ANDREA GIANNOTTI GALUPPO

**Avaliação da sensibilidade de zigotos murinos à *Brucella abortus*
para o estabelecimento de um modelo experimental em estudos de
interações embriões-patógenos**

São Paulo

2005

ANDREA GIANNOTTI GALUPPO

**Avaliação da sensibilidade de zigotos murinos à *Brucella abortus*
para o estabelecimento de um modelo experimental em estudos de
interações embriões-patógenos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador(a):

Profa.Dra.Magali D'Angelo

São Paulo
2005

Elza
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
8/06/05

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1531
FMVZ

Galuppo, Andrea Giannotti

Avaliação da sensibilidade de zigotos murinos à *Brucella abortus* para o estabelecimento de um modelo experimental em estudos de interações embriões-patógenos / Andrea Giannotti Galuppo. – São Paulo : A. G. Galuppo, 2005.
74 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2005.

Programa de Pós-graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Magali D'Angelo.

1. Reprodução animal. 2. Embrião. 3. Brucelose animal. 4. Modelos animais. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da sensibilidade de zigotos murinos a *Brucella abortus* para o estabelecimento de um modelo experimental para estudos de interações embrião-patógeno", protocolo nº520/2004, utilizando 50 camundongos, sob a responsabilidade da Profª Drª Magali D'Angelo (Instituto Biológico), está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Evaluation of mouse zygotes sensibility to *Brucella abortus* for establishing an experimental model for studies of embryo/microorganism interactions", protocol number 520/2004, utilizing 50 mice, under the responsibility of Profª Drª Magali D'Angelo (IB/USP), agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 21 de outubro de 2004

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: GALUPPO, Andrea Giannotti

Título: Avaliação da sensibilidade de zigotos murinos à *Brucella abortus* para o estabelecimento de um modelo experimental em estudos de interações embriões-patógenos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof.Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof.Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho em primeiro lugar, ao meu AVÔ Oswaldo Giannotti, de quem, por vontade divina ou por pura genética, herdei a paixão pela pesquisa, e pelas suas mãos tive a oportunidade de trabalhar com o que mais me realiza. Dedico também esse trabalho à minha Mãe, a meu Pai e minha Irmã pelo apoio e compreensão, e por sempre acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Biológico de São Paulo, e ao seu diretor Dr Antonio Batista Filho, que forneceu todas as condições necessárias para a realização desse trabalho.

Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pela oportunidade de realizar um sonho.

À CULTILAB, principalmente ao Dr Walter Pinto, Dr Acassio e Cláudio por acreditarem neste trabalho e colaborarem com grande parte do material utilizado.

À Callier e a Tecnopec por terem acreditado na qualidade do nosso trabalho.

À Profa.Dra. Magali D'Angelo (Maga), amiga (sempre!) e orientadora (quando necessário), responsável por despertar em mim a paixão pela pesquisa, e que apesar das minhas idas e vindas, sempre me acolheu de volta.

À Dona Maria Luiza técnica do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Biológico sempre executando seu trabalho da melhor forma possível, garantindo a qualidade da pesquisa ali realizada.

Ao Prof.Dr. Marco Roberto Broug de Mello pelo seu profissionalismo e qualidade técnica e por sua inestimável ajuda no ensinamento das técnicas utilizadas na realização desse trabalho.

Às amigas do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Biológico, Gisele, Christiane, Nair e Rosimeire pela amizade e por estarem sempre prontas a ajudar.

À Maria de Lourdes Senedezi da Seção de Produção de Vacinas do Instituto Biológico pela ajuda imprescindível na execução desse trabalho.

À Dra Maria Maia Braggio pesquisadora responsável pela Seção de Criação de Animais do Instituto Biológico, por ter fornecido as condições necessárias para a obtenção dos melhores resultados possíveis no manejo dos animais.

À Dona Rita e a Graça funcionárias do Biotério do Instituto Biológico pelo cuidado na manutenção e manejo dos animais.

À pesquisadora Simone Miyashiro da Seção de Bacteriologia do Instituto Biológico por ter sido uma grande amiga, uma pessoa maravilhosa e acima de tudo uma excelente profissional.

Ao André D'Angelo Campello pela paciência e pelas fotografias maravilhosas

Às amigas eternas Juliana, Erica, Nadeje e Vera pelas intermináveis horas de “terapia em grupo”, por estarem sempre prontas a consolar, ajudar, aconselhar e até me dar bronca quando necessário.

Ao Dr Sidney Glina, Dr Jonathas Borges Soares, Dr Nelson Antunes Junior, Roberta Wonchockier e Françoise Elia Mizhari por terem acreditado em mim, por tudo que pude aprender com vocês, e por terem me dado toda a liberdade para execução desse trabalho.

Aos meus companheiros inseparáveis John e Luigi

Aos animais, meu respeito e gratidão, sem os quais jamais poderia ter realizado esse trabalho.

RESUMO

GALUPPO, A. G. **Avaliação da sensibilidade de zigotos murinos à *Brucella abortus* para o estabelecimento de um modelo experimental em estudos de interações embriões-patógenos.** [Sensitivity evaluation of mouse zygotes to *Brucella abortus* for establishment of an experimental model to pathogen-embryo interaction studies]. 2005. 74 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Os objetivos desse trabalho foram avaliar *in vitro* a sensibilidade de zigotos murinos à *Brucella abortus*, assim como a eficácia das lavagens seqüenciais e do tratamento com tripsina, padronizados pela *International Embryo Transfer Society*, na sua remoção e/ou inativação, a fim de estabelecer um modelo acessível para o estudo de interações embriões-patógenos. Para a coleta dos zigotos, foram utilizados camundongos fêmeas (Swiss Webster), púberes, nulíparas, 6-8 semanas de idade, acasaladas com machos inteiros da mesma linhagem, após superestimulação ovariana. Para a infecção foi utilizada a bactéria *B.abortus* 1119.3. A suspensão de bactérias foi preparada no momento da inoculação, na diluição de 10^6 bactérias/ml. Os zigotos obtidos foram separados em controle e infectados. A infecção dos zigotos foi feita com 30 μ l da suspensão de bactérias, e após 24h e 96h foram analisados quanto à morfologia e taxa de clivagem. Os procedimentos de lavagem seqüencial e tratamento com tripsina foram realizados após 24h. Para detecção da bactéria após os procedimentos de lavagem, as amostras foram inoculadas em cultura de bactérias e submetidas ao teste de reação em cadeia pela polimerase (PCR). Uma amostra da última gota de lavagem de cada grupo também foi testada. Para análise estatística dos resultados foi utilizado o teste do χ^2 . No grupo controle não foram verificadas alterações morfológicas, já no infectado foi possível verificar a presença

de blastômeros irregulares, falha de divisão, citoplasma com granulação e aspecto degenerativo. As taxas de clivagem obtidas foram de 77,4% (controle) e 59,2% (infectados) (χ^2 de 0,001674; $p < 0,05$) após 24h e após 96h de infecção 14,5% (controle) e 7% (infectados) (χ^2 de 0,141616; $p < 0,05$). Não foi possível isolar *B.abortus* em cultura após os procedimentos de lavagem para ambos os grupos. As amostras do grupo controle apresentaram-se negativas na PCR. Já no grupo infectado foram obtidos resultados positivos e negativos, para os embriões e para a alíquota da última gota de lavagem dos grupos tratados com a lavagem seqüencial. Foi verificada apenas em uma amostra a presença de embriões positivos para a *B.abortus* com amostra da última gota de lavagem negativa. Para outras duas amostras os embriões apresentaram-se livres de *B.abortus*, mas foram detectadas na alíquota da última gota de lavagem. Apenas em uma amostra foram obtidos resultados negativos tanto para os embriões, quanto para o meio de lavagem. Os resultados da PCR para os grupos infectados tratados com tripsina foram positivos para praticamente todas as amostras, contendo embriões ou apenas da alíquota da última gota de lavagem, com exceção dos embriões de uma amostra que apresentaram-se negativos. As novas tecnologias desenvolvidas em reprodução animal promovem manipulação invasiva do embrião. Portanto, tratamentos preconizados para a remoção de patógenos podem não ser eficazes. O risco a ser considerado é da presença de patógenos associados à zona pelúcida ou nas proximidades, que possam ser introduzidos, ou ter sua entrada facilitada no embrião. Considerando os dados apresentados, torna-se clara a importância do desenvolvimento de um modelo animal para estudos de interações embriões-patógenos, a fim de se evitar a transmissão e disseminação de doenças.

Palavras-chave: Reprodução animal. Embrião. Brucelose animal. Modelos animais.

ABSTRACT

GALUPPO, A. G. **Sensibility evaluation of mouse zygotes to *Brucella abortus* for establishment of an experimental model to pathogen-embryo interaction studies** [Avaliação da sensibilidade de zigotos murinos à *Brucella abortus* para o estabelecimento de um modelo experimental em estudos de interações embriões-patógenos]. 2005. 74 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

The aim of this study was evaluate *in vitro* mouse zygotes sensitivity to *Brucella abortus*, such as the embryo washing procedure and trypsin treatment, recommended by the *International Embryo Transfer Society*, efficacy in its removal and/or inactivation, with the purpose of established an accessible model for embryo-pathogen interaction studies. The female mice (Balb C) aging 6 to 8 weeks were superovulated and mated with fertile males of the same strain, then the zygote retrieval was performed. The bacterial suspension was prepared in the moment of inoculation and the dilution was 10^6 brucellas/ml. The zygotes were divided in control and infected groups (30 μ l of the bacterial suspension); after 24h and 96h their morphology and viability were analised. The zygotes of each group were washed sequentially or treated with trypsin after 24h exposition. To verify the presence of *B. abortus* pos-washing the zygotes and a sample of the last wash drop of each group were tested on bacterial culture system and polimerase chain reaction (PCR). The statistical analyses was performed with the χ^2 test. Morphological changes were not observed at the control group, but the infected one presented irregular blastomeres, clivage defective, granular cytoplasm with degenerative like morphology. The clivage rates were 77,4% (control) and 59,2% (infected) (χ^2 de 0,001674; $p < 0,05$) after 24h and after 96h 14,5% (control) e 7% (infected) (χ^2 de 0,141616; $p < 0,05$). Our results showed that the bacterial culture presented negative growing for all groups tested.

The control group presented only negative results on PCR analyses. The infected group presented positive and negative results on PCR, for embryos or last wash drop sample, submitted to the sequential washing procedure. Positive embryos were found in just one sample with the last wash drop negative. To two other samples embryos presented negative PCR results but positive at the last wash drop. Negative results for embryos and last wash drop was found in just one sample. The PCR results for the groups treated with trypsin were almost all positives, for embryos or last wash drop samples, except one embryo sample that presented negative. The recent developed reproductive technologies promote excessive manipulation of the embryo. Therefore, preexistent procedures for microorganisms' removal could not be efficient. The preeminent risk to be considered here is the potential or probability of the presence of pathogens associated with or in proximity to the zona pelúcida, which could be introduced, or facilitated its entrance on embryo. According to the data presented become clear the importance of develop a model for studies of embryo-pathogen interactions, with the aim of avoid disease transmission.

Key words: Embryos. Animal brucellosis. Animal Reproduction. Animal model.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BVDV	vírus da diarréia viral bovina
DNA	ácido desoxirribonucléico
eCG	gonadotrofina coriônica eqüina
FIV	fertilização <i>in vitro</i>
g	força gravitacional
h	horas
hCG	gonadotrofina coriônica humana
ICSI	injeção intracitoplasmática de espermatozóide
IETS	Sociedade Internacional de Transferência de Embriões
M	molar
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
μL	microlitro
μm	micrometro
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia pela polimerase
pH	potencial hidrogênionico
PIV	produção de embriões <i>in vitro</i>
PMS	soro de égua prenhe
rpm	rotações por minuto
SFB	soro fetal bovino

TCM 199	meio para cultura de tecidos
TE	transferência de embriões
ufc	unidade formadora de colônia
UI	unidade internacional
ZP	zona pelúcida

Obs: Visto terem seu uso consagrado na literatura técnica algumas abreviaturas e siglas seguem as iniciais de sua grafia no idioma inglês.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	DOENÇA	16
1.2	ETIOLOGIA	18
1.3	TRANSMISSÃO DE DOENÇAS INFECCIOSAS VIA TÉCNICAS CONCEPTIVAS ARTIFICIAIS ANIMAIS	20
1.4	TRANSMISSÃO DE <i>Brucella abortus</i> VIA TÉCNICAS CONCEPTIVAS ARTIFICIAIS ANIMAIS	25
2	OBJETIVOS	29
3	REVISÃO DA LITERATURA	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	ANIMAIS	35
4.2	SUPERESTIMULAÇÃO OVARIANA	36
4.3	COLETA DOS ZIGOTOS	37
4.4	BACTÉRIA E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	39
4.5	INFEÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ZIGOTOS MURINOS <i>IN VITRO</i>	39
4.6	AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA E VIABILIDADE DOS ZIGOTOS MURINOS APÓS A INFECÇÃO POR <i>Brucella abortus</i>	40
4.7	LAVAGEM DOS ZIGOTOS MURINOS <i>IN VITRO</i>	40
4.8	MÉTODOS DE DETECÇÃO DA <i>Brucella abortus</i>	42
4.8.1	Detecção das bactérias nas amostras em meio de cultivo	42
4.8.2	Detecção das bactérias nas amostras pela reação em cadeia pela polimerase (PCR)	43
4.8.2.1	Extração do DNA das amostras	43
4.8.2.2	Amplificação	44
4.8.2.3	Eletroforese	45
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA DA TAXA DE CLIVAGEM	46
5	RESULTADOS	47
5.1	ANÁLISE DA MORFOLOGIA DOS ZIGOTOS APÓS EXPOSIÇÃO À <i>Brucella abortus</i>	47
5.2	ANÁLISE DA VIABILIDADE DOS ZIGOTOS MURINOS NA PRESENÇA DE <i>Brucella abortus</i>	50
5.3	DETECÇÃO DA <i>Brucella abortus</i> EM CULTURA DE BACTÉRIA APÓS	

	OS PROCEDIMENTOS DE LAVAGEM E TRATAMENTO COM TRIPSINA.....	51
5.4	DETECÇÃO DA <i>Brucella abortus</i> PELA PCR APÓS OS PROCEDIMENTOS DE LAVAGEM E TRATAMENTO COM TRIPSINA.	51
6	DISCUSSÃO	57
7	CONCLUSÕES	66
	REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, com cerca de 196 milhões de animais, e também, apresenta-se em posição de destaque na produção mundial de embriões, particularmente pela expansão no uso da fertilização *in vitro* em bovinos (ALVARENGA, 2005; GRAZIANO, 2005). Entretanto, para o ano de 2005, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento sofreu um corte de 63% na verba destinada à defesa sanitária (GRAZIANO, 2005). Tendo isso em vista, torna-se importante o desenvolvimento de métodos eficientes e de baixo custo, para o estudo das interações embriões-patógenos, para auxiliar no controle da transmissão de doenças, como a Brucelose bovina, via técnicas conceptivas artificiais.

1.1 DOENÇA

A Brucelose bovina é uma zoonose infecto-contagiosa de evolução crônica, causada pela *Brucella abortus* (*B. abortus*) (AGUIAR et al., 2001; BOSSERAY; PLOMMET, 1988). A enfermidade possui distribuição mundial, acarretando severos prejuízos de ordem econômica, além de ter importância em saúde pública, em virtude da possibilidade de infecção do homem (RAMIREZ-ROMERO, 1998; ROTH et al., 2003). O último levantamento da situação da brucelose bovina em nível nacional foi realizado em 1975, quando foi estimada a porcentagem de animais soropositivos em 4% na Região Sul, 7,5% na Região Sudeste, 6,8% na Região Centro-Oeste, 2,5% na

Região Nordeste e 4,1% na Região Norte. Outros levantamentos foram realizados nos anos seguintes, mas apenas em alguns estados. Os dados de notificações oficiais indicam que a prevalência de animais soropositivos se manteve entre 4% e 5% no período de 1988 a 1998 (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUARIA E ABASTECIMENTO, 2001).

A brucelose em humanos é caracterizada por uma grande quantidade de sintomas, incluindo febre, sudorese, anorexia, perda de peso, fadiga e depressão. Complicações localizadas envolvem os sistemas: cardiovascular, gastrointestinal, geniturinário, hepatobiliar, osteoarticular, pulmonar e nervoso. Sem o tratamento adequado com antibióticos, alguns pacientes desenvolvem uma síndrome crônica de brucelose, muito semelhante à síndrome crônica de fadiga (ROTH et al., 2003; WHO, 1997).

Na espécie bovina, a sintomatologia da enfermidade está principalmente relacionada à esfera reprodutiva. Possui período de incubação variável, dependendo do grau de maturidade sexual do animal infectado e também da existência de prenhez, em geral, períodos de incubação mais longos são verificados em animais mais jovens (BLAHA, 1995). Nas fêmeas a brucelose caracteriza-se por abortamento no terço final da prenhez, endometrite crônica, metrite e retenção de placenta, subfertilidade e infertilidade, infecção congênita do recém nascido (AGUIAR et al., 2001; BOSSERAY; PLOMMET, 1988; DEL FAVA et al., 2003) e diminuição da produção de leite (ROTH et al., 2003). Nos machos bovinos a patogenicidade do agente está associada à lesão testicular e das glândulas acessórias, manifestada por quadros de orquite, epididimite e vesiculite, levando freqüentemente os animais infectados a subfertilidade e/ou

infertilidade. No aparelho locomotor causa bursites e espondilites (AGUIAR et al., 2001; BOSSERAY; PLOMMET, 1988; DEL FAVA et al., 2003; RADOSTITIS et al., 2000).

De acordo com o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose os testes diagnósticos que devem ser utilizados são: a prova do antígeno acidificado tamponado, como teste de triagem. Os animais reativos devem ser submetidos a um teste confirmatório, o 2-Mercaptoetanol, que é um teste mais específico. A prova de fixação de complemento deve ser utilizada para efeitos de trânsito internacional e para casos inconclusivos ao teste do 2-Mercaptoetanol e, o teste do anel em leite (Ring Test) deve ser utilizado para monitoramento de propriedades certificadas (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUARIA E ABASTECIMENTO, 2001).

1.2 ETIOLOGIA

As *Brucellas sp* são bacilos, gram-negativos, parasitas intracelulares, medindo de 0,6-1,5 μm de comprimento por 0,5-0,7 μm de largura e que crescem em meios artificiais em condições microaerófilas (BLAHA, 1995; WHO, 1997). Dentro do gênero *Brucella* são reconhecidas seis espécies: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. neotomae* e *B. canis* (RAMIREZ-ROMERO, 1998; WHO, 1997). Essa classificação foi realizada com base na diferença de patogenicidade e preferência por determinados hospedeiros. As espécies de *Brucella* e seus diferentes biotipos são normalmente

distinguidos por testes diferenciais baseados em sorotipagem, sensibilidade à corantes, necessidade de CO₂, produção de H₂S e propriedades metabólicas (WHO, 1997).

As principais espécies patogênicas de distribuição mundial são *B. abortus*, responsável pela brucelose bovina, *B. melitensis*, que é o principal agente etiológico da brucelose de ovinos e caprinos, e *B. suis*, responsável pela brucelose em suínos (ROTH et al., 2003; WHO, 1997). As espécies *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. neotomae* e *B. suis* podem ocorrer tanto na forma rugosa quanto lisa, expressando lipopolissacarídeos lisos ou rugosos como antígenos de superfície. Já as espécies *B. ovis* e *B. canis* são naturalmente rugosas expressando como antígeno de superfície lipopolissacarídeos rugosos (WHO, 1997).

Como todas as espécies de Brucellas, a *B. abortus* sobrevive por longo período no ambiente (até 120 dias), principalmente na presença de matéria orgânica (excrementos, resíduos de abortamento, leite, etc). Porém, apresentam-se susceptíveis a todos os desinfetantes comerciais, sendo inativadas de forma rápida e segura (BLAHA, 1995).

As principais fontes de infecção são novilhas ou vacas em trabalho de parto, uma vez que o feto e os produtos do abortamento são responsáveis pela liberação de Brucellas no ambiente (STRINGFELLOW; HOWELL; SCHNURRENBERGER, 1982). A infecção em animais susceptíveis durante a gestação, por *B. abortus*, ocorre nos trofoblastos placentários, particularmente no retículo endoplasmático rugoso (DETILLEUX; DEYOE; CHEVILLE, 1990). Essa mesma localização da infecção foi verificada para outras espécies de Brucellas cultivadas em células não-citopatogênicas *in vitro* (RAMIREZ-ROMERO, 1998).

A principal via de contágio é a oral, por ingestão de material contaminado, mas também, pode ser transmitida por via aérea através de aerossóis, e por contato direto, como nos casos de monta natural (BLAHA, 1995). Novilhas ou vacas adultas portadoras assintomáticas, são as principais responsáveis pela manutenção da doença em um rebanho e até pela sua introdução em um novo rebanho (BLAHA, 1995). Touros infectados também são responsáveis pela transmissão do agente, principalmente pelo plasma seminal contaminado (PHILPOTT, 1993; STRINGFELLOW; HOWELL; SCHNURRENBERGER, 1982).

1.3 TRANSMISSÃO DE DOENÇAS INFECCIOSAS VIA TÉCNICAS CONCEPTIVAS ARTIFICIAIS ANIMAIS

O advento de técnicas bem sucedidas para a criopreservação de embriões impulsionou a comercialização da transferência (TE) e da produção *in vitro* de embriões (PIV) (STRINGFELLOW et al., 1986). Do ponto de vista epidemiológico, as novas tecnologias representam um desafio para o controle da transmissão de doenças, pois produzem novos ambientes e manipulação excessiva do material, possibilitando uma maior chance de contaminação e disseminação de patógenos (STRINGFELLOW; GIVENS; WALDROP, 2004). São de particular interesse os agentes infecciosos associados com tecidos ovarianos, tubáricos e uterinos, bem como contaminantes externos (STRINGFELLOW, 1998).

Para que ocorra a transmissão de doenças infecciosas por embriões produzidos *in vivo* ou *in vitro*, o agente infeccioso deve estar presente na concentração mínima requerida para a infecção de uma receptora susceptível. As principais fontes de contaminação de embriões são: os gametas e seus fluidos associados, células somáticas utilizadas na maturação e/ou manutenção dos embriões, materiais de origem animal utilizados para suplementação dos meios de cultura (ex: soro fetal bovino e albumina sérica bovina), contaminação do pessoal, de instrumentos ou equipamentos, meios de lavagem e/ou transporte de embriões (STRINGFELLOW; GIVENS; WALDROP, 2004). Quando os materiais são coletados em abatedouro, esse ambiente, em associação com o ambiente do laboratório também pode ser considerado como fonte de contaminação (STRINGFELLOW; GIVENS, 2000a).

Os cuidados com a higiene da fazenda, controle sanitário nos abatedouros e uso de equipamentos de biossegurança nos laboratórios auxiliam no controle de disseminação de doenças infecciosas originárias de humanos, animais e do ambiente (MAPLETOFT; STOOKEY, 1998; NIBART; MARQUANT-LE GUIENNE; HUMBLLOT, 1998; SCHIEWE, 1998; STRINGFELLOW; GIVENS, 2000b). Obviamente, uma contaminação em elevada escala é prejudicial, assim como a infecção por agentes citopatogênicos, porém ambas são autolimitantes, uma vez que são facilmente detectadas. Nesses casos, pode ocorrer falha na fertilização, ou degeneração embrionária, o que anularia o risco de transmissão da doença, pois os embriões seriam descartados (BIELANSKY, 1997; D'ANGELO et al., 2003a). Já, uma contaminação com uma baixa concentração de patógenos, ou com microrganismos não citopatogênicos é potencialmente mais preocupante, pois sua presença não será facilmente detectada, uma vez que pode não afetar a fertilização e desenvolvimento dos embriões e, portanto

retardar a ação de controle de contaminação facilitando a disseminação do agente (BIELANSKY; JORDAN, 1996; STRINGFELLOW; GIVENS, 2000b).

Um outro ponto importante no controle da transmissão de doenças está relacionado ao fato de que, normalmente, o estado sanitário da doadora sujeita à aspiração transvaginal de oócitos geralmente é conhecido (STRINGFELLOW; GIVENS, 2000a), entretanto, não há histórico de possíveis doenças clínicas ou subclínicas de doadoras comerciais abatidas, que são usadas para produção em massa de embriões. Usualmente, os ovários e tubas uterinas são colhidos ao acaso de animais abatidos, aparentemente saudáveis e armazenados em recipientes para transporte e posterior processamento no laboratório. A maioria dos sistemas usados para produzir embriões por fertilização *in vitro* (FIV) requer meios complexos com algum tipo de soro ou células de suporte, que provêm um ambiente favorável para o desenvolvimento embrionário (D'ANGELO et al., 2003a ; GONÇALVES; D'ANGELO; GALUPPO, 1997; KRISHER; BAVISTER, 1998), mas que podem permitir com facilidade a introdução e manutenção de microrganismos no sistema (D'ANGELO; GALUPPO; GONÇALVES, 2002; GALUPPO; D'ANGELO; GONÇALVES, 1998).

O sêmen pode também ser considerado como potencial fonte de contaminação de microrganismos não-patogênicos e patogênicos na produção de embriões *in vivo* e também em sistema de PIV (STRINGFELLOW; GIVENS, 2000b). A coleta do sêmen quando realizada corretamente, em geral apresenta-se livre de contaminação, porém não pode ser considerada estéril, sendo recomendado o uso de antibióticos. É importante ressaltar que alguns microrganismos são resistentes a antibióticos, e que, em alguns casos, os antibióticos podem não ser eficientes na eliminação de uma contaminação. Existem relatos de contaminação de embriões PIV por amostras de

sêmen contaminadas com: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus sciuri*, *Acinetobacter cacti*, *Pantoea agglomerans* ou *Flavobacterium spp* (STRINGFELLOW; GIVENS, 2000b).

Em relação ao risco de transmissão de doenças por transferência de embriões produzidos *in vivo* ou *in vitro*, os resultados de pesquisas realizadas com embriões com zona pelúcida (ZP) intacta, mostram que o risco de transmissão de patógenos é menor quando comparado com animais vivos (GUERIN et al., 1997). Entretanto, muitas mudanças ocorreram em relação às tecnologias empregadas na manipulação dos embriões até o momento da transferência, que tornaram mais complexo o controle do status epidemiológico do embrião. A avaliação do potencial epidemiológico das técnicas de PIV ainda não está completa, e precauções definitivas ainda não foram estabelecidas. Até o momento, na maioria dos estudos ligados ao potencial de transmissão de doenças infecciosas pela TE ou PIV, são usados embriões com ZP intacta (D'ANGELO et al., 2002; D'ANGELO et al., 2003b; PHILPOTT, 1993; STRINGFELLOW; HOWELL; SCHNURRENBERGER, 1982). Entretanto, procedimentos como bissecção, sexagem, clonagem de embriões e FIV, podem resultar em dano ou remoção da mesma, propiciando oportunidades para contaminação e infecção do sistema de PIV. Conseqüentemente, pesquisas sobre o potencial de transmissão de doenças infecciosas por embriões submetidos a essas técnicas são de extrema importância para o desenvolvimento de protocolos seguros para certificação sanitária desses embriões (BIELANSKY, 1997). Assim, têm sido levantadas também questões concernentes aos riscos de transmissão de doenças infecciosas pela

transferência de embriões que tenham sido submetidos a essas técnicas (STRINGFELLOW, 1998).

O papel que a PIV possa exercer na transmissão ou controle de patógenos tem sido estudado através de várias abordagens. Em primeiro lugar a abordagem “*in vivo-in vivo*”, pela qual os embriões são colhidos de doadoras infectadas e transferidos para receptoras livres da infecção, que são monitoradas quanto ao surgimento do agente infeccioso. Uma outra abordagem seria a “*in vivo-in vitro*”, pela qual os embriões são coletados de doadoras infectadas e então pesquisados para aquele agente *in vitro*. Em terceiro lugar a abordagem “*in vitro-in vivo*”, pela qual embriões de vacas saudáveis são expostos ao agente *in vitro* e então transferidos para receptoras sadias, monitoradas para evidência de infecção subsequente a TE. E, por fim, a abordagem “*in vitro-in vitro*”, pela qual os embriões de doadoras saudáveis são expostos ao agente *in vitro* e então testados *in vitro* (STRINGFELLOW; GIVENS; WALDROP, 2004; WRATHALL; SUTMÖLLER, 1998).

Nesse trabalho, utilizamos a abordagem *in vitro-in vitro*, que permite um maior controle do sistema experimental, possibilitando uma análise mais detalhada das interações de embriões-patógenos. Considerando que todas as abordagens experimentais mencionadas acima sejam importantes, teoricamente, aquelas que usam embriões derivados de doadoras infectadas se assemelham ao que acontece em condições naturais. Infelizmente, o número de embriões usados nos experimentos *in vivo* é freqüentemente muito baixo, o que não permite se extrair conclusões significativas sobre as possibilidades de transmissão da doença, o que torna o estudo *in vitro* de extrema importância (WRATHALL; SUTMÖLLER, 1998).

Juntamente com os diferentes tipos de abordagens citadas acima, têm sido objeto de exame, além do potencial para exposição dos embriões a patógenos específicos, a natureza das interações embriões-patógenos e os efeitos das lavagens e de tratamento com tripsina sobre as interações embriões-patógenos (D'ANGELO et al., 2003b; D'ANGELO et al., 2003c; D'ANGELO et al., 2004; GALUPPO et al., 2002; SINGH et al., 1982; SINGH, 1983; STRINGFELLOW et al., 1998). Tendo isso em vista, é de extrema importância o desenvolvimento de um modelo *in vitro* para avaliação da sensibilidade de embriões e oócitos a diferentes patógenos, possibilitando o conhecimento dos efeitos citopatogênicos causados por diferentes microrganismos nesses tipos de células.

1.4 TRANSMISSÃO DE *Brucella abortus* VIA TÉCNICAS CONCEPTIVAS ARTIFICIAIS ANIMAIS

O uso de técnicas de reprodução animal, como por exemplo, a TE, já foi considerado de grande potencial no auxílio do controle de disseminação de doenças. Embriões são considerados livres de patógenos se as doadoras ou o ambiente uterino for comprovado como livre de qualquer infecção. O potencial de exposição de embriões à *B. abortus* é baixo, porém não pode ser desconsiderado (STRINGFELLOW; HOWELL; SCHNURRENBERGER, 1982; STRINGFELLOW et al., 1986).

A tendência da *B. abortus* em se localizar no útero de bovinos levou à preocupação com a possibilidade de sua transmissão por procedimentos de reprodução

animal. É conhecido que, em animais infectados, após o parto ocorre emissão de fluidos uterinos contendo *B. abortus* (STRINGFELLOW et al., 1983; STRINGFELLOW et al., 1985). Hawk et al. (1958) foram capazes de isolar *B. abortus* dos meios de lavagem uterinos juntamente com a recuperação de um embrião de 16 dias. Stringfellow et al. (1983) estudaram a possibilidade de utilização de animais infectados como doadoras de embriões, e aparentemente encontraram que a *Brucella* não permanece por longo período no útero, o que diminuiria o risco de infecção dos embriões. Entretanto, a literatura mostra relato de presença de *B. abortus* no útero de animais no momento inicial da superestimulação para posterior TE. Segundo Stringfellow et al. (1985) houve aumento da concentração de Brucellas em um animal naturalmente infectado após o uso de hormônios para superestimulação. Foi observado, que em alguns animais a contaminação uterina por *B. abortus* pode persistir até 90 dias após o abortamento. Como a coleta subsequente de embriões normalmente é realizada com menos de 90 dias do abortamento, o risco de transmissão não pode ser descartado (MALLEK et al., 1984; STRINGFELLOW et al., 1983).

Uma série de experimentos e triagens em campo foram realizados, nos quais foram coletados embriões de doadoras sabidamente contaminadas por diferentes patógenos, dentre os quais a *B. abortus*. Após a coleta os embriões foram submetidos às lavagens seqüenciais, tratados com tripsina e transferidos para receptoras saudáveis, as quais foram testadas quanto à presença de doença, assim como a progênie, e em nenhum dos casos houve transmissão da doença (STRINGFELLOW; GIVENS, 2000b). Porém, em um outro estudo, embriões ovinos com a ZP intacta foram expostos *in vitro* aos seguintes patógenos: vírus da diarréia viral bovina (BVDV), *B. abortus*, *B. ovis* e *Campylobacter fetus*. Os embriões foram então lavados e analisados

quanto à presença dos patógenos. Para o BVDV o tratamento em conjunto das lavagens seqüenciais com o uso de anticorpos anti-virus da diarreia viral bovina foi efetivo na remoção e/ou inativação do agente (STRINGFELLOW.; GIVENS, 2000a) Resultados semelhantes foram obtidos com o uso das lavagens para a remoção do *Campylobacter fetus* (GUERIN et al., 1988), entretanto, na ausência de antibióticos, as lavagens não se mostraram eficientes na remoção dos embriões de *B. abortus* e *B. ovis* (RIDDELL et al., 1989; WOLFE et al., 1988). Além disso, Riddell et al. (1990) demonstraram que, quando embriões foram expostos *in vitro* à *B. ovis*, submetidos aos procedimentos de lavagem e transferidos, houve soroconversão em 57% das receptoras.

Apesar desses dados, muitos autores sugerem que embriões com ZP intacta não podem ser considerados como vetores da transmissão de *B. abortus*. Segundo Philppott (1993) existem inúmeras evidências de que a transmissão de *B. abortus* por transferência de embriões com ZP intacta não seja possível, quando a sua manipulação é realizada corretamente. Stringfellow et al. (1983) afirma que embriões com ZP intacta não são capazes de transmitir *B. abortus* para as receptoras. Apelo e Kanagawa (1989) citam em seu trabalho que, após os procedimentos de lavagem, embriões com ZP intacta não transmitem *B. abortus* durante o procedimento de transferência.

Entretanto, deve-se notar que, todos os autores enfatizam que o risco de transmissão de *B. abortus* é mínimo quando se trata de embriões com ZP intacta. Porém, com o desenvolvimento e uso comercial de tecnologias como a ICSI, a clonagem e técnicas para criação de animais transgênicos, entre outras, ocorrem danos na estrutura da ZP (STRINGFELLOW; GIVENS; WALDROP, 2004). Certamente, essas técnicas provocam uma grande mudança no ambiente de PIV, o que possibilita

oportunidades para a amplificação e disseminação de patógenos, como a *B. abortus*, anteriormente considerados sem risco de transmissão.

2 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivos:

1. Avaliar, *in vitro*, a sensibilidade de zigotos murinos à *Brucella abortus* cepa 1119.3;
2. avaliar a eficácia das lavagens seqüenciais e do tratamento com tripsina, padronizados pela *International Embryo Transfer Society* (IETS), na remoção e/ou inativação da *Brucella abortus* de zigotos murinos infectados *in vitro*;
3. estabelecer um modelo *in vitro* acessível e de baixo custo para o estudo de interações embriões-patógenos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Há mais de um século, foi observada pela primeira vez, a fecundação de um óvulo de estrela do mar com a posterior formação da primeira célula do futuro embrião. Os invertebrados marinhos foram objeto das primeiras pesquisas porque, ao contrário dos mamíferos, a fecundação ocorre externamente ao sistema reprodutor da fêmea. Nos mamíferos, ainda no final do século XIX, surgiu o primeiro relato sobre a possibilidade de se cultivar embriões *in vitro* (GONÇALVES et al., 2002). Cientistas interessados no estudo de aspectos relacionados à reprodução e ao desenvolvimento de organismos superiores iniciaram os primeiros ensaios com a finalidade de estabelecer metodologias que permitissem a manipulação de embriões.

Os primeiros trabalhos experimentais em embriologia de mamíferos foram realizados com coelhos, tendo em vista suas características biológicas favoráveis, como o tamanho relativamente grande do óvulo, o que facilita a manipulação, e a ovulação induzida pelo acasalamento, fato de elevada conveniência para determinação precisa da idade dos embriões (HOGAN; CONSTANTINI; LACY, 1986). Alguns desses trabalhos iniciais incluem uma descrição acurada dos estágios embrionários pré-implantacionais, que foram descritos em 1875 por Van Beneden, transferência de embriões para o oviduto, descritos em 1890 por Heape, realização de um filme das sucessivas clivagens de uma mórula em cultura realizado por Lewis e Gregory em 1929, entre outras observações (HOGAN; CONSTANTINI; LACY, 1986). Porém, as dificuldades relativas à compreensão das necessidades nutricionais e, as limitações

impostas pelas características físico-químicas dos meios utilizados consistiam em barreiras técnicas a serem rompidas (PASSOS et al., 2002).

Somente no início do século XX, juntamente com o desenvolvimento da química, que permitiu a produção de meios de melhor qualidade, a embriologia passou por progressos significativos, com profundos reflexos no sucesso de coleta e cultivo de embriões (PASSOS et al., 2002). Finalmente, na década de 50, Wesley Whitten propôs uma nova formulação para os meios de cultura, que passaria a ser utilizada tanto na coleta quanto no cultivo dos embriões, ampliando significativamente o número de embriões implantados com sucesso. Whitten desenvolveu um meio utilizando uma solução de Krebs-Ringer bicarbonato, suplementada com albumina sérica bovina, o qual foi capaz de promover as clivagens de um embrião de camundongo com uma célula até o estágio de blastocisto (HOGAN; CONSTANTINI; LACY, 1986). Juntamente com Whitten, Ralph Brinster, iniciou uma linha de pesquisa para determinar quais as necessidades nutricionais de um embrião em cultura e, durante o processo, desenvolveu a técnica da cultura de embriões em microgotas utilizada atualmente em vários laboratórios no mundo, tanto na área animal, quanto humana (HOGAN; CONSTANTINI; LACY, 1986).

Essas novas condições de cultura, apesar de muito simples, permitiram a expansão do desenvolvimento das técnicas de produção de embriões *in vitro*. Marco na história da FIV, Chang (1959) relatou o nascimento do primeiro mamífero (coelho) gerado a partir dessa técnica. Em seu trabalho, obteve para transferência, 36 embriões gerados a partir de 266 oócitos de coelhos. Os embriões foram transferidos para 6 receptoras, das quais 4 geraram 15 filhotes saudáveis (42% de taxa de implantação). A partir daí, até o final dos anos 70, vários outros relatos da obtenção de FIV seguida de

nascimentos de filhotes saudáveis foram registrados. Após o relato de Chang (1959), Whittingham, em 1968, obteve sucesso trabalhando com camundongos e, alguns anos mais tarde Toyoda e Chang estabeleceram a FIV para ratos (CHANG, 1959; BRACKETT et al., 1982). Steptoe e Edwards (1978) estabeleceram um novo marco na história da FIV no mundo, com o sucesso do nascimento do primeiro bebê humano.

No que concerne aos animais de produção, apenas na década de 70 é que surgiram os primeiros relatos de sucesso no nascimento de filhotes após maturação *in vitro*, seguida de transferência para fertilização dos embriões *in vivo* (GONÇALVES et al., 2002). Em 1971 Crosby e sua equipe produziram filhotes saudáveis de ovelhas, no mesmo ano Leman e Dziuk obtiveram sucesso trabalhando com porcos, resultado que foi comprovado em 1974 por Motlik e Fulka. O primeiro relato da produção de um bezerro utilizando a técnica descrita acima ocorreu em 1970, e foi realizado por Sreenan e sua equipe. Dois anos mais tarde esse resultado foi confirmado por Lawson e Rowson (IRITANI; NIWA, 1977).

Até esse momento, aparentemente, não havia nenhum relato da produção de filhotes bovinos nascidos após FIV (IRITANI; NIWA, 1977). Apesar das técnicas de transferência de embriões produzidos *in vivo* em bovinos estar sendo amplamente utilizada nos anos 70, os esforços para a produção de embriões *in vitro* em bovinos foram considerados por Blandau (1980) como um “total fracasso”. Entretanto, mesmo com as evidências apresentadas por Blandau (1980) no início da década de 80 finalmente foi produzido um bezerro a partir de FIV. Brackett et al. (1982) foram os primeiros a publicarem o nascimento de um bezerro sadio, ocorrido no dia 9 de junho de 1981, produzido por FIV. Em seu trabalho foram utilizadas 22 doadoras e 7 receptoras, para a fertilização foi utilizado tanto sêmen a fresco quanto amostras

congeladas. As amostras de sêmen eram de animais pré-selecionados para inseminação artificial, o que indicava uma boa qualidade seminal. A coleta dos oócitos foi realizada via cirúrgica, e foram recuperados 177 oócitos, dos quais 52% fertilizaram. Apesar da grande quantidade de embriões produzidos para transferência, a gestação só foi obtida em uma doadora, a qual recebeu apenas um embrião no estágio de 4 células. O primeiro bezerro de FIV nasceu pesando 45kg e após alguns meses de observações não foram visualizadas alterações no desenvolvimento e no comportamento do animal (BRACKETT et al., 1982).

A partir de então, a PIV de bovinos recebeu grande impulso por ter sido verificado que poderia ser integralmente viabilizada sob condições artificiais. Por todo o potencial de aplicação que a PIV representa para as espécies humana e animal, como pela sua expressividade tanto para a ciência básica quanto para a aplicada, tem sido muito difundida e utilizada em diversos países, inclusive de forma destacada no Brasil, a partir da década de 90 (GONÇALVES et al., 2002). A TE tem sido utilizada internacionalmente para introdução, melhoramento e preservação da genética dos rebanhos bovinos. Materiais de origem animal, como sêmen e embriões, têm sido cada vez mais, transportados para diferentes lugares e sendo assim o risco de transmissão de doenças deve ser considerado (BIELANSKY, 1997).

A produção de embriões *in vivo* pode ser considerada como a primeira geração de tecnologias de embriões. Procedimentos fundamentais que são utilizados na produção de bovinos, hoje, incluem: superovulação das doadoras, coleta não-cirúrgica de embriões, criopreservação de embriões e transferência não-cirúrgica para receptoras sincronizadas (STRINGFELLOW; GIVENS; WALDROP, 2004). A segunda geração de tecnologias de embriões inclui a PIV. Muito dos componentes essenciais desse

processo para bovinos têm sido desenvolvidos e aperfeiçoados nos últimos 25 anos (STRINGFELLOW; GIVENS; WALDROP, 2004). Os procedimentos fundamentais normalmente utilizados incluem: aspiração transvaginal de oócitos, maturação *in vitro*, capacitação dos espermatozoides, FIV, e cultura *in vitro* dos embriões até o estágio de blastocisto. Por fim a terceira geração de tecnologias, desenvolvida mais recentemente, inclui a ICSI, transferência nuclear e transgênese (STRINGFELLOW; GIVENS; WALDROP, 2004).

Devido ao grande desenvolvimento tecnológico ocorrido nesses últimos anos em relação às técnicas empregadas na produção de bovinos, do ponto de vista epidemiológico, deve-se ressaltar, que a cada fase de desenvolvimento criam-se novos desafios em relação ao controle de doenças. Com o surgimento das primeiras técnicas de PIV ocorreu uma alteração significativa no ambiente de produção, o que possibilitou maior risco de transmissão de patógenos. Conforme as tecnologias vão se tornando mais complexas, como no caso da ICSI e da clonagem, criam-se novas oportunidades para a introdução de patógenos no sistema (STRINGFELLOW; GIVENS; WALDROP, 2004). Os resultados encontrados em pesquisas relativas à transmissão de patógenos por técnicas conceptivas artificiais fornecem dados importantes sobre a possibilidade de disseminação de doenças via essas técnicas (BIELANSKY, 1997; STRINGFELLOW; GIVENS, 2000b; THIBIER, 2001). Portanto, o potencial de introdução de agentes infecciosos através da PIV é óbvio, e conseqüentemente, pesquisas sobre os riscos de transmissão de doenças por embriões são de extrema importância para o desenvolvimento de protocolos para sua certificação sanitária.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Descrição das técnicas utilizadas neste trabalho, assim como os materiais necessários para sua execução.

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 50 camundongos (*Mus musculus*) Swiss Webster da colônia do biotério do Instituto Biológico de São Paulo. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno contendo cama de maravalha de pinho branco autoclavada (121°C/30 minutos) e recebendo dieta peletizada. As condições ambientais obedeceram aos seguintes padrões: ar com 15 renovações por hora à temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade de 50% e foto período de 12h de claro por 12h de escuro (BRAGGIO; MARTINS; VALERO, 2003). Para o experimento foram utilizadas fêmeas púberes, nulíparas, entre 6 a 8 semanas de idade, acasaladas com machos inteiros da mesma linhagem e idade, após superestimulação ovariana. Foram mantidos 6 animais por caixa até o momento do acasalamento, quando foram colocadas 2 fêmeas para cada macho.

4.2 SUPERESTIMULAÇÃO OVARIANA

Os hormônios utilizados para superestimulação ovariana foram a gonadotrofina coriônica eqüina (eCG/PMS) (Novormon 5000[®]-Sintex AS-Argentina) e a gonadotrofina coriônica humana (hCG) (Vetecor 2000[®]-Calier SA-Espanha). Os hormônios liofilizados foram ressuspensos em solução estéril de 0,9% de NaCl na concentração de 100UI/mL e foram mantidos, protegidos da luz, aliquotados e congelados (-20°C) até o momento do uso. Foram injetados, intraperitonealmente, por animal 0,2ml (5UI) de cada hormônio. Inicialmente, as fêmeas receberam 0,2mL de eCG/PMSG e após 46-48 horas receberam 0,2mL de hCG. Para a injeção foi utilizada agulha de 16x0,5mm. Após a aplicação do hCG foram colocadas 2 fêmeas para cada macho para acasalamento. Dezoito horas após a aplicação do hCG, foi realizada a coleta dos zigotos (Esquema 1) (HOGAN; CONSTANTINI; LACY, 1986).

Esquema 1 - Etapas do processo de superovulação

4.3 COLETA DOS ZIGOTOS

A coleta dos zigotos teve início com o sacrifício das fêmeas, executado por deslocamento cervical, a fim de não causar danos aos embriões (Figura 1A) (PASSOS et al., 2002). O ventre do animal foi higienizado com uma solução de álcool a 70% antes da incisão (Figura 1B). Foi feita uma abertura na pele e peritônio para a coleta dos ovidutos (Figuras 1C à 1F). Os ovidutos foram mantidos aos pares, em gotas de 200 μ l de meio de lavagem tamponado (Cultilab[®]-Campinas, SP) até que todos os animais fossem sacrificados (Figura 2A). Com o auxílio de uma lupa (Coleman) e duas agulhas 16x0,5mm, os ovidutos foram abertos (40X) (Figura 2B E 2C), os zigotos foram coletados e rapidamente transportados para uma nova gota de meio de lavagem (200 μ L) (Figura 2D). Os zigotos foram lavados por 30 segundos em solução de pronase a 0,5% a 37°C, para total remoção das células do cúmulos. Em seguida, foram lavados em 3 gotas de meio de lavagem acrescido de 1% de soro fetal bovino (SFB) para inativação da enzima (HOGAN; CONSTANTINI; LACY, 1986).

Figura 1 - Procedimento de coleta dos ovidutos. A-Deslocamento cervical; B-Higienização do abdômen do animal; C-Abertura da pele; D-Abertura do peritônio; E-Exposição do interior do abdômen do animal; F-Visualização do oviduto (indicado pela tesoura)

Figura 2 - Coleta dos zigotos. A-Ovidutos logo após a coleta em meio de lavagem; B-Ovidutos visualizados sob lupa (40X); C-Utilização de agulhas para abertura dos ovidutos; D-Zigotos observados sob lupa (40X)

4.4 BACTÉRIA E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Foi utilizada a bactéria *B. abortus* cepa 1119.3, cultivada em condições de microaerofilia (5% CO₂) em meio agar-bisulfito, à 37°C. A suspensão de bactérias foi preparada no momento da inoculação, em solução salina estéril, na diluição de 10⁶ bactérias/mL.

4.5 INFECÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ZIGOTOS MURINOS *IN VITRO*

Os zigotos obtidos foram separados em grupo controle e grupo infectado, os quais foram mantidos em gotas de 100µL de meio TCM 199 suplementado com 10% de SFB e 0,2% de piruvato de sódio, sob óleo mineral estéril. A cultura foi mantida em estufa a 5% de CO₂, 90% de umidade e 37°C. A infecção foi feita com 30µL da suspensão de bactérias na diluição de 10⁶ bactérias/mL. Para padronização do experimento foi adicionado às gotas do grupo controle 30µL de solução salina estéril, para equilíbrio das condições de diluição do meio. Após 24h de infecção os zigotos foram separados em subgrupos para avaliação da morfologia, viabilidade e para realização dos procedimentos de lavagem seqüencial e tratamento com tripsina. Tanto a morfologia quanto à viabilidade também foram avaliadas após 96h de infecção.

4.6 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA E VIABILIDADE DOS ZIGOTOS MURINOS APÓS A INFECÇÃO POR *Brucella abortus*

Após 24h e 96h de infecção, os zigotos murinos foram avaliados quanto à presença de alterações morfológicas e comparados ao grupo controle. A análise da viabilidade foi realizada através da avaliação da taxa de clivagem dos embriões após 24h e 96h de cultivo, na presença ou ausência do patógeno. Para essas análises foi utilizado um microscópio Olympus (Tokyo, Japan), e os zigotos foram observados em um aumento de 100X. Para documentação fotográfica foi utilizada uma filmadora digital JVC digital vídeo câmera GR30U (JVC-Malásia).

4.7 LAVAGEM DOS ZIGOTOS MURINOS

Os zigotos foram subdivididos em quatro grupos: o primeiro, grupo controle, não exposto à bactéria e submetido à lavagem seqüencial, o segundo, também grupo controle, não exposto à bactéria e submetido ao tratamento com tripsina, o terceiro, exposto à bactéria e submetido apenas a lavagem seqüencial, e o quarto grupo exposto à bactéria e submetido ao tratamento com tripsina.

A lavagem seqüencial consiste na passagem dos zigotos por 10 gotas de 200 μ L de meio TCM199 (Cultilab[®]-Campinas, SP) acrescido de 10% de SFB penicilina

(100UI/mL) e estreptomicina (10µg/mL) (Esquema 2). Os zigotos foram lavados em grupos de pelo menos 5, com troca de ponteiros a cada passagem de gota, e transferindo apenas 10µL de meio de uma gota para outra. O tratamento com tripsina consiste na troca das duas gotas centrais de meio de cultura da seqüência de lavagem, por duas gotas de solução de tripsina a 0,25% em citrato de sódio, pH 7,6 (Esquema 2).

Gota de meio de cultura (200µL);
 Gota de tripsina (200µL);
 Passagem de 10µL de meio de uma gota para outra;
 Amostra contendo zigotos para cultura;
 Amostra de meio de cultura da última gota de lavagem para cultura;
 Amostra contendo zigotos para PCR;
 Amostra de meio de cultura da última gota de lavagem para PCR

Esquema 2 - Esquema mostrando os tratamentos utilizados nos diferentes grupos experimentais

4.8 MÉTODOS DE DETECÇÃO DA *B. ABORTUS*

Para detecção da bactéria após os procedimentos de lavagem seqüencial e tratamento com tripsina, as amostras foram inoculadas em cultura de bactérias e submetidas ao teste de reação em cadeia pela polimerase (PCR) (Esquema 2). Uma amostra da última gota de lavagem de cada grupo também foi testada quanto à presença de bactérias, tanto na PCR quanto em cultura (Esquema 2).

4.8.1 Detecção das bactérias nas amostras em meio de cultivo

As amostras contendo os zigotos, tanto controle quanto infectados, após as lavagens seqüenciais e tratamento com tripsina, assim como, uma alíquota da última gota de lavagem de cada grupo foram inoculadas em meio agar-bisulfito, cultivadas em condições de microaerofilia (5% CO₂), à 37°C. e, foi verificado ao final de sete dias de incubação se houve crescimento de *B. abortus*.

4.8.2 Detecção das bactérias nas amostras pela reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Serão descritos os protocolos utilizados para detecção das bactérias nas amostras pela PCR, protocolos de extração e amplificação do DNA das amostras e protocolo utilizado para realização da eletroforese.

4.8.2.1 Extração do DNA das amostras

- ❖ Adicionar 150 μ L de TE (50mM Tris-HCl e 12,5 mM de EDTA) a amostra (50 μ L) previamente homogeneizada;
- ❖ agitar os tubos e centrifugar a 13000g por 5 minutos;
- ❖ desprezar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em 300 μ L de tampão de lise (195 μ L água mQ, 60 μ L TNE, 30 μ L SDS e 15 μ L pK a 20mg/ml);
- ❖ incubar em banho-maria a 56°C com agitação (350rpm) por 1h;
- ❖ adicionar 150 μ L de fenol tamponado, homogeneizar e centrifugar a 13000g por 5 minutos;
- ❖ transferir 300 μ L da fase aquosa para novo eppendorf;
- ❖ adicionar 100 μ L de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), agitar e centrifugar a 13000g por 5 minutos;

- ❖ transferir 200µL da fase aquosa para novo eppendorf;
- ❖ adicionar 40µL de acetato de sódio 2M (1/5 do volume);
- ❖ adicionar 480µL de etanol puro (2x o volume total) e homogeneizar;
- ❖ manter a –20°C por pelo menos 4h;
- ❖ centrifugar a 13000g por 15 minutos e descartar o sobrenadante;
- ❖ adicionar 500µL de etanol 70% e centrifugar a 13000g por 15 minutos;
- ❖ descartar o sobrenadante com o auxílio de um micropipetador;
- ❖ secar o pellet em estufa a 45°C por 15 minutos;
- ❖ adicionar 30µL de TE e incubar em banho-maria a 56° C com agitação (350rpm) por 15 minutos;
- ❖ estocar a –20°C.

4.8.2.2 Amplificação

Os “primers” B4 e B5 utilizados para detecção de *Brucella* spp. foram descritos por Baily et al. (1992), e amplificam um fragmento de 223 pares de base (pb).

A amplificação das amostras foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Cortez et al. (2001):

- ❖ 15 µl de água ultrapura (Millipore);
- ❖ 5 µl de tampão de reação 10 X (500 mM KCl; 15 mM MgCl₂; 100 mM Tris-HCl, ph 9,0);

- ❖ 8 µl da mistura de dNTPs (200 µM de cada nucleotídeo [dCTP, dATP, dGTP, dTTP]);
- ❖ 1,5 µl de MgCl₂ a 1,5 mM;
- ❖ 5 µl do “primer” B₄ (10pmol/µl);
- ❖ 5 µl do “primer” B₅ (10pmol/µl);
- ❖ 0,5 µl de *Taq* DNA polimerase (5 unidades por µl);
- ❖ 10 µl da amostra de DNA extraído.

O ciclo de temperaturas da PCR foi realizado de acordo com o proposto por Bailly et al. (1992), sendo que anteriormente ao ciclo de temperaturas foi realizada a desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos e, ao final, uma extensão a 72°C por 10 minutos. Foram empregados 40 ciclos, divididos em três fases: desnaturação a 94°C por 60 segundos, hibridação a 60°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos.

4.8.2.3 Eletroforese

A análise do produto amplificado foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1,3 % com tampão de corrida TBE 0,5 X (0,045 M TRIS-Borato e 1 mM de EDTA ph 8,0) e o gel submetido à voltagem constante de 6-7 V/ cm. O gel foi corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL e posteriormente fotografado sob luz ultravioleta

(300-320 nm) pelo sistema de foto-documentação (Câmera Kodak Digital DC/120 Zoom) e analisado com o software 1 D Image Analysis (Kodak Digial Science).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA TAXA DE CLIVAGEM

Para análise estatística da taxa de clivagem dos zigotos foi utilizado o teste do χ^2 com nível de significância de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DA MORFOLOGIA DOS ZIGOTOS APÓS EXPOSIÇÃO A *Brucella abortus*

A análise da morfologia foi realizada sob microscópio óptico no aumento de 100X. No grupo controle não foram verificadas alterações morfológicas após 24 ou 96h de cultura (Figuras 3, 5 e 7). Já no grupo infectado, foi possível verificar a presença de alterações como blastômeros assimétricos (Figura 4, 6, 8 e 9), falha de divisão (Figura 6), citoplasma com granulação e aspecto degenerativo (Figura 4, 6 e 9), em ambos os períodos de incubação. Apenas na zona pelúcida não foram verificadas alterações visíveis ao microscópio óptico (Figuras 3 a 9).

Figura 3 - Embriões do grupo controle após 24h de incubação (100x, 2Xzoom)

Figura 4 - Embrião após 24h de infecção com *B. abortus* (100x, 10Xzoom)

Figura 5 - Embrião do grupo controle após 24h de incubação (100x; 8xzoom)

Figura 6 - Embrião após 24h de infecção com *B. abortus* (100x, 10Xzoom)

Figura 7 - Mórula do grupo controle após 96h de incubação (100x, 10Xzoom)

Figura 8 - Mórula após 96h de infecção com *B. abortus* (100x, 10Xzoom)

Figura 9 - Mórula após 96h de infecção com *B. abortus* (100x, 15Xzoom)

5.2 ANÁLISE DA VIABILIDADE DE ZIGOTOS MURINOS NA PRESENÇA DE *Brucella abortus*

Após 24 horas de exposição dos zigotos murinos à *B. abortus* foi verificada a taxa de clivagem que, no grupo controle, foi de 77,4% (89/115) e a encontrada para o grupo infectado foi de 59,2% (90/152). Pode-se verificar que a taxa de clivagem do grupo infectado apresentou-se significativamente menor (χ^2 de 0,001674; $p < 0,05$) do que do grupo controle. Após 96 horas de infecção, o grupo controle apresentou 14,5% (9/62) de embriões com mais de duas células, enquanto que o grupo infectado apresentou apenas 7% (6/85), entretanto, estatisticamente a diferença entre esses dois grupos não foi significativa (χ^2 de 0,141616; $p < 0,05$) (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Taxa de clivagem de zigotos murinos após 24 e 96 horas da infecção com *B. abortus* nos grupos controle e infectado (* $p < 0,05$)

5.3 DETECÇÃO DA *Brucella abortus* EM CULTURA DE BACTÉRIA APÓS OS PROCEDIMENTOS DE LAVAGEM E TRATAMENTO COM TRIPSINA

Não foi possível isolar *B. abortus* em cultura após os procedimentos de lavagem, tanto da lavagem seqüencial quanto do tratamento com tripsina, para ambos os grupos, controle e infectado (24h), e tanto para as amostras contendo os zigotos, quanto para a alíquota da última gota de lavagem.

5.4 DETECÇÃO DA *Brucella abortus* PELA PCR APÓS OS PROCEDIMENTOS DE LAVAGEM E TRATAMENTO COM TRIPSINA

Verificou-se que, após 24h de infecção, as amostras do grupo controle, quando analisadas por PCR para verificação da presença de *B. abortus* apresentaram-se negativas, para as amostras contendo embriões ou apenas para a alíquota da última gota de lavagem de cada grupo, tanto para o grupo tratado apenas com a lavagem seqüencial, quanto para o grupo submetido ao tratamento com tripsina (Tabela 1 e Figuras 12 e 14). Já no grupo infectado, foram obtidos resultados positivos e negativos, para as amostras contendo os embriões e para a alíquota da última gota de lavagem de cada grupo, dos grupos tratados apenas com a lavagem seqüencial (Tabela 1 e Figuras 10 e 11). Foi verificada apenas em uma amostra a presença de embriões positivos para

a *B. abortus* e amostra da última gota de lavagem desses embriões negativa (Amostra 10) (Tabela 1 e Figuras 11 e 12). Para as amostras 9 (Figura 10) e 12 (Figuras 11 e 12) os embriões apresentaram-se livres de *B. abortus*, mas foram detectadas na alíquota da última gota de lavagem (Tabela 1). Apenas na amostra 15 foram obtidos resultados negativos, tanto para os embriões, quanto para a alíquota da última gota de lavagem (Tabela 1 e Figura 10). Os resultados da PCR para os grupos infectados e tratados com tripsina foram positivos para quase todas as amostras (Figuras 12 e 13), contendo embriões ou apenas da alíquota da última gota de lavagem, com exceção dos embriões da amostra 32 que apresentaram-se negativos quanto à presença da bactéria (Tabela 2 e Figura 12).

Tabela 1 - Resultados da PCR para as amostras submetidas apenas a lavagem seqüencial
 - Indicação de resultado negativo na PCR; + Indicação de resultado positivo na PCR

Amostras submetidas à lavagem seqüencial					
Grupo Controle			Grupo Infectado		
Nº amostra	Amostras contendo embriões	Alíquota da última gota de lavagem	Nº amostra	Amostras contendo embriões	Alíquota da última gota de lavagem
1	-	-	9	-	+
2	-	-	10	+	-
3	-	-	11	+	+
4	-	-	12	-	+
5	-	-	13	+	+
6	-	-	14	+	+
7	-	-	15	-	-
8	-	-	16	+	+

Tabela 2 - Resultados da PCR para amostras submetidas ao tratamento com tripsina
 - Indicação de resultado negativo na PCR; + Indicação de resultado positivo na PCR

Amostras submetidas ao tratamento com tripsina					
Grupo Controle			Grupo Infectado		
Nº amostra	Amostras contendo embriões	Alíquota da última gota de lavagem	Nº amostra	Amostras contendo embriões	Alíquota da última gota de lavagem
17	-	-	25	+	+
18	-	-	26	+	+
19	-	-	27	+	+
20	-	-	28	+	+
21	-	-	29	+	+
22	-	-	30	+	+
23	-	-	31	+	+
24	-	-	32	-	+

M – Padrão de peso molecular

- 1 – Embriões infectados submetidos a lavagem seqüencial da amostra 9
- 2 – Alíquota da última gota de lavagem da amostra 9
- 3 – Embriões infectados submetidos a lavagem seqüencial da amostra 11
- 4 – Alíquota da última gota de lavagem da amostra 11
- 5 – Embriões infectados submetidos a lavagem seqüencial da amostra 13
- 6 – Alíquota da última gota de lavagem da amostra 13
- 7 – Embriões infectados submetidos a lavagem seqüencial da amostra 15
- 8 – Alíquota da última gota de lavagem da amostra 15
- 9 – Embriões infectados submetidos a lavagem seqüencial da amostra 16
- 10 – Alíquota da última gota de lavagem da amostra 16
- 11 – Controle positivo
- 12 – Controle negativo

Figura 10 - Detecção de produtos amplificados das amostras com embriões infectados

M – Padrão de peso molecular

- 1 – Embriões infectados submetidos a lavagem seqüencial da amostra 10
- 2 – Alíquota da última gota de lavagem da amostra 12
- 3 – Embriões infectados submetidos a lavagem seqüencial da amostra 14
- 4 – Alíquota da última gota de lavagem da amostra 14
- 5 – Embriões infectados submetidos ao tratamento com tripsina da amostra 25
- 6 – Controle positivo
- 7 – Controle negativo

Figura 11 - Detecção de produtos amplificados das amostras com embriões infectados

M – Padrão de peso molecular

1 – Embriões infectados submetidos ao tratamento com tripsina da amostra 28

2 – Alíquota da última gota de lavagem da amostra 28

3 – Embriões infectados submetidos a lavagem seqüencial da amostra 12

4 – Alíquota da última gota de lavagem da amostra 10

5 – Embriões infectados submetidos ao tratamento com tripsina da amostra 29

6 – Alíquota da última gota de lavagem da amostra 29

7 – Embriões infectados submetidos ao tratamento com tripsina da amostra 30

8 – Alíquota da última gota de lavagem da amostra 30

9 – Embriões infectados submetidos ao tratamento com tripsina da amostra 31

10 – Alíquota da última gota de lavagem da amostra 31

11 – Embriões controle submetidos ao tratamento com tripsina da amostra 17

12 – Alíquota da última gota de lavagem da amostra 17

13 – Embriões infectados submetidos ao tratamento com tripsina da amostra 32

14 – Alíquota da última gota de lavagem da amostra 32

15 – Controle positivo

16 – Controle negativo

Figura 12 - Detecção de produtos amplificados das amostras com embriões infectados e controle

- M – Padrão de peso molecular
 1 – Alíquota da última gota de lavagem da amostra 25
 2 – Embriões infectados submetidos ao tratamento com tripsina da amostra 26
 3 – Alíquota da última gota de lavagem da amostra 26
 4 – Embriões infectados submetidos ao tratamento com tripsina da amostra 27
 5 – Alíquota da última gota de lavagem da amostra 27
 6 – Controle positivo
 7 – Controle negativo

Figura 13 - Detecção de produtos amplificados das amostras com embriões infectados

- M – Padrão de peso molecular
 1 – Alíquota da última gota de lavagem da amostra 1
 2 – Embriões controle submetidos ao tratamento com tripsina da amostra 1
 3 – Alíquota da última gota de lavagem da amostra 2
 4 – Embriões controle submetidos a lavagem seqüencial da amostra 2
 5 – Alíquota da última gota de lavagem da amostra 18
 6 – Controle positivo
 7 – Controle negativo

Figura 14 - Detecção de produtos amplificados das amostras com embriões controles

6 DISCUSSÃO

À cada nova tecnologia que surge na área de reprodução animal ocorre uma mudança ambiental capaz de influenciar o potencial epidemiológico de sua produção e, portanto, a qualidade da manipulação dos materiais é que determinará a presença de animais doentes ou saudáveis na nova população gerada (STRINGFELLOW; GIVENS; WALDROP, 2004). O resultado final do processo dependerá do estabelecimento de controles adequados, assim como, da qualidade técnica e ética dos profissionais envolvidos. É de especial importância que a quantidade de patógenos associados com um único embrião possa ser determinada, para que seja conhecido o risco de transmissão da doença, pois esta constitui a dose infectante em caso de transferência desse embrião.

As altas concentrações de *B. abortus* utilizadas nas suspensões experimentais são para promover o máximo de oportunidade para aderência ou entrada do microrganismo nos embriões (STRINGFELLOW et al., 1986). Mallek et al. (1984) trabalhando com *B. abortus* utilizaram suspensões de até 10^5 brucellas/mL para infecção de embriões bovinos e de camundongos *in vitro*. Stringfellow et al. (1986) trabalharam com uma suspensão de 10^6 ufc/mL de *B. abortus* para infecção de embriões bovinos *in vitro*. Bielansky et al. (1997) utilizaram em um estudo realizado com *Campylobacter fetus*, para infecção de amostras de sêmen, uma concentração de 10^8 ufc/mL da bactéria. Tendo como base esses estudos, nesse trabalho foi utilizada uma suspensão com 10^6 brucellas/mL para a infecção dos zigotos murinos.

A escolha do camundongo como modelo experimental foi baseada em trabalhos previamente publicados (D'ANGELO et al., 2003d ; MALLEK et al., 1984). Mallek et al. (1984) utilizaram embriões de camundongo como modelo para o estudo das consequências da contaminação *in vitro* desses embriões por *B. abortus*. Utilizaram embriões com ZP intacta no estágio de mórula, os quais foram expostos à concentrações sucessivas de *Brucella*, partindo de 10^2 até 10^5 brucellas/mL. Após 24h de infecção, pode ser verificada a ocorrência de alterações no desenvolvimento dos embriões, sugerindo sua sensibilidade à *B. abortus* (MALLEK et al., 1984). Além da suscetibilidade ao agente, sabe-se que os embriões de camundongo são sensíveis a diferentes patógenos, são de fácil acesso e baixo custo, o que os torna um excelente modelo para estudos de interação embrião-patógeno (D'ANGELO et al., 2001; GALUPPO; D'ANGELO, 1999).

Nesse trabalho, a avaliação da sensibilidade dos zigotos ao patógeno foi realizada pela análise da sua morfologia e viabilidade, através da taxa de clivagem, após exposição à *B. abortus* por 24 e 96h. Quanto à morfologia, no grupo controle, não foram verificadas alterações após 24 ou 96h de cultura (Figuras 3, 5 e 7). Já no grupo infectado, foi possível verificar a presença de alterações, como blastômeros assimétricos, falhas na divisão e citoplasma com granulação e aspecto degenerativo em ambos os grupos (24h e 96h) (Figuras 4, 6, 8 e 9). Apenas na zona pelúcida não foram verificadas alterações visíveis ao microscópio óptico (Figuras 3 à 9). Em relação à taxa de clivagem, pode-se verificar que, no grupo infectado, esta apresentou-se significativamente menor (59,2%) (χ^2 de 0,001674; $p < 0,05$) do que a encontrada para o grupo controle (77,4%) após 24h de cultura (Gráfico 1). Enquanto que após 96h de

infecção não foi obtida uma diferença significativa nessa taxa (χ^2 de 0,141616; $p < 0,05$). Nossos resultados estão de acordo com os descritos por D'Angelo et al. (2003d) onde foi possível verificar que zigotos murinos expostos *in vitro* à *B. abortus* apresentaram alterações morfológicas logo após as primeiras 24h de infecção. Esses autores verificaram bloqueio no desenvolvimento dos embriões infectados no estágio de 2 células, assim como granulação e retração do citoplasma dos blastômeros, seguida de degeneração citoplasmática. Stringfellow et al. (1986) observaram que a cultura de embriões na presença de *B. abortus* por até 18h não promove nenhum efeito prejudicial ao seu desenvolvimento, porém após esse período, os embriões começam a apresentar sinais de degeneração. Sabe-se que as condições de cultivo de embriões precisam mimetizar ao máximo o ambiente encontrado naturalmente no oviduto e útero e, apesar de toda a tecnologia empregada para o desenvolvimento de melhorias desse sistema, a condição estática do meio fornece um ambiente totalmente diferente daquele encontrado *in vivo*, onde o suprimento de nutrientes e gases é dinamicamente alterado (KRUIP; BEVERS; KEMP, 2000). Segundo Stringfellow et al. (1986) essas observações suportam a hipótese de que, provavelmente, as alterações morfológicas e a redução de viabilidade dos embriões na presença de *B. abortus* após o período de 18h são causadas pelas alterações ocorridas no meio de cultura devido à proliferação das bactérias, e não por seu efeito direto nos embriões (STRINGFELLOW et al., 1986).

Aparentemente, os procedimentos sugeridos pela IETS, de lavagem sequencial, tratamento com tripsina ou uso de antibióticos em embriões infectados natural ou artificialmente são eficientes na diluição, lavagem ou inativação de diferentes patógenos (STRINGFELLOW; GIVENS, 2000b). Sabe-se que esses tratamentos reduzem o nível de contaminantes presentes quando os embriões são expostos a

patógenos (STRINGFELLOO; GIVENS; WALDROP, 2004). Segundo Stringfellow e Givens (2000a) existem várias justificativas do porquê utilizar os procedimentos propostos pela IETS: são relativamente baratos, são de fácil adaptação aos sistemas de produção de embriões já existentes, têm sido demonstrada sua eficiência para embriões bovinos expostos *in vitro* a diferentes tipos de patógenos e também limitam a transmissão de patógenos quando embriões são coletados de animais infectados ou expostos a microrganismos e transferidos para receptoras saudáveis.

Uma série de experimentos e triagens em campo foram realizados, nos quais, foram coletados embriões de doadoras sabidamente contaminadas pelos seguintes patógenos: vírus da leucemia bovina, vírus da língua azul, herpesvírus bovino tipo 1, vírus da diarréia viral bovina, vírus da febre aftosa e *B. abortus*. Após a coleta, os embriões foram lavados, tratados com tripsina e transferidos para receptoras saudáveis. Subseqüentemente as receptoras e a progênie foram testadas quanto à presença dos patógenos e, em nenhum dos casos houve a transmissão. Stringfellow et al. (1986) verificaram ausência de *B. abortus* em embriões bovinos com ZP intacta após as lavagens. O que confirma os resultados encontrados previamente por Mallek et al. (1984), que também não foram capazes de isolar em cultura Brucellas de mórulas bovinas com ZP intacta após a realização de 10 lavagens.

Em nossos estudos, encontramos resultados semelhantes aos já descritos na literatura, pois não foi possível isolar *B. abortus* em cultura para ambos os grupos, controle e infectado, tanto para amostras contendo os zigotos, quanto para a alíquota da última gota de lavagem, após os procedimentos de lavagem, ou do tratamento com tripsina. Os dados sugerem que, provavelmente, após o uso dos procedimentos de lavagem e tratamento com tripsina não permaneçam aderidas aos embriões ou no meio

da última gota de lavagem bactérias em concentração suficiente para serem detectadas em sistema de cultura, porém não se pode afirmar que esses embriões estejam totalmente livres desse patógeno. Entretanto, existem evidências de que embriões corretamente manipulados não oferecem risco de transmissão de doenças, uma vez que, não transmitem às receptoras e à progênie uma dose infectante do patógeno (STRINGFELLOW; GIVENS, 2000b).

Assim como nos embriões produzidos *in vivo*, acredita-se que a ZP de embriões FIV também seja capaz de proteger de infecções o embrião em desenvolvimento. E, de fato, após experimentos realizados *in vitro* pode-se comprovar que a ZP intacta é realmente eficiente impedindo na maioria das vezes a passagem de patógenos (VANROOSE et al., 2000). Entretanto, os embriões de FIV apresentam diferenças morfo e fisiológicas em relação aos produzidos *in vivo*. São menos compactos, o blastocisto tem um número inferior de células e possuem diferenças na elasticidade, resistência à pronase e nas propriedades antigênicas da ZP (POLLARD; LEIBO, 1993; VAN SOON et al., 1992; WRIGHT; ELLINGTON, 1995). Essas informações levantam dúvidas a respeito da interação agente infeccioso-embrião de FIV, que podem ser mais suscetíveis (D'ANGELO, 1998).

Juntamente com esse fato, sabe-se que as novas tecnologias desenvolvidas em reprodução animal promovem manipulação invasiva da ZP. Um dos procedimentos que pode ser citado é a sexagem de embriões, na qual é retirada uma ou mais células embrionárias, através de uma abertura na ZP (REICHENBACH et al., 2002). O mesmo se aplica para todos os tipos de biopsias realizadas, como por exemplo, para diagnóstico pré-natal de doenças e até a clonagem. O risco a ser considerado nesses casos é da presença de patógenos associados à ZP ou nas

proximidades, que possam ser introduzidos, ou ter sua entrada facilitada no embrião no momento da penetração pela ZP (THIBIER, 2001). Stringfellow et al. (1986) realizaram um trabalho comparativo da eficiência das lavagens sequenciais para embriões bovinos com ZP intacta, com zona danificada e livres de ZP, infectados *in vitro* por *B. abortus*. Esses autores não detectaram *B. abortus* em embriões isentos de ZP ou com ZP intacta, após as lavagens, entretanto, no grupo contendo ZP danificada foi possível seu isolamento de todos os embriões infectados. Portanto, uma possível explicação para o isolamento de *B. abortus* de embriões com danos na ZP seria a de que, as bactérias teriam penetrado através dessas falhas e alcançado o espaço perivitelinico estando protegidas, não podendo ser removidas apenas com o uso das lavagens sequenciais (STRINGFELLOW et al., 1986).

A PCR tem sido utilizada como método diagnóstico para um grande número de infecções, devido ao seu potencial em detectar a presença de uma quantidade mínima de microrganismos (BAILY et al., 2001). Brisson-Noel et al. (1991) demonstraram sua aplicação prática como método diagnóstico para infecções bacterianas. Nesse estudo a PCR foi utilizada como método diagnóstico em associação à cultura de bactérias, pois assim, além de se identificar a presença de contaminação, também pode-se analisar a viabilidade das bactérias, permitindo avaliar o potencial de transmissão da doença.

É importante ressaltar que, o desenvolvimento de novas tecnologias, como a criação de sondas específicas de DNA e a PCR, aumentou significativamente a sensibilidade e a especificidade dos testes para detecção de patógenos. Porém, o uso dessas técnicas de biologia molecular, isoladamente, não fornece informação sobre a viabilidade dos microrganismos, sendo assim, o uso de cultura e teste de sensibilidade em cultura de células são de extrema importância para determinação da viabilidade dos

patógenos (BIELANSKY, 1997). Segundo Stringfellow et al. (1986) as Brucellas se multiplicam rapidamente, ao final de um período de 18h, o grau de sensibilidade de um teste de cultura seria suficiente para detectar microrganismos que estivessem aderidos à ZP ou que tivessem infectado os embriões.

Neste trabalho, observou-se que as amostras do grupo controle, quando analisadas por PCR, para verificação da presença de *B. abortus* apresentaram-se negativas, para as amostras contendo embriões ou apenas para a alíquota da última gota de lavagem de cada grupo, tanto para o grupo tratado apenas com a lavagem seqüencial, quanto para o grupo submetido ao tratamento com tripsina. Já no grupo infectado, foram obtidos resultados positivos e negativos, para as amostras contendo os embriões e para a alíquota da última gota de lavagem de cada grupo, dos grupos tratados apenas com a lavagem seqüencial (Tabela 1). Os resultados positivos obtidos tanto para as amostras contendo os embriões, quanto para a última gota de lavagem, indicam que possivelmente, as bactérias, poderiam estar aderidas à zona pelúcida, no interior do embrião, assim como, em suspensão no meio de lavagem (Amostras 11, 13, 14 e 16) (Tabela 1). Foi verificada apenas em uma amostra a presença de embriões positivos para a *B. abortus*, apesar da amostra da última gota de lavagem desses embriões estar negativa (Amostra 10) (Tabela 1). Neste caso sugere-se que as bactérias possam ter conseguido penetrar através da zona pelúcida e alcançar o interior do embrião, ficando protegidas da ação das lavagens e, portanto, não podendo ser eliminadas. Os resultados negativos obtidos para as amostras contendo embriões, mostram que, nesses casos, provavelmente não houve penetração das bactérias através da zona pelúcida e que os procedimentos de lavagem seqüencial foram eficientes na sua remoção/inativação (Amostras 9, 12 e 15) (Tabela 1). Entretanto, é

importante ressaltar que, para as amostras 9 e 12 apesar dos embriões estarem livres de *B. abortus*, essas foram detectadas na alíquota da última gota de lavagem, oferecendo, talvez, risco de transmissão no caso de transferência desses embriões (Tabela 1). A única amostra que realmente demonstrou a eficiência do procedimento de lavagem seqüencial na remoção da *B. abortus* foi à amostra 15, na qual foram obtidos resultados negativos tanto para os embriões, quanto para o meio de lavagem (Tabela 1). Os resultados da PCR para os grupos infectados e tratados com tripsina foram positivos para praticamente todas as amostras, contendo embriões ou para a alíquota da última gota de lavagem, com exceção dos embriões da amostra 32 que se apresentaram negativos quanto à presença da bactéria (Tabela 2). Sendo assim, pode-se sugerir que apenas nesse último grupo o tratamento com tripsina tenha sido eficiente na remoção e/ou inativação da *B. abortus*. De acordo com nossos dados, aparentemente, apenas o uso das lavagens seqüenciais ou do tratamento com tripsina como método de remoção e/ou inativação de *B. abortus* em embriões sensíveis não foram satisfatórios, pois pode-se verificar que esses tratamentos apresentaram níveis de eficácia variáveis.

Atualmente, especialistas do mundo todo têm chamado atenção para a ocorrência de um aumento dramático da necessidade da população por proteína animal. Alguns deles falam em uma grande revolução na produção animal (THIBIER, 2001). Sendo assim, pesquisas relativas ao controle da transmissão e disseminação de doenças infecciosas de bovinos, como a brucelose, tornam-se de extrema importância, principalmente quando relacionadas às novas tecnologias de produção animal. Os resultados encontrados em pesquisas relativas à transmissão de patógenos por técnicas conceptivas artificiais fornecem evidências importantes sobre a possibilidade

de disseminação de doenças via essas técnicas (STRINGFELLOW; GIVENS, 2000b). Considerando os resultados apresentados, torna-se clara a importância do desenvolvimento de um modelo animal para estudos de interações embriões-patógenos, a fim de se evitar a transmissão e disseminação de doenças, gerando um produto final com qualidade controlada.

Entretanto, a análise geral dos resultados obtidos no presente trabalho carece de uma ponderação fundamental quanto à possibilidade de extrapolar observações feitas em sistemas *in vitro* para sistemas *in vivo*. Entre outros fatores, a presença de sistema imune, a organização tecidual e os mecanismos de excreção de substâncias, tornam o sistema *in vivo* extremamente complexo, exigindo cautela para extrapolar observações feitas *in vitro* (D'ANGELO, 1998).

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados aqui apresentados pode-se concluir que:

- ❖ Os zigotos murinos são sensíveis à *B. abortus* após exposição *in vitro*, uma vez que foram verificadas alterações na sua morfologia e desenvolvimento após a infecção.
- ❖ Aparentemente, apenas o uso das lavagens seqüenciais ou do tratamento com tripsina como métodos de remoção e/ou inativação de *B. abortus* em embriões sensíveis não foi satisfatório, pois pode-se verificar que esses tratamentos apresentaram níveis de eficácia variáveis.
- ❖ Provavelmente os zigotos murinos podem ser utilizados como modelo experimental, de baixo custo e fácil acesso, para estudos da interação embrião-*B. abortus*.

REFERENCIAS

AGUIAR, D. M.; RIBEIRO, M. G.; BRITO, A.F.; PESSOA, V. M. Soroaglutinação, sêmen plasma aglutinação e exame andrológico no diagnóstico da Brucelose em machos bovinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n. 2, p. 103-105, 2001.

ALVARENGA, M. A. Editorial. **O Embrião: Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões**, Jaboticabal, Jan. Fev. Mar., 2005. Editorial, n. 22, p. 1, 2005.

APELO, C.; KANAGAWA, H. Pathogens associated with mammalian embryo: a review. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v. 37, p. 49-69, 1989.

BAILY, G. G.; KRAHN, J. B.; DRASAR, B. W.; STOKER, N. G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 4, p. 271-275, 1992.

BIELANSKI, A. A review on disease transmission studies in relationship to production of embryos by in vitro fertilization and to related new reproductive technologies. **Biotechnologies Advances**, v. 15, n. 3-4, p. 633-656, 1997.

BIELANSKI, A.; JORDAN, L. Washing or washing and trypsin treatment is ineffective for removal of noncytopathic bovine viral diarrhea virus from bovine oocytes or embryos after experimental viral contamination of an in vitro fertilization system. **Theriogenology**, v. 46, p. 1467-1476, 1996.

BLAHA, T. Epizootias, parasitosis y enfermedades transmisibles de la lista B de la O.I.E. In: **Epidemiología especial veterinaria**. 1. ed. Espanha: Acribia. 1995. p.153-159.

BLANDAU, R. J. In vitro fertilization and embryo transfer. **Fertility and Sterility**, v. 33, p. 3-11, 1980.

BOSSERAY, N.; PLOMMET, M. Serum and cell-mediated immune protection of mouse placenta and fetus against a *B. abortus* challenge: expression of barrier effect of placenta. **Placenta**, v. 9, p. 65-79, 1988.

BRACKETT, B. G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M. L.; DONAWICK, W. J.; EVANS, J. F. DRESSEL, M. A. Normal development following in vitro fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v. 27, p. 147-158, 1982.

BRAGGIO, M. M.; MARTINS, A. R. S.; VALERO, V. B. Influencia do manejo na produtividade e no desenvolvimento da camundongos (*Mus musculus*). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, n. 2, p. 169-173, 2003.

BRISSON-NOEL, A.; AZNAR, C.; CHUREAU, C.; NGUYEN, S. Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. **Lancet**, v. 338, p. 364, 1991.

CHANG, M. C. Fertilization of rabbit ova in vitro. **Nature**, v. 184, p. 466-467, 1959.

CORTEZ, A.; SCARCELLI, E.; SOARES, R. M.; HEINEMANN, M. B.; SAKAMOTO, S. M.; GENOVEZ, M. E.; FERREIRA, F.; RICHTZENHAIN, L. J. Detection of *Brucella* DNA from aborted bovine fetuses by polymerase chain reaction. **Australian Veterinary Journal**, v. 79, n. 7, p. 500-501, 2001.

D'ANGELO, M. **Interação do herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) com oócitos bovinos maturados *in vitro***. 1998. 52 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

D'ANGELO, M.; MELLO, M. R. B.; GALUPPO, A. G.; VISINTIN, J. A. Estudo comparativo do desenvolvimento de embriões murinos em diferentes sistemas de co-cultivo como modelo experimental em estudos de fecundação in vitro. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, p. 129, 2001. Suplemento. Trabalho apresentado à 14ª Reunião Anual do Instituto Biológico, São Paulo, 2001.

D'ANGELO, M.; GONÇALVES, R. F.; SILVA, S. A. C. M.; GALUPPO, A. G.; BARRA, S. H. C.; MELO, G. M. Evaluation of the development of murines embryos in vitro experimentally infected by herpesvirus bovine type 1. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 147, 2002. Supplement 1. Trabalho apresentado à 35th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, Baltimore, 2002 – Resumo n.122.

D'ANGELO, M.; GALUPPO, A. G.; GONÇALVES, R. F. Estudo comparativo da sensibilidade de culturas primárias de células epiteliais de oviduto bovino e murino ao BHV-1. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 4, p. 19-22, 2002.

D'ANGELO, M.; ATHAYDE, C. S.; SOUZA, R. J.; CARVALHO, J. F.; ZERIO, N. M. C.; MELO, G. M.; GALUPPO, A. G.; BERSANO, J. G. Avaliação morfológica de oócitos suínos expostos experimentalmente ao vírus da parvovirose suína (PPV) durante período de maturação in vitro. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 125, 2004. Suplemento. Trabalho apresentado à XVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, Barra Bonita, 2004.

D'ANGELO, M.; BARRA, S. H. C.; SILVA, S. A. C. M.; GALUPPO, A. G.; ZERIO, N. M. C.; MELO, G. M.; PITICO, E. M.; OKUDA, L. H. Desenvolvimento de embriões bovinos fertilizados in vitro expostos experimentalmente à *Neospora caninum*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 308, 2003. Suplemento. Trabalho apresentado à XVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, Beberibe, 2003.

D'ANGELO, M.; GALUPPO, A. G.; BARRA, S. H. C.; SILVA, S. A. C. M.; MELO, G. M.; ZERIO, N. M. C.; VIANA, N. S.; MELLO, M. R. B. Estudo comparativo do desenvolvimento de embriões de camundongo em sistemas de co-cultivo com células primárias e permanentes como modelo experimental em estudos de fecundação in vitro. **Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida**, v. 7, n. 1, p. 11-15, 2003.

D'ANGELO, M.; MELO, G. M.; GALUPPO, A. G.; ZERIO, N. M. C.; SOUZA, R. J.; FERREIRA, C. Y. M. R. Estudo morfológico de oócitos bovinos maturados in vitro e infectados experimentalmente com o BHV-1. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, p. 125, 2003. Suplemento 2. Trabalho apresentado ao 1º Congresso de Iniciação Científica em Ciências Agrárias e Ambientais-CICAM, São Paulo, 2003.

D'ANGELO, M.; SILVA, S. A. C. M.; SENEDEZI, M. L. P.; GONÇALVES, R. F.; GALUPPO, A. G.; BARRA, S. H. C.; MELO, G. M.; ZERIO, N. M. C. Morphological evaluation of mice zygotes experimentally infected by *Brucella abortus*. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 163, 2003. Supplement 1. Trabalho apresentado à 36th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, Cincinnati, 2003– Resumo n.124.

DEL FAVA, C.; ARCARO, J. R. P.; POZZI, C. R.; ARCARO JUNIOR, J.; FAGUNDES, H.; PITUCO, E. M.; DE STEFANO, E.; OKUDA, L. H.; VASCONCELLOS, S. A. Manejo sanitário para o controle de doenças da reprodução em um sistema leiteiro de produção semi-intensivo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, n. 1, p. 25-33, 2003.

DETILLEUX, P.G.; DEYOE, B. L.; CHEVILLE, N. F. Penetration and intracellular growth of *B. abortus* in nonphagocytic cells in vitro. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 7, p. 2320-2328, 1990.

GALUPPO, A. G.; D'ANGELO, M. Sensibilidade de embriões murinos ao vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina. **Arquivos da Faculdade de Medicina Veterinária UFRS**, v. 27, n. 1, p. 236, 1999. Suplemento 27. Trabalho apresentado à XIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, Campos do Jordão, 1999.

GALUPPO, A. G.; D'ANGELO, M.; GONÇALVES, R. F. Estudo comparativo da sensibilidade de culturas primárias de células epiteliais de oviduto bovino e murino ao vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 65, p. 99, 1998. Suplemento. Trabalho apresentado à 11ª Reunião Anual do Instituto Biológico, São Paulo, 1998 – Resumo n.150.

GALUPPO, A. G.; D'ANGELO, M.; PIATTI, R. M.; BARRA, S. H. C.; GONÇALVES, R. F. Detection of bovine herpesvirus type-1 (BHV-1) in experiments with in vitro infected murines zygotes by the nested-PCR technique. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 571, 2002. Suplemento. Trabalho apresentado à Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Foz do Iguaçu, 2002.

GONÇALVES, P. B. D.; VISINTIN, J. A.; OLIVEIRA, M. A. L.; MONTAGNER, M. M.; COSTA, L. F. S. Produção in vitro de embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FERITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002. p. 195-196.

GONÇALVES, R. F.; D'ANGELO, M.; GALUPPO, A. G. Uso da microscopia eletrônica de varredura na avaliação morfológica de células epiteliais de oviduto bovino in vitro. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 64, p. 150, 1997. Suplemento. Trabalho apresentado à 10ª Reunião Anual do Instituto Biológico, São Paulo, 1997 – Resumo n.60.

GRAZIANO, X. Olho no boi. **O estado de S.Paulo**, São Paulo, 10 mai. 2005. Espaço Aberto, v. 126, n. 40747, p. A2, 2005.

GUERIN, B.; BUILLY, J. P.; HUMBLLOT, P.; NIBART, M.; THIBIER, E. R. Effets de la contamination experimentale in vitro des embryones de souris et de brebis par *Campylobacter fetus*. **Bulletin de l'Académie Veterinari de France**, v. 61, p. 63-75, 1988.

GUERIN, B.; NIBART, M.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P. Sanitary risks related to embryo transfer in domestic species. **Theriogenology**, v. 47, p. 33-42, 1997.

HAWK, H. W.; KIDDY, C. A.; WILSON, J. B.; ESPOSITO, M.; WINTER, A. J. Bacteriological studies of uteri of clinically normal cows of low fertility. **Journal of Dairy Science**, v. 41, p. 120-128, 1958.

HOGAN, B.; CONSTANTINI, F.; LACY, E. Developmental genetics and embryology of the mouse: past, present, and future. In: _____. **Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual**. USA: Cold Spring Harbor Laboratory, 1986. p. 12-14.

IRITANI, A.; NIWA, K. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 50, p. 119-121, 1977

KRISHER, R. L.; BAVISTER, B. D. Responses of oocytes and embryos to the culture environment **Theriogenology**, v. 49, p. 103-114, 1998.

KRUIP, T. A. M.; BEVERS, M. M.; KEMP, B. Environment of oocyte and embryo determines health of IVP offspring. **Theriogenology**, v. 53, p. 611-618, 2000.

MALLEK, Z.; GUERIN, B.; NIBART, M.; PAREZ, M.; THIBIER, M. Conséquences de la contamination in vitro des embryons de souris et de vaches par *B. abortus*. **Bulletin de l'Académie Veterinari de France**, v. 57, p. 479-490, 1984.

MAPLETOFT, R.; STOOKEY, J. Procedimentos sanitários gerais e considerações de bem estar associadas com a produção in vivo de embriões. In: STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. (Ed.). **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3. ed. Jaboticabal: SBTE. 1998. p. 57-70.

BRASÍLIA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose**. Brasília: MAPA, 2001. p. 1-5.

NIBART, M.; MARQUANT-LE GUIENE, B.; HUMBLLOT, P. Procedimentos sanitários gerais associados com a produção in vivo de embriões. In: STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. (Ed.). **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3. ed. Jaboticabal: SBTE. 1998. p.71-81.

PASSOS, L. A. C.; GUARALDO, A. M. A.; ALVES, D. P.; PIRES, L. A.; SANTANA, T. M.; DINI, T. H. C. Criopreservação de embriões murinos em biotérios. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de Laboratório criação e experimentação**. 1. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz. 2002.p. 225-245.

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

POLLARD, J. W.; LEIBO, S. P. Comparative cryobiology of in vitro and in vivo derived bovine embryos. **Theriogenology**, v. 39, p. 287-293, 1983.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. Diseases caused by *Brucella* spp. **Veterinary Medicine**, p. 867-891, 2000.

RAMIREZ-ROMERO, R. Is *B. abortus* a facultative intracellular pathogen with mitochondria-like activity? **Medical hypotheses**, v. 51, p. 41-45, 1998.

REICHENBACH, H. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F.; SANTOS, A. S.; ANDRADE, J. C. O. Transferência e Criopreservação de Embriões Bovinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FERITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002. p. 127-177.

RIDELL, M. G.; STRINGFELLOW, D. A.; WOLFE, D. F.; GALIK, P. K. In vitro exposure of suine ova to *B. abortus*. **Theriogenology**, v. 31, p. 895-901, 1989.

RIDELL, M. G.; STRINGFELLOW, D. A.; WOLFE, D. F.; GALIK, P. K.; LAUERMAN, L. H. Seroconversion of recipient ewes after transfer of ova exposed to *Brucella ovis* in vitro. **Theriogenology**, v. 34, p. 965-973, 1990.

ROTH, F.; ZINSSTAG, J.; ORKHON, D.; CHIMED-OCHIR, G.; HUTTON, G. COVISI, O.; CARRIN, G.; OTTE, J. Human health benefits from livestock vaccination for brucellosis: case study. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 12, n. B1, p. 867-875, 2003.

SCHIEWE, M. Práticas de hygiene geral e controle de qualidade em um laboratório de produção de embriões. In: STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. (Ed.). **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3. ed. Jaboticabal: SBTE. 1998. p. 97-108.

SINGH, E. L.; THOMAS, F. C.; HARE, W. C. D.; EAGLESOME, M. D.; BIELANSKI, A. Non-transmission of infectious bovine rinotracheitis infectious pustular vulvovaginitis virus following trypsin treatment of exposed embryos. **Theriogenology**, v. 20, n. 2, p. 169-176, 1983.

SINGH, E. L.; THOMAS, F. C.; PAPP-VID, G.; EAGLESOME, M. D.; HARE, C. D. The 'in vitro' exposure of preimplantation bovine embryos to infectious BHV-1. **Theriogenology**, v. 18, p. 133-140, 1982.

STEPTOE, P. C.; EDWARDS, R. G. birth after the preimplantation of a human embryo. **Lancet**, v. 2, p. 366, 1978.

STRINGFELLOW, D. A. Recomendações para o manuseio sanitário de embriões obtidos in vivo. In: STRINGFELLOW, D. A., SEIDEL, S. M. (Ed.). **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3. ed. Jaboticabal: SBTE. 1998. p. 83-96.

STRINGFELLOW, D. A.; GIVENS, M. D. Epidemiologic concerns relative to in vivo and in vitro production of livestock embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 629-642, 2000a.

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

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

STRINGFELLOW, D. A.; GRAY, B. W.; SAPRLING, P. H.; PANANGALA, V. S.; GALIK, P. A.; YOUNG-WHITE, R. R. The effects of superovulation on Brucella abortus infection in the bovine uterus. **Theriogenology**, v. 23, n. 4, p. 701-709, 1985.

STRINGFELLOW, D. A.; HOWELL, V. L.; SCHNURRENBERGER, P. R. Investigations into the potential for embryo transfer from brucella abortus infected cows without transmission of infection. **Theriogenology**, v. 18, n. 6, p. 733-743, 1982.

STRINGFELLOW, D. A.; SCANLAN, C. M.; HANNON, S. S.; PANANGALA, V. S.; GRAY, B. W.; GALIK, P. A. Culture of uterine flushings, cervical mucus, and udder

secretions collected post-abortion from heifers artificially exposed to *B. abortus*. **Theriogenology**, v. 20, n. 1, p. 77-83, 1983.

STRINGFELLOW, D. A.; WOLFE, D. F.; LAUERMAN L. H.; SPARLING, P. H. Resistance of preimplantation bovine embryos to infection with *B. abortus*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, n. 9, p. 1924-1927, 1986.

THIBIER, M. Identified and unidentified challenges for reproductive biotechnologies regarding infectious diseases in animal and public health. **Theriogenology**, v. 56, p. 1465-1481, 2001.

VAN SOON, A.; VAN VLAENDEREM, I.; MAHMODZADEH, A.R.; DELEUYER, H.; KRUIF, A. Comparison rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. **Theriogenology**, v.38, p.905-915, 1992

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

WOLFE, D. F.; STRINGFELLOW, D. A.; RIDDEL, M. G.; LAUERMAN, L. H.; GALIK, P. K. Adherence of *Brucella ovis* to preimplantation ovine ova. **Theriogenology**, v. 30, p. 387-393, 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The development of new/improved Brucellosis vaccines: report of WHO meeting. **WHO: Emerging and other communicable diseases, surveillance and control**, Switzerland, 12 dez. 1997. Disponível em: <<http://www.who.int/emc-documents/zoonoses/docs/whoemczdi9814.pdf>>. Acesso em: 15 mai. 2005.

WRATHALL, A.; SUTMÖLLER, P. Potencial da transferência de embriões para controlar a transmissão de doenças. In: STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. (Ed.). **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3. ed. Jaboticabal: SBTE. 1998. p. 17-46.

WRIGHT, R. W.; ELLINGTON, J. Morphological and physiological differences between in vivo and in vitro produced preimplantation embryos from livestock species. **Theriogenology**, v. 44, p. 1167-1189, 1995.