés J, Ramos-Vara JA, Duran CO, Porter A, Domingo M. Diagnosis of swine infectious diseases using in situ hybridization. *Swine Health Prod*, v.7, p.125-128, 1999.

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

Tanghe S, Vanroose G, Van Soom A, Duchateau L, Ysebaert MT, Kerkhofs P, Thiry E, Van Drunen Little-van den Hurk S, Oostveldt P, Nauwynck H. Inhibition of bovine sperm-zona binding by bovine herpesvirus-1. *Reproduction*, v.130, n.2, p.251-259, 2005.

Vanroose G, Nauwynck H, Van Soom A, Vanopdenbosch E, de Kruif A. Effect of bovine herpesvirus-1 or bovine viral diarrhea virus on development of in vitro-produced bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev*, v.54, p.255-63, 1999.

Vanroose G, Nauwynck H, Van Soom A, Thiry E, de Kruif A. Use of monoclonal antibodies to prevent the bovine herpesvirus-1 induced inhibition of sperm-zona binding. *Theriogenology*, v.53, p.322 (abstract), 2000.

Van Wagendonk-de Leeuw AM, Mullaart E, de Ross AP, Merton JS, den Daas JH, Kemp B, de Ruigh L. Effects of different reproduction techniques: AI, MOET, or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology*, v.53, p.575–597, 2000.

Wrathall A E, Simmons H A, Van Soom A. Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilization with virus-infected semen. *Theriogenology*, v.65, p.247-274. 2006

Wrenzycki C, Herrmann D, Niemann H. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology*, v.68, n.1, p.77-83, 2007.

Yu S, Vincent A, Opriessnig T, Carpenter S, Kitikoon P, Halbur PG. Quantification of PCV2 capsid transcript in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in vitro. *Vet. Microbiol*, v.123, p.34-42, 2007.

CAPÍTULO 3 – ARTIGO

Análise da Apoptose em Embriões Bovino Expostos Experimental ao *Herpesvirus* Bovino Tipo 5

RESUMO – O presente estudo foi conduzido para pesquisar marcadores de apoptose em embriões bovino após exposição experimental com *Herpesvirus* bovino tipo 5 (BoHV-5) em oócitos (Experimento I), espermatozóides (Experimento II) e prováveis zigotos (Experimento III). Cada experimento foi constituído de 150 oócitos bovino. A técnica de imunofluorescência indireta foi empregada para determinar os marcadores de apoptose: Anexina-V, TUNEL, caspase-2, -3 e Bcl-2. O teste de TUNEL revelou moderado sinal de imunomarcção no grupo controle (20% dos embriões não infectados) comparado com grupo II infectado (leve, 20%) e group III (ausente). A Anexina-V foi considerada como grau de marcação moderada no grupo controle e leve no grupo II (40% dos embriões analisados, respectivamente). O marcador Bcl-2 foi identificado em todos os embriões infectados pertencentes a todos os diferentes grupos. Nenhuma alteração na expressão da caspase-2 e -3 puderam ser detectadas nos grupos infectados. Embora, a atividade da caspase tenha sido revelada em grau moderado em 80% dos embriões analisados. Tendo em vista os resultados obtidos, a presença do BoHV-5 parece suprimir alguns passos da apoptose em embriões bovino sem acarretar prejuízo no desenvolvimento embrionário.

Palavras-chave: Anexina-V, Bcl-2, caspase-2, caspase-3 e TUNEL

Analysis of Apoptosis in Bovine Embryos Experimental Exposed to Bovine *Herpesvirus* Type 5

SUMMARY – The present study was conducted to search bovine embryos apoptosis markers after experimental exposition with bovine *Herpesvirus* type 5 (BoHV-5) on oocytes (Experiment I), on sperm (Experiment II) and on presumptive zygotes (Experiment III). Each experiment was constituted of 150 bovine oocytes. The indirect immunofluorescence assay was employed to determine apoptosis markers: Annexin-V, TUNEL, activity of apoptotic proteins such as caspase-2 and -3, and Bcl-2. The TUNEL assay revealed moderate immuno-labeling signals in control group (20% of non-infected embryos) compared with infected group II (light, 20%) and group III (absent). The Annexin-V was considered moderated labeled in control group and considered lightly labeled in group II (40% of analyzed embryos, respectively). The Bcl-2 marker was identified in all infected embryos belonging to all different groups. Finally, no alteration of caspase-2 and -3 expressions could be detected on infected groups. However, caspase activity revealed moderate levels in 80% of analyzed embryos. Take these results together, BoHV-5 presence seems to suppress some apoptosis pathways in bovine embryos accomplished by none interference on the embryonic development.

Key words: Annexin-V, Bcl-2, caspase-2, caspase-3 and TUNEL

3.1 Introdução

O potencial de desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro* é afetado por vários fatores, incluindo o sistema de cultura, a qualidade dos oócitos, a presença de SFB, a qualidade do sêmen e a presença de patógenos. O *Herpesvirus* bovino tipo 5 (BoHV-5) foi isolado recentemente de amostras de sêmen congelado, as quais foram utilizadas para programas de inseminação artificial (KIRKLAND et al., 2009). Silva-Frade et al. (2009) expôs experimentalmente oócitos, espermatozóides e prováveis zigotos bovinos ao BoHV-5 e comprovou a suscetibilidade destes ao vírus, além de ter observado que a presença do vírus não interferiu no número e qualidade dos embriões produzidos *in vitro*. Baseado nesses achados, é possível inferir que o BoHV-5 possui mecanismos para inibir a morte celular e, por algum mecanismo desconhecido, favorece a viabilidade da célula hospedeira. Talvez porque a célula hospedeira não é a célula de eleição para sua replicação.

Para prolongar a viabilidade celular e facilitar a replicação, os vírus desenvolveram múltiplos mecanismos para inibir a resposta da apoptose no hospedeiro. 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). Muitos dos principais eventos bioquímicos que ocorrem durante a apoptose são mediados por proteases (KIDD et al., 2000), a mais importante delas são as caspases (proteases cisteína dependentes de específico aspartato).

As características típicas de células apoptóticas incluem uma série de 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).

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 ligante indutores da apoptose (TRAIL). A ligação do receptor TNF resulta na formação do complexo sinalizador da indução da morte (DISC) (KISCHKEL et al., 1995) necessários para a ativação das caspases iniciadoras. A ativação intrínseca da apoptose é desencadeada após a translocação dos membros pró-apoptóticas 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 e afetar o início 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 caspases (ALNEMRI et al., 1996). As caspases efetoras e iniciadoras avaliadas neste experimento foram caspase-2 e -3, respectivamente. As caspases existem no celular como pró-caspases inativas ou zimogênio e é necessária a sua clivagem para serem ativadas.

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 divididos em dois subgrupos: aqueles que exercem efeitos anti-apoptóticos (por exemplo, Bcl-2) e aqueles que são pró-apoptóticas (por exemplo, Bax, Bad e Bid) (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 de citocromo c da mitocôndria (YANG et al., 1997).

A apoptose inicial é conhecida como resultado da perda de simetria dos fosfolípidios da membrana e exposição da PS. A anexina-V tem alta afinidade pela PS e, portanto, serve como uma sonda sensível para detecção da apoptose inicial (MARTIN et al., 1995).

O método de TUNEL foi utilizado para a detecção de fragmentos de DNA pela marcação *in situ* da 3'-OH do DNA fragmentado de DNA pela enzima

deoxinucleotídeo transferase terminal (TdT), na presença do nucleotídeo marcado com fluorescência, nucleotídeo trifosfato deoxiuridina bromolato (BrdU) (GAVRIELI et al., 1992; GORCZYCA et al., 1993).

Em resumo, o objetivo principal do presente estudo foi avaliar a apoptose por meio de marcadores específicos em embriões bovinos, após a exposição experimental pelo BoHV-5 em oócitos, espermatozóides e prováveis zigotos detectada pela técnica de TUNEL e imunohistoquímica para visualização da expressão de moléculas pró e anti-apoptóticas (descritas como Anexina-V e Bcl-2, respectivamente) e atividade das caspases (caspase-2 e -3).

3.2 Material e Métodos

O delineamento experimental inclui exposição experimental em gametas e prováveis zigotos bovinos ao BoHV-5 (Silva-Frade et al., 2009) e subsequente análise dos marcadores de apoptose através do teste de TUNEL, Anexina-V, caspase-2, -3 e Bcl-2 pelo uso da imunofluorescência indireta. Este estudo foi dividido em três experimentos: oócitos expostos ao BoHV-5 foram fecundados com sêmen livre do patógeno no Experimento I, enquanto oócitos livre do patógeno foram fertilizados por espermatozóides expostos ao BoHV-5 no Experimento II. Experimento III testou os prováveis zigotos expostos ao BoHV-5.

3.2.1 Titulação Viral

Amostras do *Herpesvirus* bovino tipo 5 (BoHV-5), isoladas de bovinos acometidos pela infecção na região de Araçatuba, São Paulo, Brasil, em 2007 (FERRARI et al., 2007) foi propagado em células “Madin Darby Bovine Kidney” (MDBK, ATCC) e cultivado em “minimum essential medium” (MEM). A dose infectante da cultura de tecidos por 50 µL (TCID₅₀) da amostra de vírus foi determinada pela técnica de neutralização em células MDBK (CARDOSO et

al., 2007). Alíquotas da amostra viral (100 µL), com $10^{3,3}$ TCID₅₀/50µL foram mantidas em freezer a -86°C até o uso.

3.2.2 Experimento I

Este experimento avaliou a presença de oócitos bovinos com BoHV-5 durante a produção *in vitro* de embriões. Os oócitos utilizados foram obtidos a partir de ovários de coletados em abatedouro (Brasfrigo, Birigui, SP, Brasil) e transportados para o laboratório em 1 h *post mortem*. Complexos cumulus-oócitos (COC) foram recuperados por aspiração dos folículos de 2 a 6 mm de diâmetro. Foram selecionados apenas os COC com várias camadas de células do cumulus compactas e citoplasma homogêneo. Estes foram divididos em gotas de 15 a 20 oócitos cada, para serem utilizados nos experimentos.

As gotas com os oócitos foram divididas em três grupos (9 gotas/grupo), como segue: (1) oócitos maturados sem a presença do vírus (controle); (2) oócitos expostos ao BoHV-5 e maturados em meio contendo SFB (BoHV-FBS) e (3) oócitos expostos ao BoHV-5 maturados em meio contendo álcool polivinílico (BoHV-PVA).

O meio de maturação foi preparado com 100 µL TCM-199 (GIBCO-BRL, Grand Island, NY, E.U.A.) suplementado com 10% FBS (Nutricell®, Campinas, SP, Brasil) ou 1 mg/mL de PVA (cat # P8136 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A.), 2,2 mg/mL de bicarbonato de sódio, 0,02 mg/mL de piruvato de sódio, 0,05 mg/mL de sulfato de gentamicina, 0,5 mg/mL de FSH (Pluset®, Calier, Barcelona, Espanha) e 50 mg/mL de LH (Lutropin-V®, Inc. Bioniche, Belleville, ON, Canadá). O meio de PVA é uma alternativa sintética para o SFB na cultura de oócitos, com função semelhante, mas menos susceptível a contaminação (SEIDEL et al., 1990; MERTEN et al., 1999; NOWSHARI e BREM, 2000). Os oócitos selecionados foram lavados em meio de maturação (MM) e transferidos para gotas contendo 100 µL de MM e levados para estufa por 24 h a 39°C e 5% de CO₂ em ar.

Os oócitos dos grupos de BoHV-FBS e BoHV-PVA foram infectados experimentalmente pela co-incubação com 10 µL de BoHV-5 ($10^{3,3}$ TCID₅₀) por 1 h a 39 °C e 5% de CO₂ em ar. Os oócitos foram, posteriormente, lavados três vezes em MM livre de vírus e transferidos para novas gotas de maturação para seguir o desenvolvimento *in vitro*. O grupo controle foi submetido ao mesmo protocolo, exceto a exposição ao BoHV-5. Após 24 h de maturação, os oócitos foram transferidos para gotas contendo meio de fertilização *in vitro*. Trinta oócitos foram analisados pela técnica de ISH e não seguiram o desenvolvimento.

Os espermatozóides utilizados para a fecundação foram obtidos a partir de palhetas (0,5 mL) congeladas de um único touro (*Bos indicus*) mantido em central de inseminação artificial no Brasil. O sêmen foi centrifugado em gradiente de Percoll (45% e 90%; Nutricell®, Campinas, SP, Brasil) a 700 X g por 20 min. O pellet de espermatozóides obtido foi lavado em meio TALP (Tyrode albumina lactato e piruvato suplementado com 6 mg/mL de BSA) a 200 X g por 5 min. O sedimento foi diluído em meio de fecundação (meio TALP suplementado com 3 mg/mL de heparina e solução de PHE: 2 mM de penicilamina, 1 mM de hipotaurina e 250 mM de epinefrina, Sigma-Aldrich®) a fim de obter uma concentração final de 1×10^6 espermatozóides/mL em cada gota de 100 µL.

Para a fertilização *in vitro* (FIV), os oócitos e espermatozóides foram co-incubados em meio FIV por 20 h, sob as mesmas condições utilizadas para MIV. Em seguida, os PZ foram colocados em meio de cultura *in vitro* (CIV) até ao dia 7 (dia 0 = dia da fertilização). Após a produção de blastocistos no dia 7 pós-fecundação, foram utilizados apenas os embriões classificados como grau 1 (excelente) ou 2 (bom) segundo as normas da IETS [24]. Trinta embriões foram utilizados para cada teste (TUNEL, Anexina-V, caspase-2, -3 e Bcl-2).

3.2.3 Experimento II

Para avaliar os efeitos da infecção dos espermatozóides com BoHV-5 sobre a produção *in vitro* de embriões bovinos, a FIV foi realizada com sêmen

exposto e não exposto ao BoHV-5 (9 gotas por grupo). A obtenção dos oócitos, bem como o preparo do sêmen para FIV foram realizados conforme descrito no Experimento I.

Para a exposição dos espermatozóides, duas palhetas de sêmen foram descongeladas e homogeneizadas em um mesmo tubo e, posteriormente, divididas em duas partes iguais de 0,5 mL. Uma parte da amostra foi co-incubada com 50 µL de BoHV-5 (1:10, como para os oócitos, $10^{3,3}$ TCID₅₀) por 1 h a temperatura ambiente e protegido da luz (BoHV-SPTZ). A outra parte da amostra foi submetida ao mesmo procedimento, exceto a presença do vírus (controle). O sêmen foi submetido ao gradiente de Percoll, centrifugado e diluído para fecundar os oócitos. A taxa de fecundação e o desenvolvimento embrionário foram avaliados como no Experimento I. Trinta embriões foram utilizados para cada teste (TUNEL, Anexina-V, caspase-2, -3 e Bcl-2).

3.2.4 Experimento III

Os mesmos procedimentos utilizados no Experimento I foram empregados para a obtenção dos oócitos e seleção dos espermatozóides. No dia 1 pós-fecundação, as gotas com os prováveis zigotos foram divididas em dois grupos (9 gotas por grupo): (1) prováveis zigotos exposto ao BoHV-5 (controle) e (2) prováveis zigotos livre da infecção viral (BoHV-PZ). Os prováveis zigotos com zona pelúcida intacta foram co-incubados com BoHV-5, nas mesmas condições utilizadas para a exposição dos oócitos. Após o período de adsorção (1 h), os prováveis zigotos foram lavados por três vezes em meio SOF (fluido do oviduto sintético) e cultivados em gotas de cultivo livre do vírus por 7 dias, sob as mesmas condições utilizadas para a maturação e fecundação. O desenvolvimento embrionário foi avaliado como no Experimento I e II. Trinta embriões foram utilizados para cada teste (TUNEL, Anexina-V, caspase-2, -3 e Bcl-2).

3.2.5 Teste de TUNEL

Os embriões (n=30 por grupo) foram lavados três vezes em PBS (tampão fosfato salina, pH = 7,4) e fixados em lâmina com paraformaldeído a 4% por 24 horas à 4°C. Em seguida, as amostras foram lavadas com PBS e permeabilizadas com proteinase K (10 mg/mL) por 15 minutos à temperatura ambiente. A técnica de TUNEL foi realizada seguindo as recomendações do fabricante (A35126 APO-BrdU™ TUNEL Assay Kit, Invitrogen™). Resumidamente, os embriões foram lavados duas vezes em tampão de lavagem (ABO-BrdU Kit) e incubados a 4°C por 12 h com a solução de marcação do DNA fragmentado (ABO-BrdU Kit) contendo a enzima TdT, BrdUTP, tampão de reação TdT e água destilada. Após duas lavagens em tampão de enxágue (ABO-BrdU Kit), os embriões foram incubados por 30 minutos protegidos da luz e a temperatura ambiente com solução de anticorpo (anticorpo monoclonal anti-BrdU conjugado a fluoresceína e tampão de enxágue). O controle positivo consistiu de embriões de bovinos pré-incubadas com 1µL/mL de DNase por 1 h a 37°C. O controle negativo foi incubado sem a enzima TdT. Posteriormente, todas as amostras foram contra-coradas, com 6,25 mg/mL de iodeto de propídio (IP) por 15 minutos a temperatura ambiente antes de montar as lâminas com as lamínulas. O IP cora os núcleos das células vivas em vermelho, enquanto os núcleos fragmentados foram corados em verde pela fluoresceína do teste de TUNEL.

3.2.6 Imunofluorescência Indireta para Anexina-V, caspases e Bcl-2

Os embriões foram fixados e permeabilizados conforme descrito para o teste de TUNEL. Após o pré-tratamento com proteinase K a 4°C, as lâminas foram incubadas por 12 h com os anticorpos primários (Anexina-V, caspase-2, -3 e Bcl-2 anti-mouse) diluídos em DAKO (S3022, diluente para anticorpos, América do Norte Dako®). Veja a Tabela 1 para detalhes dos anticorpos primários. Em seguida, as lâminas foram incubadas por 24 h a 4°C com o anticorpo secundário (FITC-goat IgG anti-mouse - 626511, Zymed®). A omissão

do anticorpo primário foi utilizada como controle negativo para os diferentes anticorpos.

Tabela 1 – Detalhes dos anticorpos primários utilizados na imunofluorescência

	Antibody	Product N.	Dilution	Species	Supplier
Annexin-V number	Monoclonal anti- annexin-V	A 8604	1:4000	Mouse	Sigma- Aldrich
Caspase-3 number	Anti- caspase 2 (ICH1 L)	C 8487	1:400	Rabbit	Sigma- Aldrich
Caspase-3 number	Anti- caspase 3, Active	C 7349	1:1000	Rabbit	Sigma- Aldrich
Bcl-2 number	Monoclonal anti-Bcl-2	B 9804	1:500	Mouse	Sigma- Aldrich

3.2.7 Semi quantificação e análise dos dados

Os diferentes parâmetros estudados no presente experimento, tais como TUNEL, Anexina-V, caspase-2, -3 e Bcl-2 foram semi-quantificados de acordo com a intensidade da imunomarcação. Os resultados foram expressos em escores com base na intensidade, classificados como se segue: grau I (leve), II (moderado) e III (severo). O resultado negativo foi interpretado como ausência de marcação e classificados como grau 0. Toda a avaliação foi realizada por dois observadores realizando a análise subjetiva. As imagens foram processadas no microscópio Axio Imager A.1 (Carl Zeiss Oberkochen, Alemanha) conectado a câmera AxioCam MRc (Carl Zeiss) e as micrografias foram processadas no “software” Axiovision 4.7 (Carl Zeiss). O número de embriões classificados entre grau I, II e III após o teste de TUNEL, anexina-V, caspase-2, -3 e Bcl-2 foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e Dun. Diferenças estatísticas foram consideradas para $P < 0,05$.

3.3 Resultados

Os resultados da coloração do teste de TUNEL, Anexina-V, caspase-2, -3 e Bcl-2 em embriões bovinos após a exposição durante o período maturação *in vitro*, fecundação, cultivo são representados na Figura 1A, B e C, respectivamente. Menor grau de apoptose ($P<0,05$) foi observada em embriões do grupo BoHV-FBS, enquanto os grupos BoHV-PVA, BoHV-SPTZ e BoHV-PZ apresentaram ausência de marcação para o teste de TUNEL. Os embriões não-infectados (grupo controle) mostraram grau moderado de apoptose para o teste de TUNEL.

A fragmentação do DNA no núcleo dos embriões foi revelada como uma marcação verde de fluorescência após o teste de TUNEL (Figura 2A e D). A intensidade dos sinais positivos foram comparados com os sinais visualizados nos embriões, que a enzima TdT foi omitida (Figura 2E) e com embriões previamente incubada com a DNase bovina (Figura 2F).

A proporção de marcadores de apoptose foi significativamente menor ($P<0,05$) nos embriões expostos em relação ao grupo controle. Além disso, a Anexina-V foi considerada estatisticamente diferente para a taxa de apoptose precoce entre o controle (não-infectado; grau moderado, Figura 2G), BoHV-FBS (grau leve, Figura 2H) e BoHV-PVA, BoHV-SPTZ e BoHV-PZ (grau 0, Figura 2I).

O grau de imunomarcação para ambas caspase-2 e -3 foi negativo em embriões dos grupos BoHV-FBS, BoHV-PVA, BoHV-SPTZ e BoHV-PZ, em relação ao grupo controle (não infectado, Figura 2J). A expressão das caspases foi detectada em embriões cultivados sem a presença do vírus (Figura 2L). A expressão da proteína Bcl-2 foi detectada em todos os embriões de bovinos infectados pertencem aos grupos BoHV-FBS, BoHV-PVA, BoHV-SPTZ e BoHV-PZ (Figura 2M). Os embriões não infectados foram considerados negativos para a marcação do Bcl-2. Todos os experimentos foram repetidos por seis vezes para cada marcador e 30 embriões foram analisadas em cada grupo de tratamento.

A

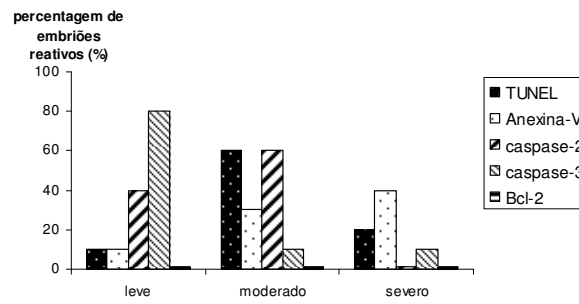


Figure 1. Análise semi-quantitativa de acordo com a intensidade da imunomarcacão para os testes de TUNEL, Anexina-V, caspase-2, -3 e Bcl-2. A: experimento I, B: experimento II, C: experimento III e D: grupo controle.

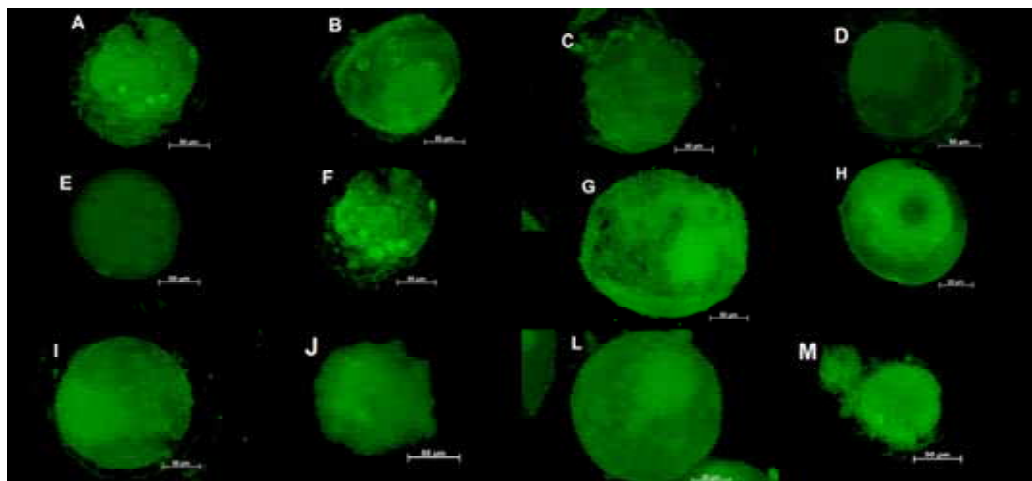


Figura 2. TUNEL: A. BoHV-SFB, B. BoHV-PVA, C. BoHV-SPTZ, D. BoHV-PZ, E. controle negativo e F. controle positivo; Anexina-V: G. grupo controle, H. BoHV-SFB, I. BoHV-PVA, BoHV-SPTZ e BoHV-PZ; caspase-3: J. grupo controle e L. grupos infectados, Bcl-2: M. grupos infectado.

3.4 Discussão

O sucesso da replicação do vírus na célula requer uma extraordinária cascata de 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 um processo fisiológico ativo da condensação da cromatina, redução do volume celular e formação de vesículas na membrana chamada corpos apoptóticos, resultando em fragmentos e eliminação de células desnecessárias e danificados (SCHWARTZMAN e CIDLOWSKI, 1993). Considerando a complexidade extrema do processo de apoptose, é preciso associar diferentes testes para determinar o grau de apoptose nas células.

Em muitos modelos bem conhecidos, a apoptose pode ser dividida em quatro estágios: estímulo, sinalização, regulação e execução. Antes da célula atingir o último estágio da regulação, a apoptose é considerada um processo reversível (MORITA e TILLY, 1999).

Em todos os grupos de embriões expostos (Experimento I, II e III), a marcação para o teste de TUNEL foi observada, indicando que a presença do BoHV-5 interfere na integridade do DNA. A avaliação da apoptose pelo teste de TUNEL permite a observação *in situ* das células apoptóticas por meio da marcação de fragmentos do DNA gerados pela atividade da DNase endógena durante o processo de apoptose.

É possível diferir a apoptose inicial da tardia através da imunomarcação da Anexina-V, a qual se liga a PS exposta nos processos de apoptose inicial, sendo detectada nos embriões dos grupos controle e expostos ao BoHV-5. Segundo Oberhammer et al. (1994) a exposição da PS é um processo inicial da apoptose, precedendo a condensação nuclear e o desarranjo do citoesqueleto intracelular e dos constituintes da matriz nuclear (THOMSON, 2001).

A Anexina-V foi classificada em grau leve e moderado nos embriões pertencentes aos grupos expostos (Experimento I, II e III) e houve predomínio de grau moderado e severo nos embriões não infectados.

Em geral o grau de apoptose observado nos embriões eqüinos, suínos e bovinos produzidos *in vitro* foi considerado baixo (POMAR et al., 2005). Além disso, um maior grau de apoptose tem sido observado em embriões bovinos produzidos *in vitro* quando comparado aos produzidos *in vivo* (POMAR et al., 2005).

É sabido que os vírus podem produzir fatores pró e anti-apoptóticos 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 permeabilização da membrana mitocondrial, impedindo ou retardando a liberação de citocromo c (BOYA et al., 2004; THOMSON, 2001).

As caspases podem ser caracterizadas como iniciadoras ou efetoras da cascata das caspases (SALVESON e DIXIT, 1997; COHEN, 1997; THOMBERRY e LAZEBNIK, 1998).

As caspase-1, -2, -4 e -9 apresentam domínios cujos alvo são os complexos de iniciação internos (apoptossoma) ou moléculas adaptadoras que

interagem com receptores da superfície celular. Em contraste, as caspase-3, -6 e -7 precisam ser ativadas por outras caspases e agem como efetoras, clivagem os substratos que são parte integrante da estrutura celular. Além disso, Exley e Warmer (1999) descreveram as caspases iniciadoras (caspase-2) e efetoras (caspase-3) em oócitos e embriões de camundongos pré-implantação.

No presente estudo as caspase-2 e -3 não foram visualizadas em embriões bovinos infectados com BoHV-5. A ausência dos antígenos das caspase-2 e -3 em todos os embriões pertencentes aos grupos expostos, sugere que a presença do BoHV-5 deve interferir na expressão destas proteínas, as quais foram observadas nos embriões não expostos ao vírus, ambas caspases iniciadora (caspase-2) e efetora (caspase-3) foram descritas em oócitos e embriões pré-implantacionais de camundongos (EXLEY e WARMER, 1999).

O Bcl-2 é uma proteína integral da membrana localizada principalmente na membrana externa da mitocôndria (YANG et al., 1997) e age na liberação do citocromo c. Um importante mecanismo que o vírus utiliza para suprimir a ativação das caspases é a inibição da permeabilização da membrana mitocondrial, impedindo a liberação de citocromo c. Nessa situação, o vírus pode infectar uma célula e não ser detectado, evitando assim a destruição da célula hospedeira e permitindo sua replicação (PAROLI et al., 2000).

A expressão do Bcl-2 em oócitos e embriões bovinos foi observada em maior grau em oócitos e zigotos no estágio de quatro células quando comparado a blastocistos e embriões bovinos de péssima qualidade (MELKA et al., 2009). Nos grupos estudados foi possível observar a presença do Bcl-2 nos embriões expostos com predomínio do grau leve, entretanto não houve marcação desta proteína nos embriões do grupo controle (não exposto ao vírus). Ou seja, o vírus desenvolveu mecanismos para impedir ou retardar o avanço da apoptose na célula hospedeira, provavelmente por produzir proteínas que mimetizam a função do Bcl-2, ou por estimularem a produção

desta proteína. O mecanismo exato de como o BoHV-5 age contra o processo da apoptose ainda permanece desconhecido.

Tais achados trazem uma grande preocupação com o controle de qualidade dos embriões bovinos produzidos *in vitro*, uma vez que a infecção viral é silenciosa e na maioria das vezes não compromete o desenvolvimento embrionário.

3.5 Conclusão

A contaminação experimental de oócitos, espermatozóides e prováveis zigotos com BoHV-5 aumentou a viabilidade de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Contudo, vários mecanismos estão envolvidos na inibição da resposta apoptótica no embrião bovino e a maioria deles permanecem desconhecidos.

3.6 Referências

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

Alnemri, F.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., et al. human ICF/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, v.87, p.171, 1996.

Antunes, G., Chaveiro, A., Santos, P., Marques, A., Jin, H.S., Silva, F.M. Influence of apoptosis in bovine embryo's development. *Reprod Dom Anim*, doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01131.x, 2008.

Boya, P., Pauleau, A.L., Poncet, D., Gonzalez-Polo, R.A., Zamzami, N., Kroemer, G. Viral proteins targeting mitochondria: controlling cell death. *Biochim Biophys Acta*, v.1659, p.178-189, 2004.

Cardoso, T.C., Ferrari, H.F., Luvizotto, M.C.R., Arns, C.W. Bio-safety technology in production of bovine *Herpesvirus* type 5 (BoHV-5) using an alternative serum-free medium. *Am J Biochem Biotech*, v.3, p.125-30, 2007.

Carrido, C., Galluzzi, I., Brunet, M., Puig, P.E., Didelot, C., Kroemer, G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*, v.13, p.1423-33, 2006.

Cohen, G.M. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, v.326, p.1-16, 1997.

Cory, S., Adams, J.M. Matters of life and death: programmed cell death at cold spring harbor. *Biochim Biophys Acta*, v.1377, p.25-44, 1998.

Exley, G.L., Warmer, C.M. Zygotic genomic activation. In: Knobil E, Neill JD (eds.), *Encyclopedia of Reproduction*, New York: Academic Press, v.4, p.1041-1046, 1999.

Ferrari, H.F., Luvizotto, M.C.R., Rahal, P., Cardoso, T.C. Detection of bovine *Hesperivirus* 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.335-40, 2007.

Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, v.119, p.493-501, 1992.

Gorczyca, W., Traganos, F., Jesionowska, H., Darzynkiewicz, Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res*, v.207, p.202-205, 1993.

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

Hay, S., Kannourakis, G. A time to kill: viral manipulation of the cell death program. *Journal of General Virology*, v.83, p.1547-64, 2002.

Kidd, V.J., Lahti, J.M., Teitz, T. Proteolytic regulation of apoptosis. *Semin Cell Dev Biol*, v.11, p.191-201, 2000.

Kirkland, P.D., Poynting, A.J., Gu, X., Davis, R.J. Infertility and venereal disease in cattle inseminated with semen containing bovine Herpesvirus type 5. *Veterinary Record*, v.165, p.111-113, 2009.

Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (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.

Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P., McGahon, A.J., Rader, J.A., Van Schie, R.C., Laface, D.M., Green, D.R. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general features of apoptosis regard less of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*, v.182, p.1545-1556, 1995.

Melka, M., Rings, F., Hölker, M., Tholen, E., Havlicek, V., Besenfelder, U., Schellander, K., Tesfaye, D. 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*, doi: 10.1111/j.1439-0531.2009.01463.x, 2009.

Merten, O.W., Kallel, H., Manuguerra, J.C., Tardy-Panet, M., Crainic, R., Delpeyroux, F., Van der Werf, S., Perrin, P. The new medium MDSS2N, free of any animal protein supports cell growth and production of various viruses. *Cytotechnology*, v.30, p.191-201, 1999.

Morita, Y., Tilly, J.L. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Dev Biol*, v.213, p.1-17, 1999.

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

Oberhammer, F.A., Hochegger, K., Froschl, G., Tiefenbacher, R., Pavelka, M. Chromatin condensation during apoptosis is accompanied by degradation of lamin A + B, without enhanced activation of cdc2 kinase. *J Cell Biol*, v.126, p.827-37, 1994.

Paroli, M., Schiafella, E., Di Rosa, F., Barnaba, V. Persisting viruses and autoimmunity. *Journal of Neuroimmunology*, v.107, p.201-204, 2000.

Pomar, F.J., Teerds, K.J., Kidson, A., Colenbrander, B., Tharasanit, T., Aguilar, B., Roelen, B.A. Differences in the incidence of apoptosis between in vivo and in vitro produced blastocysts of farm animal species: a comparative study. *Theriogenology*, v.63, n.8, p.2254-2268, 2005.

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

Robertson, A., Nelson, R.E. Certification and identification of the embryo. In: Stringfellow DA, Seidel SM (eds.), Manual of the International Embryo Transfer Society, IETS, Savoy, IL, v.3, p.103-116, 1998.

Salveson, G.S., Dixit, V.M. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*, v.91, p.443-446, 1997.

Seidel, G.E. Jr., Elsdon, R.P., Brink, Z. Cryopreservation of bovine embryos in media with chemically defined macromolecules. *Theriogenology*, v.33, p.322(abstract), 1990.

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., Martins Júnior, A., Borsanelli, A.C., Cardoso, T.C. Effects of bovine Herpesvirus type 5 on development of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology*, doi:10.1016/j.theriogenology.2009.09.016, 2009.

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

Thomberry, N.A., Lazebnik, Y. Caspases: enemies within. *Science*, v.281, p.1312-1316, 1998.

Vaux, D.L., Haecker, G., Strasser, A. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell*, v.76, p.777-779, 1994.

Yang, J., Lui, X., Bhala, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.I., Jones, D.P., Wang, X. 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.

APÊNDICES

Tabela 1 – Classificação dos oócitos segundo De LOOS *et al.* (1989).

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

Tabela 2 – Componentes utilizadas na produção *in vitro* de embriões

Componentes	Laboratório	Código
SFB	Gibco	BRL 1043-028
Penicilina	Sigma	P7794
Gentamicina	Sigma	G1264
17-β estradiol	Sigma	E2758
Piruvato	Sigma	P3662
Óleo Mineral	Sigma	M8410
Glicina	Sigma	G6388
Alanina	Sigma	A7627
BSA	Sigma	A6003
Percoll (90% e 45%)	Nutricell	-
Heparina	Sigma	H3149
Penicilamina	Sigma	P4875
Hipotaurina	Sigma	H1364
Epinefrina	Sigma	E4250
CaCl ₂ .2H ₂ O	Sigma	C7902
KCl	Sigma	P5405
KH ₂ PO ₄	Sigma	P5655
MgCl ₂	Sigma	M2393
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sigma	M2643
NaCl	Sigma	S5886
NaHCO ₃	Sigma	S4019
NaH ₂ PO ₄	Sigma	S5011
Fenol Red	Sigma	P5530
Meio 199	Sigma	M2154
Ácido láctico 60%	Sigma	L4263

Tabela 3 – Meios para lavagem dos oócitos (ML)

Componentes	50 mL
PBS	45 mL
SFB	5 mL

Tabela 4 – Meio de maturação (MM)

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

Tabela 5 - Meio para lavagem espermática (TALP sperm)

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

Tabela 6 - Meio de fertilização (TALP stock)

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

Tabela 7 – Meio de cultivo (SOF)

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