EDUARDO GIMENES PALAZZI

EFETIVIDADE DA TRIPSINA SOBRE EMBRIÕES MURINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM BoHV-1

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2010

EDUARDO GIMENES PALAZZI

EFETIVIDADE DA TRIPSINA SOBRE EMBRIÕES MURINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM BoHV-1

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof[a]. Dra. Magali D'Angelo

São Paulo
2010

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Palazzi, Eduardo Gimenes.
Efetividade da tripsina sobre embriões murinos infectados experimentalmente com BoHV-1 / Eduardo Gimenes Palazzi. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Magali D'Angelo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Reprodução animal.

Versão do título para o inglês: . Effectiveness of trypsin on murine embryos experimentally infected with BoHV-1.

Descritores: 1. Rinotraqueíte infecciosa bovina 2. Tratamento com tripsina 3. Lavagem sequencial 4. Embriões murinos 5. Eficiência 6. Método de controle I. D'Angelo, Magali II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação Interunidade em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0166/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a): Eduardo Gimenes Palazzi.

Título da Dissertação: Efetividade da tripsina sobre embriões murinos infectados experimentalmente com BoHV-1.

Orientador(a): Magali D'Angelo.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CETEA-IB

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 88/09**, sobre o Projeto: **"EFETIVIDADE DA TRIPSINA SOBRE EMBRIÕES MURINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM BoHV-1"**, sob a responsabilidade de **Eduardo Gimenes Palazzi**, está de acordo com os princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório / Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA).

Protocolo aprovado pela *CETEA-IB* em 26 de agosto de 2009 e aprovada alteração do título em 25 de agosto de 2010.

São Paulo, 25 de agosto de 2009.

Dr. Ricardo Spacagna Jordão
Coordenador da *CETEA-IB*

CETEA - IB

Registro

Número : 088/09

Livro : 01

Folha : 88

Data: 26/08/2009

Dedico este trabalho a pessoa mais
iluminada do mundo que sempre esteve
em meu coração:
Adriana de Oliveira Palazzi

AGRADECIMENTOS

Ao “cara lá de cima” que sempre me dá uma chance quando tudo parece perdido e envia pessoas incríveis para minha superação.

Ao Instituto Biológico de São Paulo pela oportunidade e por ter dado o suporte necessário para a realização desse trabalho e especialmente ao Laboratório de Biologia Celular.

À minha Orientadora Professora Dra. Magali D’Angelo, que além de ser extraordinária em seu campo de atuação e exímia oradora, é, acima de tudo, uma pessoa que possui a essência para a vida: coração! Só uma pessoa assim poderia ter elevado meu conhecimento científico e de vida!

Ao Departamento de Biotecnologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo pela oportunidade maravilhosa.

À minha esposa, Adriana, pela paciência após tantos dias em casa enquanto eu estava pesquisando, por me dar banho quando nem me mexia, por me levar “pra cima e para baixo” enquanto não podia dirigir; pelas várias noites e dias no PS, pelas orações e por nunca ter me abandonado.....

Aos meus pais, Pércio e Luzia, minhas irmãs Simone e Cristiane, pelo amor que possuem por mim, por serem tão presentes na minha vida mesmo com a distância. E por estarem sempre “pro que der e vier”

Aos amigos do Laboratório de Biologia Celular, Mayra, Leandro, Mariana, Danielle, Andréia Morena, Andréia Loira, Roberta e Flavio que sempre me ajudaram muito.

Ao Prof. Paulo Michel Roehe da FEPAGRO Saúde Animal - IPVDF & ICBS-UFRGS (do Rio Grande do Sul) pela extrema paciência, simpatia e pelo fornecimento dos vírus.

À Flavia da veterinária da USP, pela gentileza em fornecer pronase para nosso trabalho.

À Dona Maria Luiza, pelo apoio técnico e amizade.

À todos do Laboratório de Viroses dos Bovídeos. Especialmente à Dra Edviges Maristela Pitucco, Dra Eliana De Stefano, Dra Adriana, Dra Liria Hiromi Okuda, pesquisadora Nara T. C. Galleti (futura Dra) não só por terem cedido células MDBK e feito o teste de PCR, mas pelo extremo profissionalismo, educação e colaboração.

À Leda, Meire, Magali, Leandro e ao Dr Ricardo do Laboratório de Produção de Imunobiológicos. Por estarem sempre dispostos a ajudar e por cederem o biotério do laboratório em momento de emergência para prosseguir com meus experimentos.

À Rosa Maria Piatti, do Laboratório de doenças bacterianas da reprodução, por ser tão atenciosa e pela disponibilidade mesmo com a agenda apertada de pesquisadora.

À Embriocare – Cultilab por contribuir com grande parte do material utilizado nessa pesquisa.

À Helena da Intervet por ceder os hormônios que foram essenciais para nosso trabalho

Aos meus grandes companheiros: Joni, Deco, Zeck e, especialmente, ao “Toquinho”, que esteja no céu passeando por campos floridos.....

Ás pesquisadoras do Instituto Biológico Simone e Cristiane que se prontificaram a me ajudar. Ajuda ‘de coração’ não tem preço!

Ao Professor Plínio pelo empenho e ajuda fundamental com o texto.

À Professora Sandra Eiko pelas aulas que possibilitaram vencer mais uma etapa em minha vida.

À Zenailde por colaborar na manutenção do laboratório.

À Luzia e Ricardo do Instituto Biológico pelo fornecimento do cilindro de CO_2 e, principalmente, pela disposição em ajudar.

A todos professores da Biotecnologia, em especial para Prof^a. Elisabete José Vicente, Prof^a. Ana Clara Guerrini Schenberg_, Profª Heloiza Ramos Barbosa, Pro^{a}f Luiziana Ferreira da Silva, Prof^a. Júlia Baruque Ramos, Prof^a. Soraia Attie Calil Jorge, Prof. José Gregório Cabrera Gomez, Prof. José Antonio Visintin,

À Eliane, Fábia e Marcos da Secretaria de Biotecnologia pela eficiência, simpatia, dedicação e, sobretudo, por serem pessoas sensacionais!

Ao Erick e Fernanda da Secretaria do Instituto de Biológico de SP por terem colaborado de forma significativa comigo.

À Biblioteca do ICB pelos serviços de qualidade e, em especial, à bibliotecária Mônica pela paciência, simpatia e profissionalismo.

À Maria Jeovânia, Marília Carolina, Marisilda Albanese, Veronika Albanese, ao Sr Leur Ribeiro da triagem Animal do Instituto Biológico de SP pela colaboração na recepção do vírus e pela amizade. Vocês são demais.

À Dra Marta Braggio pelo respeitos aos animais e pelo suporte inigualável.

“Onde você coloca o sal?

O velho pediu a um jovem triste que colocasse uma mão cheia de sal em um copo d'água e bebesse.

-Qual é o gosto? Perguntou o velho. -Ruim, disse o jovem.

O velho sorriu e pediu ao jovem que pegasse outra mão cheia de sal e levasse a um lago.Os dois caminharam em silêncio e o jovem jogou o sal no lago.

Então o velho disse:-Beba um pouco dessa água.

Enquanto a água escorria do queixo do jovem o velho perguntou: -Qual é o gosto? -Bom!, disse o rapaz.-Você sente o gosto do sal?, perguntou o velho.-Não..., disse o jovem.O velho, então, sentou ao lado do jovem, pegou em suas mãos e disse:

-A dor na vida de uma pessoa não muda. Mas o sabor da dor depende de onde a colocamos. Quando você sentir dor, a única coisa que você deve fazer é aumentar o sentido de tudo o que está a sua volta. É dar mais valor ao que você tem, do que ao que você perdeu. Em outras palavras: É deixar de ser copo para tornar-se um lago.

Somos o que fazemos, mas somos principalmente, o que fazemos para mudar o que somos...”

(Autor desconhecido)

RESUMO

PALAZZI, E. G. **Efetividade da tripsina sobre embriões murinos infectados experimentalmente com BoHV-1.** 2010. 77 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Atualmente, o Brasil possui destaque como um dos maiores exportadores de carne bovina do mundo. O motivo do grande sucesso provém de condições favoráveis como o clima, extensão territorial, adaptabilidade do gado Nelore, além de técnicas bem sucedidas como a criopreservação de embriões que impulsionou a comercialização da transferência de embriões (TE) e da fertilização *in vitro* (FIV). Com a possibilidade da propagação de embriões, desenvolveu-se preocupação com a transmissão de doenças infecciosas. Visando assegurar o controle da transmissão de patógenos através da produção e transferência de embriões *in vitro,* a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) sugere uso de técnicas, como, por exemplo, a lavagem seqüencial (LS) e o tratamento com tripsina (TT). O objetivo desse trabalho foi avaliar a efetividade do tratamento com tripsina na eliminação do herpersvírus bovino tipo 1, estirpe Colorado (BoHV-1 Colorado), causador da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (RIB) em embriões murinos. Utilizamos como parâmetros para essa avaliação n-PCR, cultura de zigotos em células MDBK, alterações morfológicas e taxa de clivagem observada por microscopia óptica, além do teste χ^2 ($p<0,05$). Camundongos fêmeas Swiss, com idade entre 6 e 8 semanas, foram superovuladas com 0,2mL a 5UI de hormônio eCG e, após 48h com hCG e acasaladas com machos inteiros da mesma linhagem e idade. Após 18 h, as fêmeas foram eutanasiadas em câmara de CO_2 e, através de abertura no peritônio, os zigotos foram coletados e lavados com solução de pronase 0,5% a 37 ºC, para total remoção de células do cumulus. Foram separados zigotos para cinco ensaios. No primeiro ensaio, os zigotos (n=664) foram divididos em grupo controle, 'grupo C', e grupo exposto, 'grupo E', à 30µL de BoHV-1 Colorado ($10^{6,5}$ $TCID_{50}$/mL), mantidos em meio TCM199, levados à estufa a 38 °C, 5% de CO_2 e 95% de umidade. Após 24 horas, por microscopia óptica, apenas no 'grupo E' foram verificadas alterações morfológicas, como, por exemplo, embriões com citoplasma granuloso, aspecto degenerativo e falha na divisão. A taxa de clivagem no grupo C foi de 54% (190/351)

e a do ‘grupo E’ foi de 44% (139/313). Verificou-se diferença significativa com relação à taxa de clivagem entre esses dois grupos (P<0). Os prováveis danos que o TT poderia ocasionar foram avaliados no segundo ensaio. Zigotos (n=162) não expostos ao vírus foram separados em dois grupos: submetidos à LS, ‘grupo C_{LS}’, e ao TT, ‘grupo C_{TT}’, Após 96h, os embriões não apresentaram diferenças morfológicas. A taxa de clivagem do ‘grupo C_{LS}’ foi de 21,2% (18/85) e a do ‘grupo C_{TT}’ foi de 18,2% (14/77). Não houve diferença significativa com relação à taxa de clivagem entre esses dois grupos (P>0). No terceiro ensaio, os zigotos (n=165) foram divididos em 2 grupos: o grupo exposto ao vírus e submetido à LS, ‘grupo E_{LS}’, e o grupo exposto ao vírus e submetido ao TT, ‘grupo E_{TT}’. Os embriões do ‘grupo E_{LS}’ apresentaram alterações morfológicas, como citoplasma com granulação e aspecto degenerativo e blastômeros assimétricos Os embriões do ‘grupo E_{TT}’, não apresentaram alterações morfológicas após 96 h. A taxa de clivagem no ‘grupo E_{LS}’, foi de 13,8% (11/80), e a encontrada no ‘grupo E_{TT}’ foi de 17,5% (17/97). Verificou-se que não houve diferença significativa com relação à taxa de clivagem entre esses dois grupos (P>0). No quarto ensaio, os embriões e as últimas gotas dos ‘grupos C_{LS}’, ‘E_{LS}’ e ‘E_{TT}’ foram mantidos em gotas de 100μL de TCM199 suplementado com 10% de SFB e 0,2% de piruvato de sódio, sob óleo mineral estéril, levados à estufa a 38 °C, 5% de CO_2 e 95% de umidade e, após 96h, separados para o teste de n-PCR. Exceto para o ‘grupo C_{LS}’, foram encontrados resultados positivos, tanto para embriões quanto para as últimas gotas dos ‘grupos E_{LS}’ e ‘E_{TT}’. Para verificar a viabilidade dos vírus, no quinto ensaio, os embriões e últimas gotas dos ‘grupos C_{LS}’, ‘E_{LS}’ e ‘E_{TT}’ foram inoculados em células MDBK. Após 48h, só não foi encontrado efeito citopático (ECP) nas células MDBK que foram inoculadas pelo ‘grupo C_{LS}’. Estes resultados demonstram que o TT não foi efetivo para eliminar o BoHV-1 Colorado, porém em alguns ensaios o TT demonstrou eficiência na inativação do vírus o que torna-o um importante método de controle.

Palavras-chave: Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR). Tratamento com tripsina (TT). Embriões murinos. Nested-PCR. Método de controle. MDBK.

ABSTRACT

PALAZZI, E. G. **Effectiveness of trypsin on murine embryos experimentally infected with BoHV-1.** 2010. 77 f. Master thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Currently, Brazil has highlighted as a major exporter of beef in the world. The reason for the success comes from favorable conditions as climate, territorial, adaptability of Nelore cattle, and successful techniques such as embryo cryopreservation, which boosted the sale of embryo (ET) and in vitro fertilization (IVF). With the possibility of the spread of embryos the concern about the transmission of infectious diseases arose. Aiming to ensure the control of transmission of pathogens through the production and transfer of embryos in vitro, the International Embryo Transfer Society (IETS) suggests using techniques such as, for example, sequential washing (LS) and treatment with trypsin (TT). The aim of this study was to evaluate the effectiveness of treatment with trypsin in the elimination of herpersvírus bovine type 1, strain Colorado (Colorado BoHV-1), which causes Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) in murine embryos. As parameters for this n-PCR evaluation, culture of zygotes in Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) morphological changes and cleavage rate have been observed by optical microscopy, besides the χ^2 test ($p < 0.05$). Female Swiss mice aged between 6 and 8 weeks, were superovulated with 0.2 mL 5UI hormone eCG and 48h after whit hCG and mated with males of the same lineage and age. After 18 h, the female were euthanized in CO_2 chamber and through an opening in the peritoneum, the zygotes were collected and washed with 0.5% pronase solution at 37°C for the complete removal of cumulus cells. Zygotes for five tests were separated. In the first experiment, zygotes (n = 664) were divided into control group, 'group C', and exposed group, 'group E', 30µL of the BoHV-1 Colorado ($10^{6.5}$ $TCID_{50}$/mL) kept in TCM199 and taken to incubator at 38 °C, 5% CO_2 and 95% humidity. After 24 h, by optical microscopy, only in 'group E' morphological changes were observed, for example, embryos with granular cytoplasm, degenerative appearance and fails in the division. The cleavage rate in 'group C' was 54% (190/351) and in 'group E' was 44% (139/313). There was significant difference regarding the rate of cleavage between these two groups ($P < 0$). The likely injuries that TT could lead were assessed in the second test. Zygotes (n = 162) not exposed

to the virus were separated into two groups: undergone LS, ‘C_{LS} group’; and undergone TT, ‘C_{TT} group’. After 96h, the embryos showed no morphological differences. The rate of cleavage of the ‘C_{LS} group’ was 21.2% (18/85) and the ‘C_{TT} group’ was 18.2% (14/77). No significant difference regarding the rate of cleavage between these two groups (P> 0). In the third test, the zygotes (n = 165) were divided into two groups: the group exposed to the virus and undergone LS, ‘E_{LS} group’; and the group exposed to the virus and undergone to the TT, ‘E_{TT} group’. The embryos of ‘E_{LS} group’ showed morphological changes such as granulation in the cytoplasm with degenerative appearance and asymmetrical blastomeres. ‘E_{TT} group’ Embryos showed no morphological changes after 96 h. The cleavage rate in the ‘group $E_{LS'}$, was 13.8% (11/80), and the one in the E_{TT} group was 17.5% (17/97). There was no significant difference regarding the rate of cleavage between these two groups (P> 0). In the fourth test, embryos and the last drops of ‘groups C_{LS}’, ‘E_{LS}’ and ‘E_{TT}’ were kept in drops of 100 μl of TCM199 supplemented with 10% FCS and 0.2% sodium pyruvate, under sterile mineral oil, taken to incubator at 38 °C, 5% CO2 and 95% humidity and after 96 hours, separated into the n-PCR test. Except for the ‘C_{LS} group’, positive results for both zygotes/embryos and for the last drops of ‘E_{LS}’ and ‘E_{TT}’ groups were detected. To check the viability of virus in the fifth test, the zygotes/embryos and last drops of ‘groups C_{LS}’, ‘E_{LS}’ and ‘E_{TT}’ were inoculated in MDBK. After 48 h, cytopathic effect (CPE) was not found only in MDBK cells, which were inoculated by the ‘C_{LS} Group’. These results demonstrate that the TT, was not effective to eliminate the BoHV-1 Colorado, but some tests showed the TT efficiency in inactivating the virus which makes it an important method of control.

Keywords: Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR). Trypsin treatment (TT). Murine embryos. Nested-PCR. Method of control. MDBK.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

µl: microlitro

BOEC: Células epiteliais de oviduto bovino

BoHV-1 Colorado: Herpesvírus Bovino tipo 1 estirpe Colorado

C: Grupo não exposto ao BoHV-1 Colorado

C_{LS}: Grupo não exposto ao BoHV-1 Colorado e submetido à LS

$C_{LS.e}$: Embriões do grupo não exposto ao BoHV-1 Colorado e submetido à LS

$C_{LS.z}$: Zigotos do grupo não exposto ao BoHV-1 Colorado e submetido à LS

C_{TT}: Grupo não exposto ao BoHV-1 Colorado e submetido ao TT

$C_{TT.e}$: Embriões do grupo não exposto ao BoHV-1 Colorado e submetido ao TT

$C_{TT.z}$: Zigotos do grupo não exposto ao BoHV-1 Colorado e submetido ao TT

$C_{TT.ug}$: Última gota do grupo não exposto ao BoHV-1 Colorado e submetido ao TT

ºC: Graus Célsius

CO_2: Gás Carbônico

CPE : Efeito Citopático

DNA: Ácido desoxiribonucléico

eCG: gonadotrofina coriônica eqüina

FIV: Fecundação *in vitro*

h: horas

hCG: gonadotrofina coriônica humana

IBR: Rinotraqueíte Infecciosa Bovina

E: Grupo exposto ao BoHV-1 Colorado

E_{LS}: Grupo exposto ao BoHV-1 Colorado e submetido à LS

$E_{LS.e}$: Embriões do grupo exposto ao BoHV-1 Colorado e submetido à LS

$E_{LS.z}$: Zigotos do grupo exposto ao BoHV-1 Colorado e submetido à LS

$E_{LS.ug}$: Última gota do grupo exposto ao BoHV-1 Colorado e submetido à LS

E_{TT}: Grupo exposto ao BoHV-1 Colorado e submetido ao TT

$E_{TT.e}$: Embriões do grupo exposto ao BoHV-1 Colorado e submetido ao TT

$E_{TT.z}$: Zigotos do grupo exposto ao BoHV-1 Colorado e submetido ao TT

$E_{TT.ug}$: última gota do grupo exposto ao BoHV-1 Colorado e submetido ao TT

IETS: Sociedade Internacional de Transferências de Embrião

Kpb: Kilo pares de bases

LS: Lavagem Seqüencial

MDBK: Madin Darby Bovine Kidney - Linhagem estabelecida de rim bovino

MEM: Meio Mínimo Essencial (Eagle)

ml: Mililitros

NaCl: Cloreto de sódio

n-PCR: nested PCR

OIE: Organização Mundial de Saúde Animal

PBS: Solução Salina Fosfatada Tamponada

PCR: Reação em polimerase em cadeia pela Polimerase

ph: Potencial hidrogenionico

PIV: Produção *in vitro*

rpm: rotações por minutos

SFB: Soro Fetal Bovino

TCID: Dose Infectante 50% em cultura de tecido

TCM 199: Meio de Cultivo celular 199

TE: Transferência de Embriões

TT: Tratamento com tripsina

UI: Unidade Internacional

ZP: Zona Pelúcida

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 19
1.1 Doença..... 19
1.2 Etiologia..... 20
1.3 Transmissão..... 21
1.4 Transmissão da IBR pela Técnica de fertilização "in vitro"..... 22
1.5 Hipótese..... 24
2 OBJETIVOS..... 25
3 MATERIAL E MÉTODOS..... 26
3.1 Linhagem estabelecida de rim bovino (MDBK)..... 26
3.2. Vírus..... 26
3.3 Métodos de detecção do BoHV-1 em cultivo de células através do efeito citopático..... 26
3.3.1 Titulação do vírus..... 26
3.4 Animais..... 27
3.4.1 Camundongos Swiss..... 27
3.4.2 Superestimulação Ovariana..... 27
3.4.3 Coleta dos zigotos..... 28
3.5 Avaliação da morfologia e taxa de clivagem de zigotos expostos ao BoHV-1 após 24h de contaminação- Experimento 1..... 30
3.6 Avaliação de alterações morfofisiológicas em embriões submetidos ao tratamento com tripsina e não expostos aos vírus- Experimento 2..... 31
3.7 Avaliação dos embriões expostos aos vírus e submetidos ao tratamento com tripsina após 96h- Experimento 3..... 33
3.8 Avaliação do tratamento com tripsina na eliminação do vírus BoHV-1 pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase - Experimento 4..... 35
3.8.1 Detecção do BoHV-1 Colorado nas amostras pela nested-PCR..... 37
3.8.1.1 Identificação viral do BoHV-1 Colorado..... 37
3.8.1.2 Extração do DNA..... 37
3.8.1.3 Iniciadores..... 38
3.8.1.4 Reações de PCR..... 39

3.9 Avaliação do tratamento com tripsina na eliminação do vírus BoHV-1 pela observação do efeito citopático em célula MDBK- Experimento 5..... 40
4 RESULTADOS..... 42
4.1 Avaliação da morfologia e taxa de clivagem de zigotos expostos ao BoHV-1 após 24h de contaminação- Experimento 1..... 42
4.1.1 Análise morfológica..... 42
4.1.2 Análise estatística..... 44
4.2 Avaliação de alterações morfofisiológicas em embriões submetidos ao tratamento com tripsina e não expostos ao BoHV-1- Experimento 2..... 45
4.2.1 Análise morfológica..... 45
4.2.2 Análise estatística..... 45
4.3 Avaliação dos embriões expostos aos vírus e submetidos ao tratamento com tripsina após 96h- Experimento 3..... 46
4.3.1 Análise morfológica..... 46
4.3.2 Análise estatística..... 48
4.4 Avaliação da eficácia do tratamento com tripsina na eliminação do BoHV-1 pela n-PCR- Experimento 4..... 48
4.4.1 Detecção..... 48
4.4.2 Análise estatística..... 54
4.5 Avaliação do tratamento com tripsina na eliminação do vírus BoHV-1 pela observação do efeito citopático em célula MDBK- Experimento 5..... 55
4.5.1 Análise morfológica..... 55
4.5.2 Análise estatística..... 57
4.6 Relação entre co-cultura e n-PCR..... 60
4.6.1 Taxa referente à eficiência do tratamento com tripsina em relação ao número de embriões..... 60
5 DISCUSSÃO..... 63
6 CONCLUSÕES..... 69
REFERÊNCIAS 70

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior exportador de carne bovina do mundo. São mais de 2 milhões de toneladas ao ano, atingindo em 2007 uma quantia de quase 5 bilhões de dólares. Detentor do maior rebanho comercial do mundo, com 202 milhões de cabeças (IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2007). O motivo do grande sucesso no Brasil provém de condições favoráveis como o clima, extensão territorial, adaptabilidade do gado Nelore, além de técnicas bem sucedidas como a criopreservação de embriões que impulsionou a comercialização da transferência de embriões (TE) e da fertilização *in vitro* (FIV).

A possibilidade da propagação de embriões trouxe a preocupação com a transmissão de doenças infecciosas. Para que uma doença infecciosa seja transmitida por TE ou FIV, o agente deve estar presente no embrião em associação à zona pelúcida (ZP) ou nos líquidos nos quais o embrião é transferido (SINGH, 1987; BOLIN et al*.,* 1983).

Portanto fica evidente a necessidade do desenvolvimento de métodos eficientes de baixo custo através do estudo das interações de embriões-patógenos, para auxiliar no controle da transmissão de doenças, como a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), via técnicas conceptivas artificiais.

1.1 Doença

O nome herpes, do Latim *herpes*, tem origem na palavra grega *herpein* que significa arrastar-se, referindo-se à natureza de disseminação das lesões na pele causadas por muitos tipos de herpesvírus. O BoHV-1 pertencem a família *Herpesviridae* e subfamília *Alphaherpesvirina*e. São considerados uns dos principais agentes causadores de doenças virais em humanos e animais (HUNT, 2005).

Outra propriedade muito importante apresentada por, virtualmente, todos os herpersvírus é a capacidade de causarem infecções inaparentes ou latentes. A latência é caracterizada pela ausência de replicação viral e de sinais clínico, e dura toda a vida do hospedeiro (FLORES, 2007). O herpesvírus bovino (BoHV) é um importante patógeno de bovinos, podendo causar a doença respiratória, conhecida como rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), além de conjuntivite, vulvovaginite

pustular infecciosa (IPV), balanopostite pustular infecciosa (IPB), reabsorção embrionária, aborto, infertilidade temporária, nascimento de animais fracos e infecções sistêmicas que podem resultar em meningoencefalite (CERQUEIRA et al., 2000; VIEIRA et al., 2003).

O BoHV-1 têm distribuição mundial e é descrito como um problema sanitário que causa perdas produtivas (COLODEL et al., 2002**;** KUNRATH et al., 2004). Foi isolado pela primeira vez em 1950, nos Estados Unidos (EUA), mas somente na década de 60, os aspectos respiratórios graves da infecção por esse agente tornaram-se proeminentes naquele país.

Na Europa, a forma de IBR mais grave foi relatada em princípios de 1972 (EDWARDS, 1988; ACKERMANN et al., 1990). No Brasil, o primeiro isolamento desse patógeno ocorreu em 1978, no estado da Bahia, a partir de pústulas vaginais (ALICE, 1978). Nesse mesmo ano, em São Paulo, o BoHV-1 foi isolado de um rim de feto bovino proveniente de matadouro (MUELLER et al., 1978) e, mais tarde, de casos de aborto (NOGUEIRA et al., 1986). O BoHV-1 está disseminado por todas as regiões do Brasil, atingindo elevados índices de infecção nos rebanhos (PITUCO et al., 1999). Dados do Laboratório de Viroses de Bovídeos do Instituto Biológico, referentes ao período de janeiro de 2001 a dezembro de 2002, mostram que de 398 fetos recebidos de vários Estados, de rebanhos com problemas reprodutivos, 1,51% (6/398) foram positivos ao BoHV-1 e que de 11.892 amostras de soro recebida, 48% (5694/11892) foram sororeagentes.

1.2 Etiologia

Seu genoma apresenta uma fita dupla de DNA de aproximadamente 137-139 kpb (FIELDS e KNIPE,1992). Estudos de restrição enzimática possibilitaram a divisão do BoHV-1 em três subtipos*:* BoHV-1.1, BoHV-1.2a e BoHV-1.2b . A importância biológica desta classificação não está bem definida, porém uma menor virulência tem sido indicada para o subtipo 2b, o qual parece não causar aborto, enquanto os subtipos BoHV1.1 e BoHV1.2a têm sido isolados de fetos bovinos abortados (MILLER,1991).

Os herpesvírus partilham quatro propriedades biológicas principais:

1. Todos os herpesvírus produzem enzimas envolvidas no metabolismo do ácido nucléico, na síntese de DNA e no processamento de proteínas;
2. A síntese do DNA viral e a montagem do capsídeo ocorrem no núcleo;
3. A produção da progênie viral é sempre acompanhada pela destruição irreversível da célula infectada;
4. Todos os herpesvírus são capazes de estabelecer latência em seus hospedeiros naturais (FIELDS et al., 2001).

Como todos *Alphaherpesvirinae*, o BoHV-1 permanece em estado de latência, alojando-se nos gânglios nervosos, principalmente no trigêmeo e sacral, podendo ser reativado em situações estressantes como parto, transporte, vacinações ou com a administração prolongada de corticóides (ACKERMANN et al., 1982).

O vírus em estado de latência permanece como epissomo em vários tipos celulares e não é detectado por procedimentos virológicos convencionais e pode apresentar subseqüentes e intermitentes episódios de reexcreção viral, não acompanhados de sinais clínicos.

O estabelecimento de imunidade celular e humoral, pós-infecção ou mesmo pós-vacinação, não elimina o estado de latência. Com isso, uma vez infectado por BoHV-1, o animal será sempre portador e potencial transmissor do vírus por toda a sua vida (FENNER, 1993).

1.3 Transmissão

As infecções pelo BoHV-1 podem ser transmitidas pelo contato direto e indireto entre animais, porque o vírus é disseminado através de secreções respiratórias, oculares e genitais, sendo excretado em grandes quantidades por animais durante a infecção aguda. Nessa fase, os animais excretam o vírus por até 15-16 dias em títulos de até 10^7 $TCID_{50}$/ml sendo que a dose mínima para infectar uma fêmea foi calculada em torno de 10^2 $TCID_{50}$/ml (FLORES, 2007).

Após a infecção, ocorre a replicação do vírus nas células epiteliais das membranas mucosas e a disseminação do BoHV-1 pelo organismo por 3 vias: célula-a-célula, nervosa e sanguínea. O mecanismo de transmissão célula-a-célula é característica dos herpesvírus e ocorre sem fase extracelular, através de pontes intercelulares, sendo por essa razão que os o vírus ficam inacessíveis à ação de

anticorpos específicos (ENGELS, ACKERMANN, 1996; LEMAIRE, PASTORET, THIRY, 1994; STRAUB, 1990).

A característica mais importante da IBR é a capacidade de latência (quando o vírus permanece inativo nas células dos gânglios e tecido nervoso) não sendo detectado pelos exames tradicionais e pode ser reativado a qualquer momento quando o animal é submetido a alguma situação de estresse ou tratamento com drogas imunossupressoras tornando-se novamente transmissor do vírus ao meio ambiente através das secreções corporais. Por isso o vírus pode persistir por vários anos em animais clinicamente curados sendo estes considerados como fonte de infecção. Essa virose esta presente em plantéis bovinos de praticamente todo o mundo.

A taxa de animais positivos varia muito de uma região para outra, dependendo também do tipo de exploração pecuária realizado na propriedade (confinamento, extensiva, leiteira, corte). Quanto maior o contato entre os animais maior é o contágio (FERREIRA, 2003).

1.4 Transmissão da IBR pela Técnica de fertilização "*in vitro*"

Em 2000, o número de transferências comunicadas foi de 69.400, o que representa 13,13% do total de transferências do mundo. A partir deste ano, observou-se um contínuo e expressivo aumento, tanto da TE quanto da FIV, atingindo, em 2006, o total de 196.663 embriões produzidos *in vitro* e 69.886 embriões produzidos *in vivo* (VIANA e CAMARGO, 2007). Segundo a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), em 2005 o Brasil ocupou a segunda posição na aplicação desta técnica, perdendo apenas para os EUA.

O sucesso dessas novas tecnologias representa um desafio para o controle da transmissão de doenças, pois produzem novos ambientes e manipulação excessiva do material, possibilitando maior chance de contaminação e disseminação de patógenos (STRINGFELLOW, GIVENS, WALDROP, 2004).

A produção de embriões *in vitro* (PIV) e a transmissão ou controle de patógenos tem sido estudado através de várias abordagens. Na abordagem "*in vivo - in vivo*", os embriões são colhidos de doadoras infectadas e transferidos para

receptoras livres da infecção, que são monitoradas quanto a soroconversão e ao desenvolvimento da doença. Na abordagem "*in vivo -in vitro*" os embriões são coletados de doadoras infectadas e então o agente é estudado *in vitro*. Outra abordagem é a "*in vitro - in vivo*", na qual embriões de doadoras saudáveis são expostos ao agente *in vitro* e então transferidos para receptoras sadias, que são monitoradas para evidenciar a ocorrência de infecção subseqüente a TE. Por fim, temos a abordagem "*in vitro - in vitro*", onde embriões de doadoras saudáveis são expostos ao agente *in vitro* e então testados *in vitro* (STRINGFELLOW et al., 2004).

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. Mesmo 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. Contudo, o número de embriões usados nos experimentos *in vivo* é freqüentemente muito baixo o que não permite extrair conclusões significativas sobre as possibilidades de transmissão da doença, o que torna o estudo *in vitro* de extrema importância (WRATHALL, SUTMÖLLER, 1998).

Aproximadamente 80-90% dos embriões bovinos transferidos mundialmente nos últimos anos foram obtidos por meio da TE. A cada ano e com maior freqüência a TE tem se tornado uma ferramenta básica em programas de reprodução de bovinos. Como conseqüência natural desse desenvolvimento, observa-se o crescente interesse na relação entre a TE e a transmissão de doenças infecciosas, bem como o estudo da interação entre os embriões e os microrganismos patogênicos. Os agentes infecciosos presentes no trato reprodutivo dos bovinos podem reduzir o número e a qualidade dos embriões produzidos, resultando em doenças nas receptoras e nos animais nascidos, além de poderem alterar significativamente resultados de experimentos e pesquisas relacionados ao desempenho de novas tecnologias da reprodução animal (STRINGFELLOW e GIVENS, 2000).

A FIV tem sido objeto de estudo na transmissão ou controle de patógenos sob diversos aspectos. Tem sido objeto de estudo, o potencial para exposição dos embriões a patógenos específicos, a natureza das interações embrião-patógeno e os efeitos das lavagens e do tratamento com tripsina sobre as interações embrião-patógeno (SIGNH et al., 1982; SIGNH et al., 1983; STRINGFELLOW et al., 1989;

BIELANSKI et al., 1996a; BIELANSKI et al., 1996b; SAKKAS,1992; VANROOSE et al., 1996).

A PIV utilizando ovários e ovidutos bovinos colhidos em abatedouros é um procedimento viável e já estabelecido, porém, ao não se conhecer o estado da doadora, não podemos assegurar a qualidade dos oócitos, além da possibilidade da presença de patógenos como o BoHV-1, causador da Rinitraqueíte Infecciosa Bovina (IBR). Essa doença pode causar infertilidade e seu agente, o BoHV-1, pode estar presente nos ovários, ovidutos, e líquidos foliculares de animais aparentemente sadios, o que pode aumentar o risco de sua transmissão (BIELANSKI e DUBUC, 1994; GUERIN et al., 1989).

Guérin et al. (1989) realizaram infecção experimental com estirpe Colorado em vacas doadoras e encontraram na fase aguda da enfermidade oócitos associados aos vírus. Ferreira (2003) encontrou alterações morfológicas mais acentuadas com a estirpe Colorado em comparação com a estirpe Los Angeles devido à adaptabilidade da segunda em relação à primeira.

1.5 HIPÓTESE

O Tratamento com Tripsina sugerido pela IETS (*Internacional Embryo transfer Society*) pode não ser efetivo na eliminação do herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1).

2 OBJETIVOS

Foram destacados os seguintes objetivos neste estudo:

2.1 Avaliar *in vitro* a sensibilidade em embriões murinos frente ao vírus BoHV-1 (Colorado) e fornecer subsídios para o estudo das interações embriões-patógenos;

2.2 Verificar se o tratamento com tripsina padronizado pela IETS é efetivo para eliminar o BoHV-1(Colorado).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagem estabelecida de rim bovino (MDBK)

Linhagem estabelecida de rim bovino, Madin Darby Bovine Kidney (MDBK), mantidas em meio Eagle MEM suplementado com 10% de SFB, bicarbonato e 100 μg/ml de gentamicina, em estufa de CO_2 à 5%, 95% de umidade à 38 ^{0}C. Procedência das células: Laboratório de Viroses de Bovídeos do Centro de Sanidade Animal do Instituto Biológico.

3.2 Vírus

Vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina, amostra Colorado, com título de $10^{6,5}$ $TCID_{50}$ /ml, mantida em meio Eagle MEM sem soro à – 80 ^{0}C. A amostra foi cedida pela Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO) e Instituto de Ciências Básicas da Saúde - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICBS-UFRGS).

3.3 Métodos de detecção do BoHV-1 em cultivo de células através do efeito citopático

As amostras foram inoculadas em monoestratos de células MDBK e, após 48h de incubação a 38 °C em estufa com 5% de CO_2 e 95% de umidade, foi verificada a presença ou não de efeito citopático (CPE). O BoHV-1 Colorado induz um CPE focal, com arredondamento das células e subseqüente lise.

3.3.1 Titulação do vírus

Volumes de 0,1ml contendo $3x10^4$ (30.000) células foram distribuídos em cada cavidade de placas de microtitulação. As placas foram incubadas a 37-38 ^{0}C em estufa com 5% de CO_2 e, após 24 horas, lavadas com solução salina de Hanks. Os monoestratos foram inoculados com 0,1ml de diluições de base 10 variando de 10^{-1} a 10^{-8} das amostras dos sobrenadantes das culturas infectadas. As placas foram novamente incubadas nas condições já descritas e examinadas após 24 e 48 horas

para a verificação da ocorrência de CPE. Os títulos foram calculados em dose infectante por cultura de tecido 50% ($TCID_{50}$/ml) expressa em logaritmo decimal (REED e MUENCH, 1938).

3.4 Animais

Foram utilizados 60 camundongos Swiss da colônia do biotério da ANILAB - Animais de Laboratório Criação e comércio LTDA- Paulínia-SP.

3.4.1 Camundongos Swiss

Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno contendo cama de maravalha de pinho branco autoclavada (121 ºC/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 ºC, umidade de 50% e foto período de 12h de claro por 12h de escuro (BRAGGIO, MARTINS, VALERO, 2003). 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.

3.4.2 Superestimulação Ovariana

Os hormônios utilizados para superestimulação ovariana foram a gonadotrofina coriônica eqüina (eCG/PMSG) (Folligon® 5000 UI- International B.V.Boxmeer-Holanda) e a gonadotrofina coriônica humana (hCG) (CHORULON® 5000- International B.V.Boxmeer-Holanda). Os hormônios liofilizados foram ressuspendidos em solução estéril de 0,9% de NaCl na concentração de 25UI/mL e mantidos, protegidos da luz, fracionados e congelados (-20 ºC) até o momento do uso. Foram injetados, com agulha de 16x0,5mm, 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 e depois de 18h foi realizada a coleta dos zigotos (Quadro 1) (HOGAN, CONSTANTINI, LACY, 1986).

Quadro 1: Etapas do processo de superovulação.

3.4.3 Coleta dos zigotos

Os animais foram anestesiados em uma câmara de CO_2 (Figuras 1A e 1B) e, logo após, submetidos à eutanásia por deslocamento cervical (Figura 2A) (PASSOS et al., 2002). O ventre do animal foi higienizado com uma solução de álcool a 70% antes da incisão (Figura 2B). Foi feita uma abertura na pele e peritônio para a coleta dos ovidutos (Figuras 2C à 2F). Os ovidutos foram mantidos aos pares, em gotas de 200μl de meio de lavagem tamponado (Cultilab®-Campinas, SP) até que todos os animais fossem sacrificados (Figura 3A).

Com o auxílio de uma lupa (Coleman) e duas agulhas 16x0,5mm, os ovidutos foram abertos (40X) (Figuras 3B e 3C), os zigotos foram coletados e rapidamente transportados para uma nova gota de meio de lavagem (200μL) (Figura 3D). Os zigotos foram lavados por 30 segundos em solução de pronase a 0,5% a 37 ºC, 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).

Em todos os experimentos desse trabalho, somente serão utilizados embriões com zona pelúcida íntegra.

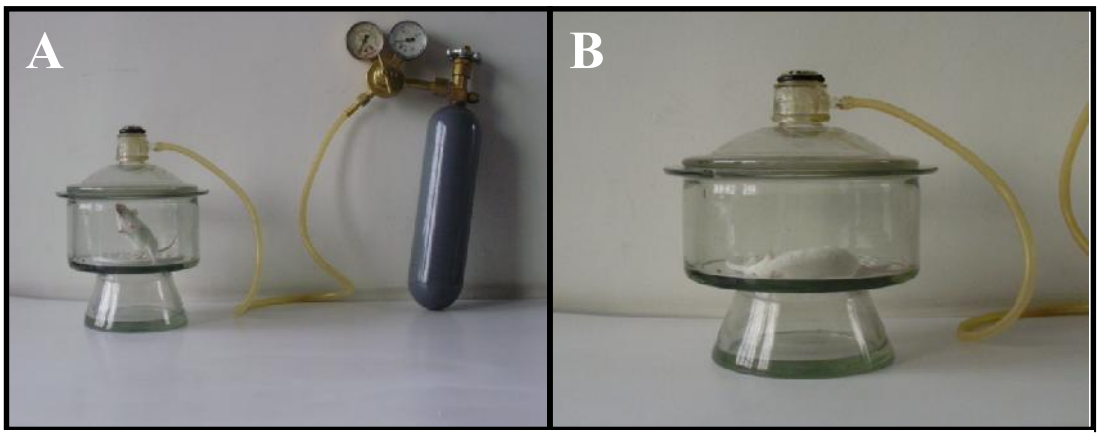


Figura 1: Câmara de Eutanásia: A- Campânula de vidro, mangueira de borracha, regulador de pressão e cilindro especial para CO_2; B- Camundongo anestesiado pelo CO_2.

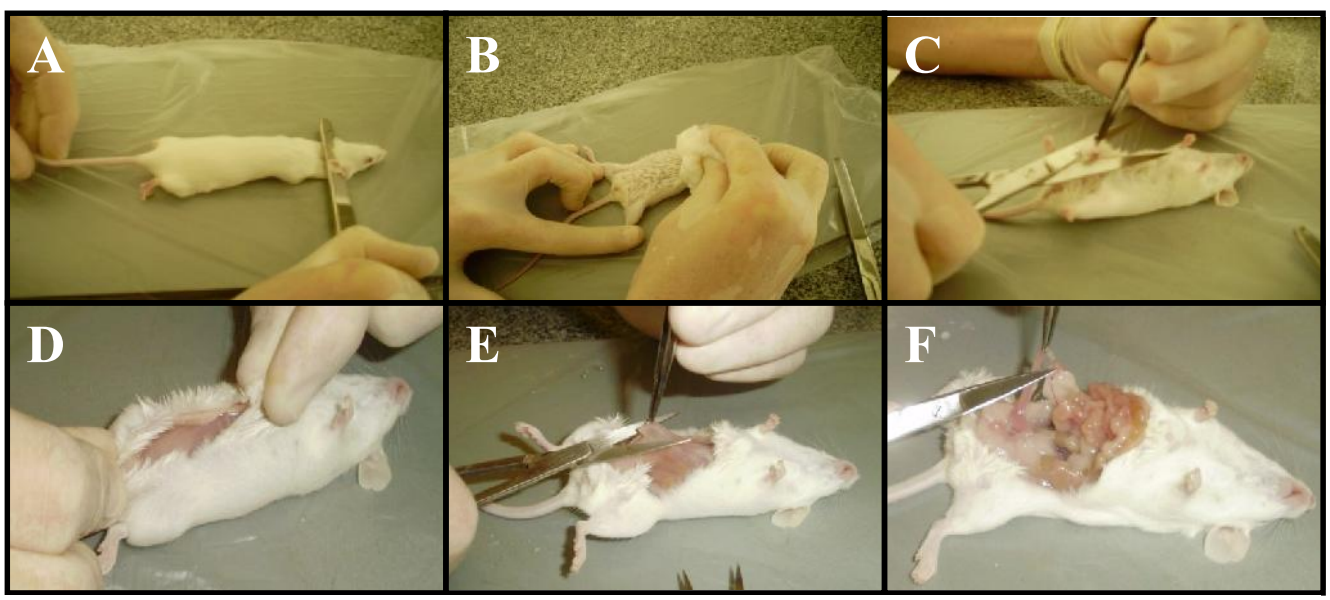


Figura 2: Procedimento de coleta dos ovidutos. A- Deslocamento cervical; B-Higienização do abdômen do animal; C e D- Abertura da pele; E- Abertura do peritônio; F-Visualização do oviduto (indicado pela tesoura)

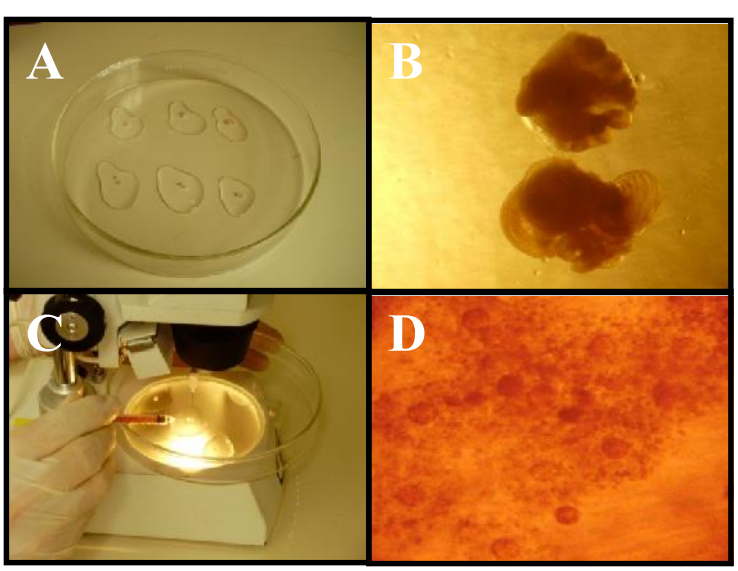
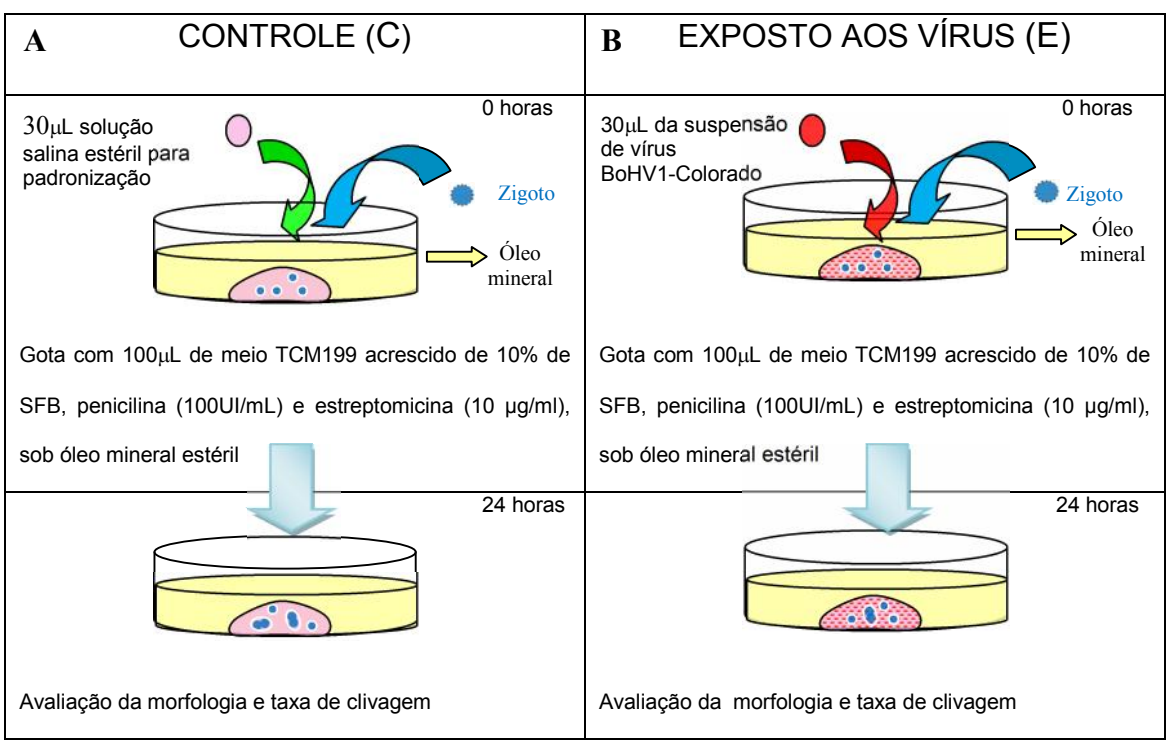


Figura 3: Coleta dos zigotos. A-Ovidutos logo após a coleta em meio de lavagem; B-Ovidutos visualizados sob lupa (40X); C-Utilização de agulhas para abertura dos ovidutos; D-Zigotos observados sob lupa (40X)

3.5 Avaliação da morfologia e taxa de clivagem de zigotos expostos ao BoHV-1 após 24h de contaminação- Experimento 1

Os zigotos coletados, mantidos em gotas de 100μL de meio TCM 199 suplementado com 10% de SFB livre do vírus da diarréia viral bovina (BVDV) e 0,2% de piruvato de sódio, sob óleo mineral estéril, foram divididos em 2 grupos: o grupo controle (C), não exposto ao vírus e o grupo exposto ao vírus (E). As culturas foram mantidas em estufa a 5% de CO_2, 90% de umidade e 37 ºC. A contaminação foi feita com 30μL da suspensão de vírus na diluição de $10^{6,5}$ vírus/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 contaminação os zigotos foram separados em subgrupos para avaliação da morfologia e taxa de clivagem (Quadro 2).



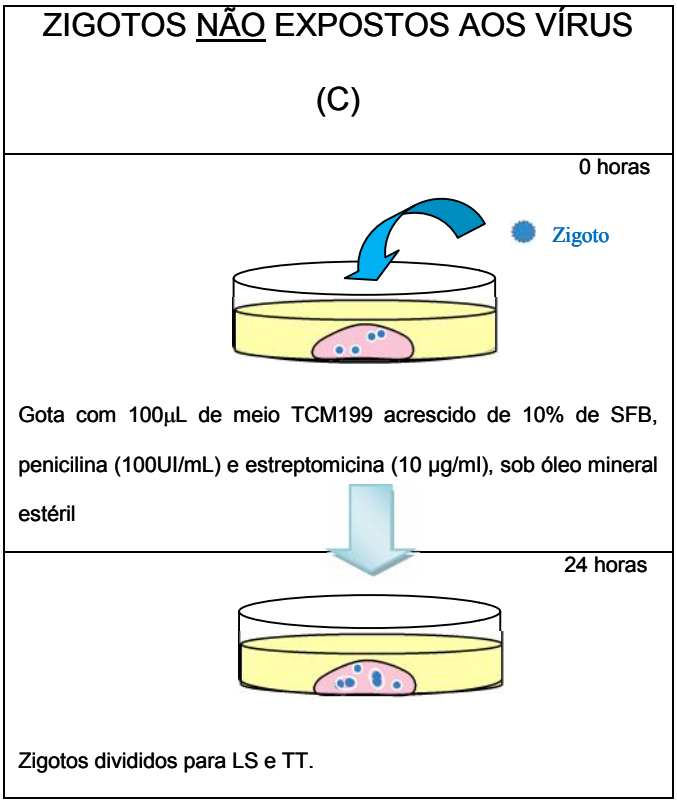
Quadro 2 – Quadro mostrando zigotos. A- do grupo controle (C), não exposto ao vírus; B-grupo Contaminado (E), exposto ao vírus.

3.6 Avaliação de alterações morfofisiológicas em embriões submetidos ao tratamento com tripsina e não expostos aos vírus- Experimento 2

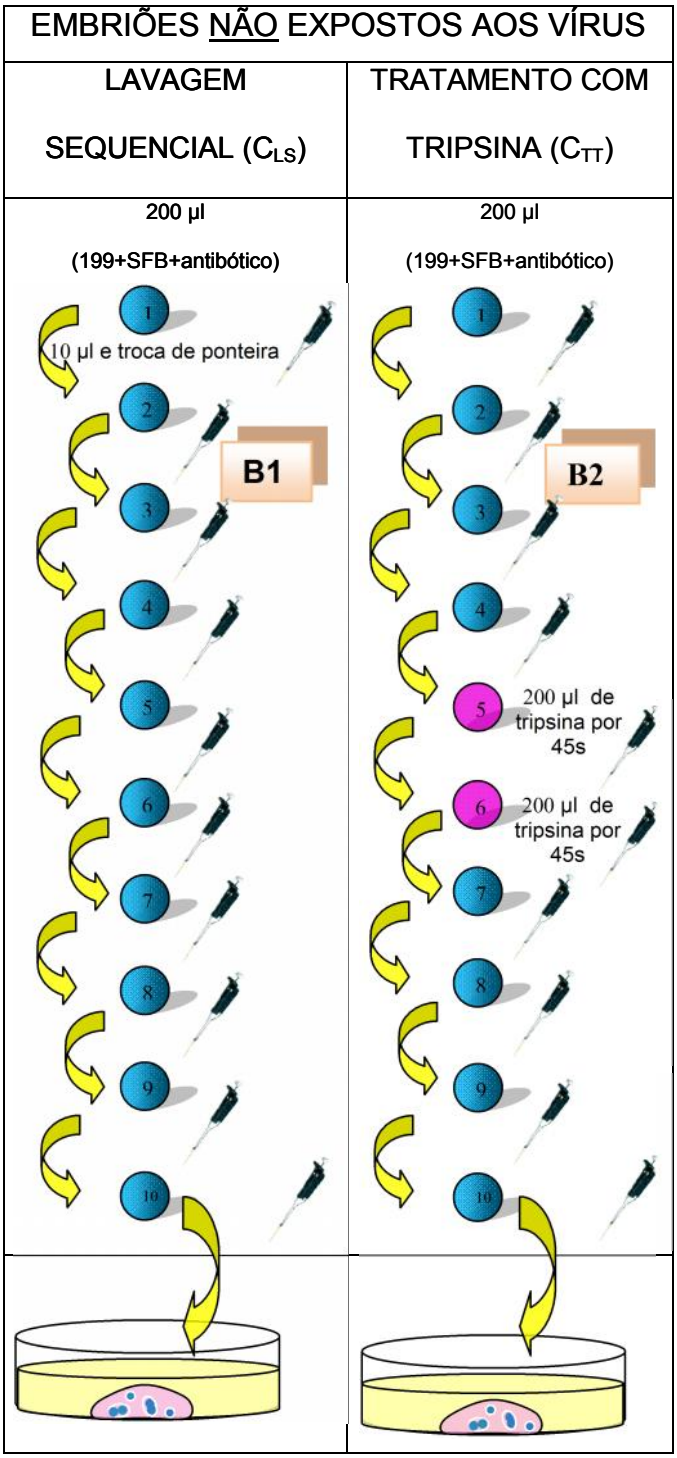
Os embriões coletados, não expostos ao vírus (grupo C), foram mantidos em estufa a 5% de CO_2, 90% de umidade e 37 ºC em gotas de 100μL de meio TCM 199 suplementado com 10% de SFB e 0,2% de piruvato de sódio, sob óleo mineral estéril (Quadro 3A). Foram divididos em 2 grupos, após 24h da coleta: o grupo controle submetido à lavagem seqüencial (LS) e o grupo teste, submetido ao tratamento com tripsina (TT) padronizado pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) (Quadro 3B).

A lavagem seqüencial (LS) consiste na passagem dos zigotos por 10 gotas de 200μL de meio TCM199 (Cultilab®-Campinas, SP) acrescido de 10% de SFB penicilina (100UI/mL) e estreptomicina (10μg/mL) (Quadro 3B1). Os zigotos foram lavados em grupos de pelo menos 5, com troca de ponteiras a cada passagem de gota, e transferindo apenas 10μL de meio de uma gota para outra. O tratamento com tripsina (TT) 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 (Quadro 3B2).

Após 96h, os embriões ($_e$) do grupo C, não expostos aos vírus, e submetidos à LS ($C_{LS.e}$) e os embriões submetidos ao TT ($C_{TT.e}$) foram separados para avaliação da morfologia e da taxa de clivagem.



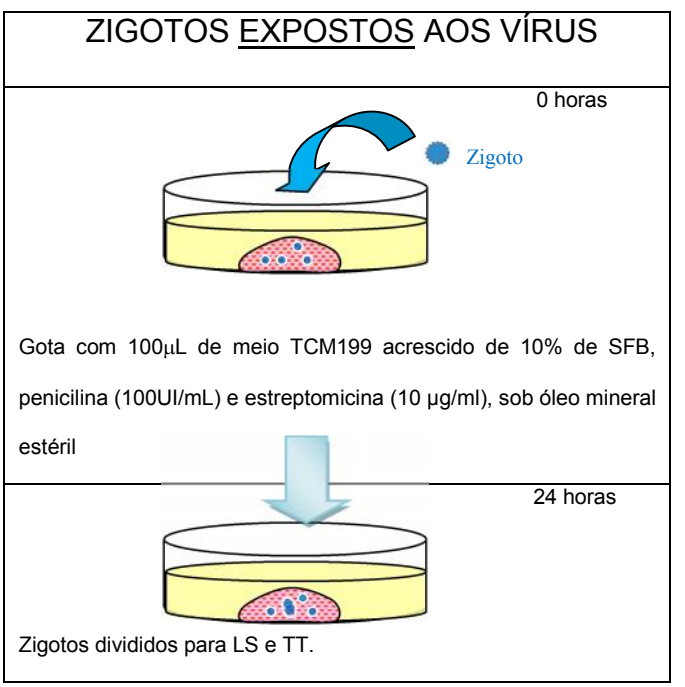
Quadro 3A: Embriões que serão divididos em dois grupos após 24h de incubação



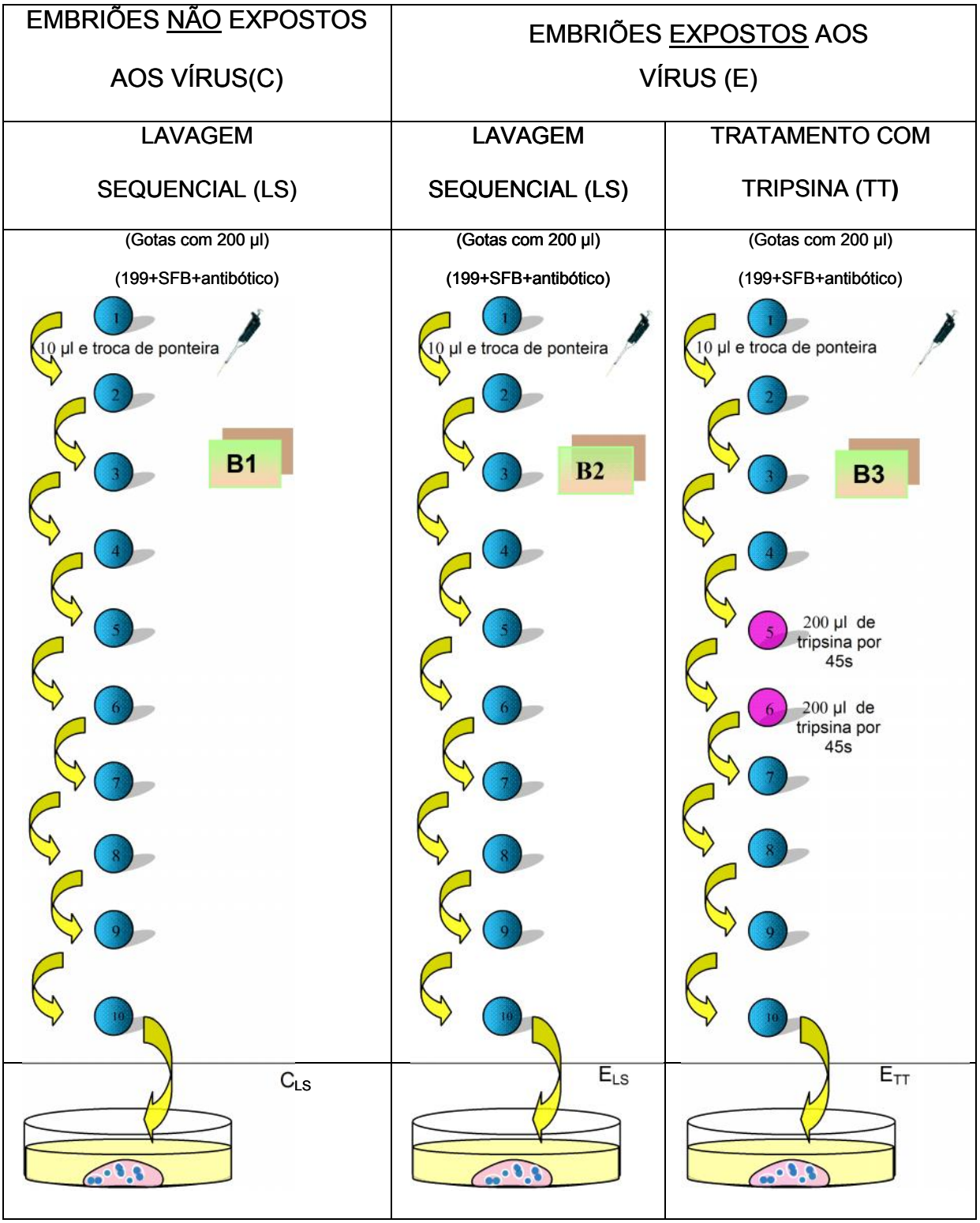
Quadro 3B: B1- Embriões submetidos à Lavagem Seqüencial ($C_{LS.e}$); B2- Embriões submetidos ao Tratamento com Tripsina ($C_{TT.e}$).

3.7 Avaliação dos embriões expostos aos vírus e submetidos ao tratamento com tripsina após 96h- Experimento 3

Os zigotos foram coletados, 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 após 24 horas de incubação na estufa com 5% de CO_2, 90% de umidade a 38 ^{0}C (Quadro 4A) e divididos em 2 grupos: o grupo exposto ao vírus (30µl da suspensão viral) e submetido à lavagem seqüencial (E_{LS}; Quadro 4B1) e o grupo exposto ao vírus (30µl da suspensão viral) submetido ao tratamento com tripsina (E_{TT}; Quadro 4B2). Os grupos foram mantidos conforme condições descritas acima e separados para avaliação da morfologia e da taxa de clivagem após 96h.



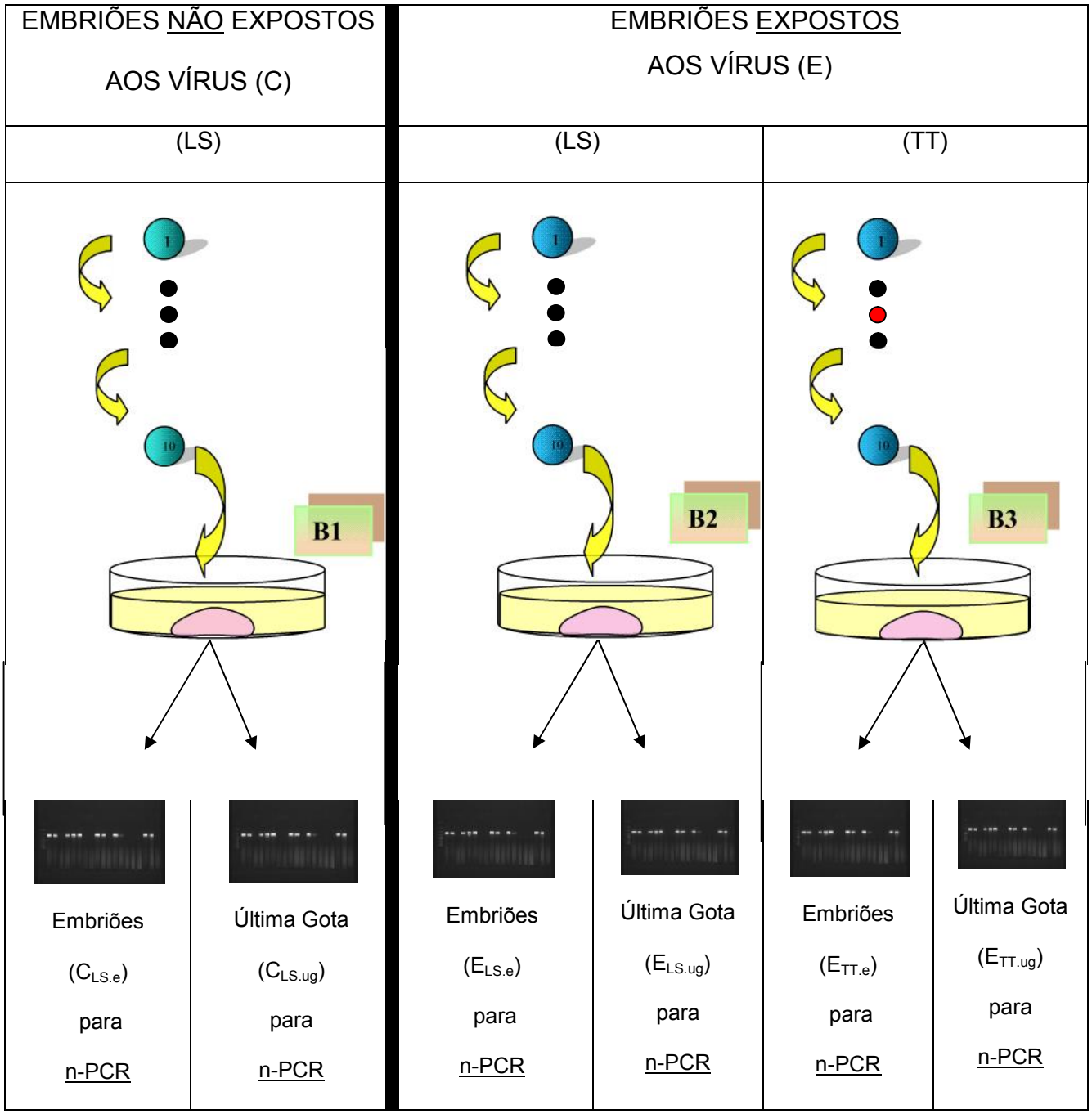
Quadro 4A: Zigotos expostos ao vírus



Quadro 4B: B1-Embriões não expostos ao vírus e submetidos à Lavagem Seqüencial ($C_{LS.e}$); B2- Embriões expostos aos vírus e submetidos à Lavagem Seqüencial ($E_{LS.e}$); B3-Embriões expostos ao vírus e submetidos ao Tratamento com Tripsina ($E_{TT.e}$).

3.8 Avaliação do tratamento com tripsina na eliminação do vírus BoHV-1 pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase- Experimento 4

Os embriões dos grupos C_{LS}, E_{LS} e E_{TT} (Quadro 5- B1, B2 e B3), respectivamente $C_{LS.e}$, $E_{LS.e}$ e $E_{TT.e}$, 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 em estufa com 5% de CO_2, 90% de umidade a 38 ^{0}C e, após 96h, separados para o teste de nested-PCR.



Quadro 5: B1- Embriões não expostos ao vírus e submetidos à Lavagem Seqüencial ($C_{LS.e}$) e última gota ($C_{LS.ug}$) para nested-PCR; B2- Embriões contaminados pelos vírus e submetidos à Lavagem Seqüencial ($E_{LS.e}$) e ultima gota ($E_{LS.ug}$) para nested-PCR; B3- Embriões contaminados pelos vírus e submetidos ao Tratamento com Tripsina ($E_{TT.e}$) e última gota ($E_{TT.ug}$) para nested-PCR.

3.8.1 Detecção do BoHV-1-Colorado nas amostras pela nested-PCR.

Os protocolos utilizados para detecção dos vírus pela nested-PCR, extração e amplificação do DNA das amostras e protocolo utilizado para realização da eletroforese seguiram a metodologia preconizada no Manual de Padrões para Testes Diagnósticos e Vacinas da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2008).

3.8.1.1 Identificação viral do *BoHV-1 Colorado*

O protocolo para a identificação do BoHV-1 seguiu a seguintes etapas: Extração do DNA, Iniciadores (primers específicos) e Reações de PCR.

3.8.1.2 Extração do DNA

As amostras de lavado de embrião foram submetidas à extração do DNA viral com o Trizol® LS Reagent (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante.

Para cada 75 µl de amostra de lavado de embrião, foram adicionados 225 µl de Trizol LS Reagent® (Invitrogen), e após agitação em vôrtex por 15 segundos, incubados a 30 ºC durante 5 minutos sob agitação constante (850 rpm). Em seguida foram adicionados 60µl de clorofórmio (Merck®), homogeneizados e novamente incubadas a temperatura de 30 ºC por 5 minutos. A mistura foi centrifugada a 12.000xg a 4 ºC, por 15 minutos.

Após esta etapa, com o auxílio de uma micropipeta, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 90µl de etanol 100% (ETOH 100%), deixando incubar por 3 minutos. E em seguida os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 5.000 *xg*. Foi aspirado o sobrenadante cuidadosamente com o auxílio de uma micropipeta e em seguida o *pellet* passou pela etapa de lavagem adicionando 300µL citrato de sódio em 10% de etanol e incubando por 15 minutos sob agitação constante (850 rpm) em temperatura ambiente. Depois de transcorrido este tempo, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 5.000 *xg*. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e em seguida repetiu-se a etapa anterior.

Com auxílio de uma micropipeta, o sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 300 µl de Etanol 75% e incubado por 10 minutos sob agitação constante (850 rpm) em temperatura ambiente. Transcorrido esse tempo, os tubos foram novamente centrifugados por 5 minutos a 5.000 *xg.* Descartou-se o sobrenadante e para secagem do *pellet* os tubos foram mantidos abertos em temperatura ambiente por 10 minutos. Acrescentou-se 45 µl de NaOH. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 12.000xg a 4 ºC. Transferiu-se para um novo tubo 30 µl do sobrenadante e acrescentou-se 7,5 µl de uma solução tampão (HEPES). As amostras de DNA extraídas foram estocadas a – 70 ºC até a etapa de amplificação.

3.8.1.3 Iniciadores

A identificação do BoHV-1 foi realizada utilizando primers específicos desenhados a partir da região da glicoproteína I (WHITBECK et al., 1988).

A tabela abaixo mostra os *primers* utilizados nas diferentes reações de PCR e *nested*-PCR para BoHV-1.

Tabela 1 – Primers das reações de PCR e *nested* PCR para BoHV-1 Colorado.

Primer	Posição	Seqüência	Produto (bp)
PCR (externos)			
Primer 1	624-645	5’-CACGGACCTGGTGGACAAGAAG-3’	468
Primer 2	1070-1091	5'CTA CCG TCA CGT GAG TGG TAC G3'	
Nested-PCR (interno)			
Primer 3	663-680	5’-AGCCGAGTACCTGCGCAG-3’	344
Primer 4	990-1007	5’-TTCCGAAGAGCTGTTGTACA-3’	

3.8.1.4 Reações de PCR

A reação de PCR foi realizada seguindo as especificações preconizadas no kit comercial PCR Master Mix (PROMEGA). A reação foi realizada num volume total de 25 µL, contendo PCR Master Mix 1X (50u/ml Taq DNA Polymerase; 400 µM de cada DNTP e 3,0 mM $MgCl_2$), 0,5 µM de cada primer e 5 µL de DNA.

Para a reação de *nested*-PCR (segunda amplificação), seguiu-se também o protocolo preconizado para o kit comercial PCR Master Mix (PROMEGA) num volume total de 25 µL contendo PCR Master mix (50u/ml Taq DNA Polymerase; 400 µM de cada DNTP e 3,0 mM $MgCl_2$.), 0,5 µM de cada primer e 2 µL de DNA já amplificado.

As condições de temperatura e ciclos para as reações de amplificação do DNA (PCR) e a *nested*-PCR foram:

Ciclo:

1. 94 ºC – 5min
2. 94 ºC – 50seg
3. 60 ºC – 50seg
4. 72 ºC – 1min

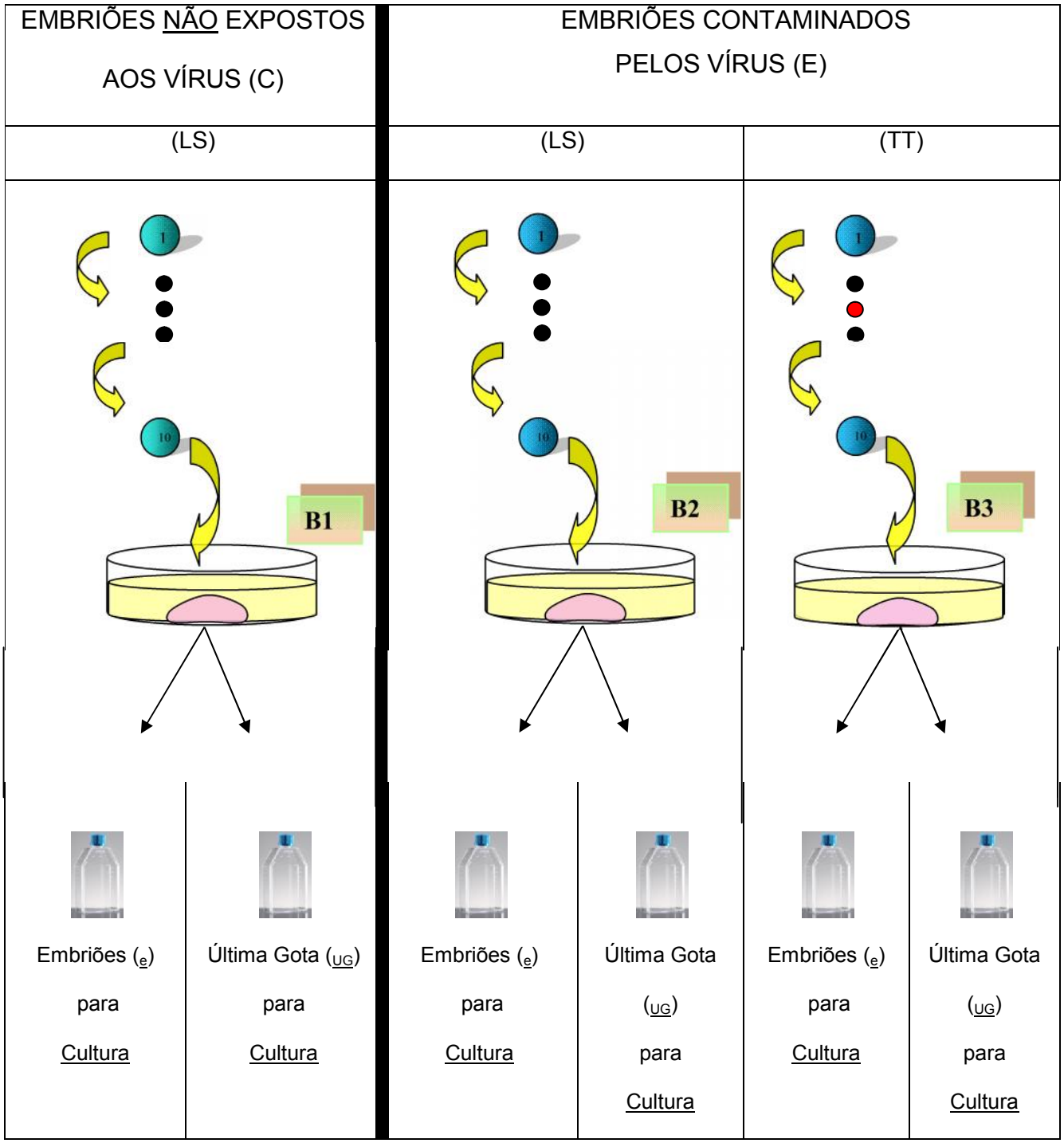
   } 35 x

5. 72 ºC – 5min
6. 10 ºC - Hold

O produto de cada amplificação foi analisado em gel de agarose a 2%, preparado em tampão TAE 1X e submetido à eletroforese com voltagem constante de 100 V, por 1 hora. A presença de amplicons foi evidenciada após coloração com brometo de etídio (5µg/mL) e visualização em luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos de DNA foi comparado com um padrão de peso molecular apresentando incrementos de 100 pb (DNA *ladder* de 100 pb – Fermentas ®). O tamanho esperado do produto do PCR é de 468 bp, porém a reação de *nested* –PCR, pelo baixo limiar, produz um produto de 344 bp.

3.9 Avaliação do tratamento com tripsina na eliminação do vírus BoHV-1 pela observação do efeito citopático em célula MDBK- Experimento 5

Os embriões dos grupos C_{LS}, E_{LS} e E_{TT} (Quadro 6-B1, B2 e B3) 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 em estufa com 5% de CO_2, 90% de umidade a 38 ^{0}C. Após 96h, foram inoculados em células MDBK para análise do ECP. A gota da última lavagem (ug) de cada grupo também foi inoculada em células MDBK. A análise foi feita após 48h da inoculação.



Quadro 6: B1- Embriões não expostos ao vírus e submetidos à Lavagem Seqüencial (**C_{LS}**); B2- Embriões contaminados pelos vírus e submetidos à Lavagem Seqüencial (E_{LS}); B3- Embriões contaminados pelos vírus e submetidos ao Tratamento com Tripsina (E_{TT}).

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da morfologia e taxa de clivagem de zigotos expostos ao BoHV-1 após 24h de contaminação- Experimento 1

As análises morfológicas e estatísticas foram realizadas sob microscópio óptico no aumento de 100x.

4.1.1 Análise morfológica

No grupo controle (grupo C) não foram verificadas alterações morfológicas após 24h (Figuras 4 e 5).

Constatou-se CPE nos zigotos contaminados com BoHV-1 Colorado (grupo E). Dentre as alterações morfológicas, foi possível verificar citoplasma com granulação e aspecto degenerativo (Figuras 6 e 7), blastômeros assimétricos (Figuras 6 e 8), falha de divisão (Figuras 7 e 9). Em ambos os grupos (C e E) não foram detectados alterações morfológicas na zona pelúcida visíveis ao microscópio óptico (Figuras 4, 5, 6, 7, 8 e 9).

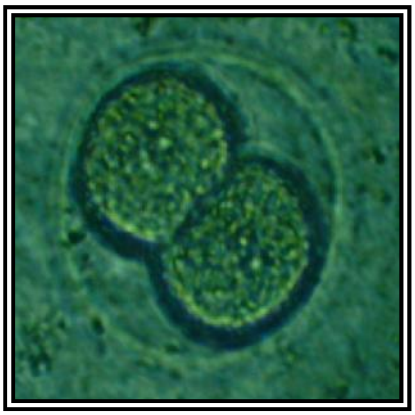


Figura 4: Embrião do grupo controle sem alterações morfológicas com 2 células após 24h de incubação (100x, 15Xzoom)

Figura 5: Embrião do grupo controle sem alterações morfológicas com 2 células após 24h de incubação (100x, 5Xzoom)

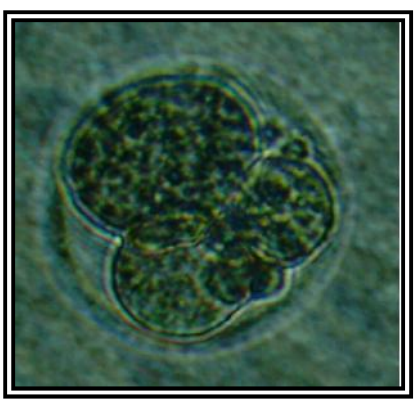


Figura 6: Embrião após 24h de contaminação com *BoHV-1 Colorado* com blastômeros *assimétricos* (100x, 15Xzoom)

Figura 7: Zigoto após 24h de contaminação com *BoHV-1 Colorado* com falha de divisão (100x, 10Xzoom)

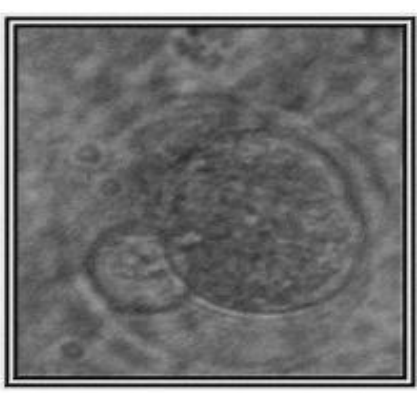


Figura 8: Embrião após 24h de contaminação com *BoHV-1 Colorado* com blastômeros *assimétricos* (100x, 25Xzoom)

Figura 9: Zigoto após 24h de contaminação com *BoHV-1 Colorado* com espaço periplásmico acentuado(100x, 15Xzoom)

4.1.2 Análise estatística

Depois de 24 horas de contaminação dos zigotos murinos ao BoHV-1 Colorado foi constatado que a taxa de clivagem no grupo controle (C) foi de 54% (190/351) e a encontrada no grupo contaminado com o vírus (E) foi de 44% (139/313). Verificou-se diferença significativa com relação à taxa de clivagem entre esses dois grupos (χ^2 de 6,256> χ^2 crítico=3,841 ; α=0,05) (Gráfico 1).

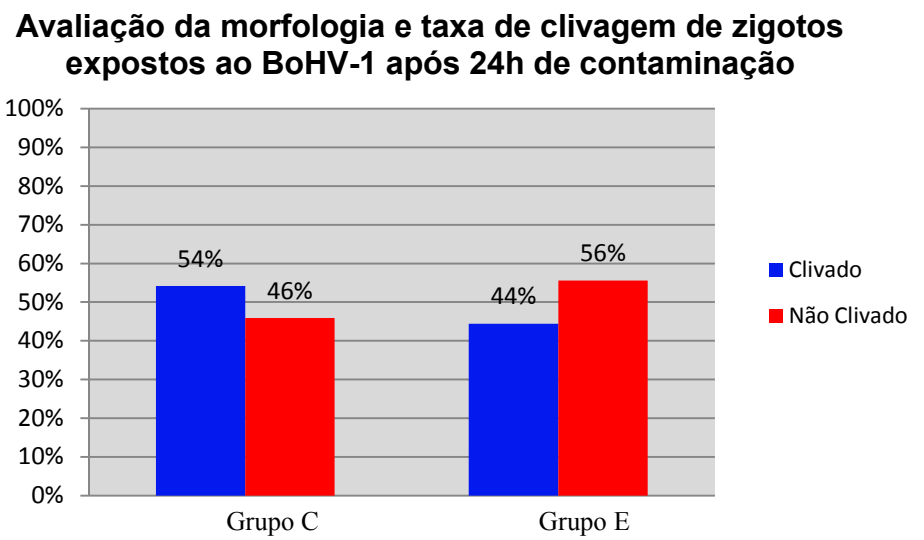


Gráfico 1 - Taxa de clivagem de zigotos murinos após 24h. Grupo C: não exposto ao vírus; Grupo E: exposto ao vírus

4.2 Avaliação de alterações morfofisiológicas em embriões submetidos ao tratamento com tripsina e não expostos ao BoHV-1- Experimento 2

As análises morfológicas e estatísticas foram realizadas sob microscópio óptico no aumento de 100x.

4.2.1 Análise morfológica

Os embriões $C_{LS.e}$ e $C_{TT.e}$ após 96h não apresentaram alterações morfológicas significativas (Figuras 10 e 11).

Figura 10: Mórula do grupo controle ($C_{L.S.e}$) sem alterações após 96h do tratamento (100x, 10Xzoom)

Figura 11: Mórula do grupo teste ($C_{TT.e}$) sem alterações após 96h do tratamento (100x, 10Xzoom)

4.2.2 Análise estatística

Após 96 horas de cultivo foi observado que a taxa de clivagem no grupo C_{LS} foi de 21,2% (18/85) e a encontrada no grupo C_{TT} foi de 18,2% (14/77). Verificou-se que não houve diferença significativa com relação à taxa de clivagem entre esses dois grupos (χ^2 de 0,229< χ^2 crítico=3,841 ; α=0,05) (Gráfico 2).

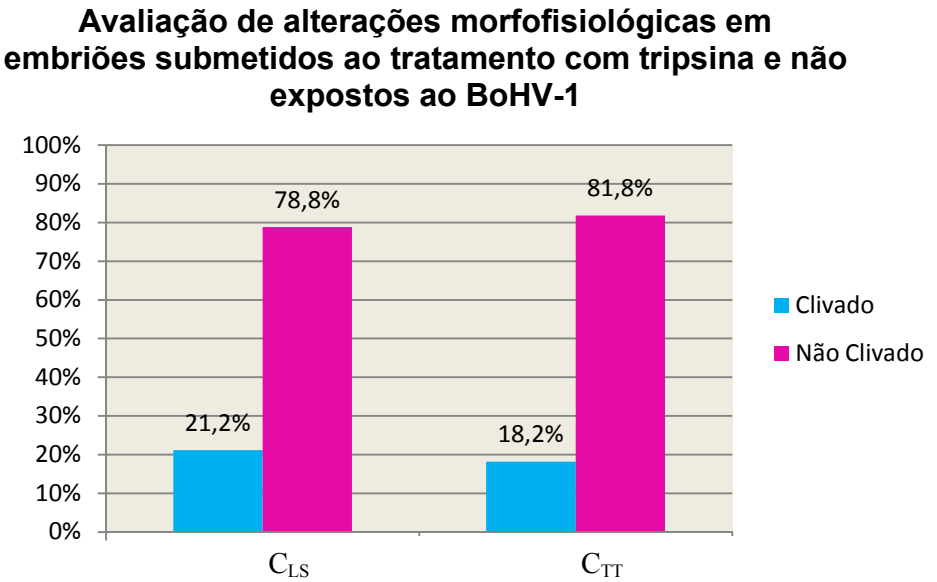


Gráfico 2 - Taxa de clivagem de embriões murinos após 96h de submissão à LS (Grupo C_{LS}) e ao TT (Grupo C_{TT}).

4.3 Avaliação dos embriões expostos aos vírus e submetidos ao tratamento com tripsina após 96h- Experimento 3

As análises morfológicas e estatísticas foram realizadas sob microscópio óptico no aumento de 100x.

4.3.1 Análise morfológica

Nos embriões do grupo E, submetidos ao TT, $E_{TT.e}$, não foram verificadas alterações morfológicas após 96h (Figura 12). Enquanto que nos embriões contaminados com BoHV-1 Colorado *e* submetidos à LS ($E_{LS.e}$) apresentaram ECP. Dentre as alterações morfológicas, foi possível verificar citoplasma com granulação e aspecto degenerativo (Figura 13) e blastômeros assimétricos (Figura 14). Em ambos os grupos não foram detectados alterações morfológicas na zona pelúcida visíveis ao microscópio óptico.

Figura 12: Mórula do grupo E_{TT} após 96h do tratamento com blastômeros simétricos (100x, 10Xzoom)

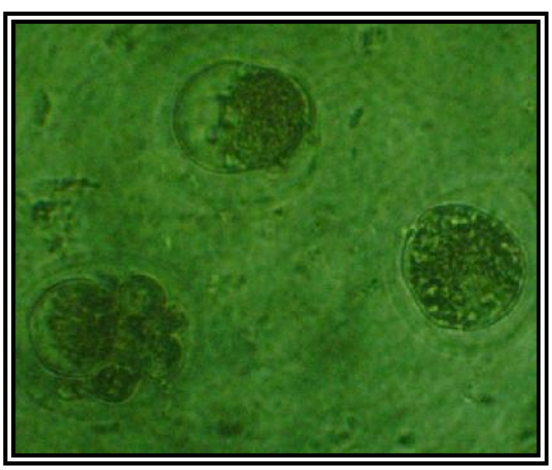


Figura 13: Embriões do grupo controle (E_{LS}) após 96h do tratamento com granulação, blastômeros assimétricos e aspecto degenerativo (100x, 5X zoom)

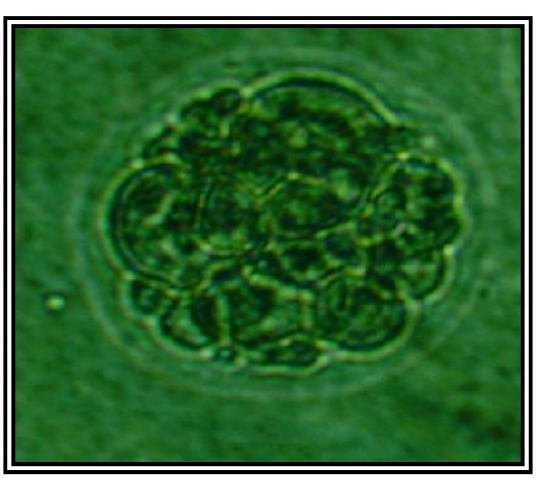


Figura 14: Mórula do grupo controle (E_{LS}) após 96h do tratamento com blastômeros assimétricos (100x, 15X zoom)

4.3.2 Análise estatística

Após 96 horas de cultivo foi constatado que a taxa de clivagem no grupo C_{LS} foi de 21,2% (18/85), no grupo E_{LS}, 13,8% (11/80), e a encontrada no grupo E_{TT} foi de 17,5% (17/97). Verificou-se que não houve diferença significativa com relação à taxa de clivagem entre esses dois grupos (χ^2 de 1,57< χ^2 crítico=5,99; α=0,05)(Gráfico 3).

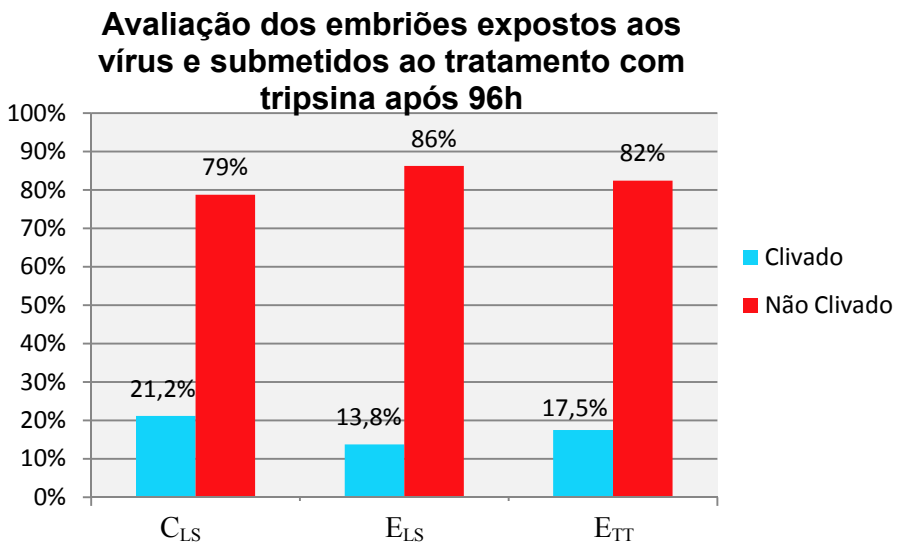


Gráfico 3: Taxa de clivagem de embriões murinos após 96h de tratamento. C_{LS}: não exposto ao vírus e submetido a LS ; E_{LS}: exposto ao vírus e submetido à LS; E_{TT}: exposto ao vírus e submetido ao TT.

4.4 Avaliação da eficácia do tratamento com tripsina na eliminação do BoHV-1 pela n-PCR- Experimento 4

Os grupos C_{LS}, E_{LS} e E_{TT} foram submetidos à detecção do vírus pela n-PCR enquanto os ensaios dos grupos E_{LS} e E_{TT} foram comparados estatisticamente.

4.4.1 Detecção

Constatou-se que, após 96h da contaminação, as amostras do grupo C_{LS} (não exposto ao vírus e submetido à Lavagem Seqüencial), quando analisadas por n-PCR para verificação da presença do BoHV-1 Colorado apresentaram-se, evidentemente, negativas, tanto para as amostras contendo embriões ($C_{LS.e}$) quanto para a alíquota da última gota ($C_{LS.ug}$) (Tabela 2; amostras n° 1 à 8; Figura 15). No grupo E (grupo contaminado com o vírus e submetido à Lavagem seqüencial, E_{LS}, e ao Tratamento com Tripsina, E_{TT}) foram obtidos resultados positivos e negativos, para as amostras contendo os embriões ($E_{LS.e}$ e $E_{TT.e}$) e para a alíquota da última

gota ($E_{LS.ug}$ e $E_{TT.ug}$) (Tabelas 3 e 4; amostras nº 9 à 24; Figuras 16 e 17). Foi verificada a presença de embriões e última gota de lavagem positivos para o BoHV-1 Colorado (Tabelas 3 e 4; amostras nº 9, 11, 13, 17 e 23; Figuras 16 e 17). Nas amostras nº 10, 14 e 19 (Figuras 16 e 17) os embriões apresentaram-se livres do BoHV-1 Colorado, mas estas foram detectados na alíquota da última gota de lavagem. Apenas na amostras nº 12, 16 e 18 foram obtidos resultados negativos, tanto para os embriões, quanto para a alíquota da última gota de lavagem (Tabelas 3 e 4) (Figura 16). Os resultados da n-PCR para o grupo E_{TT} (grupo exposto ao vírus e submetido ao Tratamento com Tripsina) foram positivos para quase todas as amostras (Tabela 4) (Figuras 16 e 17), contendo embriões ou apenas da alíquota da última gota de lavagem, com exceção dos embriões da amostra nº18 que se apresentaram negativos quanto à presença do BoHV-1 Colorado (Tabela 4) (Figura 16). Em relação aos resultados da n-PCR para os grupos E_{LS} (grupo exposto ao vírus e submetido à Lavagem Seqüencial) foram positivos, também, para quase todas as amostras (Tabela 3) (Figura 16), contendo embriões ou apenas da alíquota da última gota de lavagem. Porém duas amostras apresentaram-se negativas quanto à presença do BoHV-1 Colorado (Tabela 3) (amostras nº 12 e 16) (Figura 16).

Tabela 2 - Resultados da n-PCR para as amostras não expostas aos vírus e submetidas apenas a lavagem seqüencial

Grupo não exposto aos vírus (C)		
Amostras submetidas à Lavagem Seqüencial (LS)		
nº amostra	Amostras contendo embriões ($C_{LS.e}$)	Alíquota da última gota de lavagem ($C_{LS.ug}$)
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
8	-	-

- Indicação de resultado negativo na n-PCR; + Indicação de resultado positivo na n-PCR

Tabela 3 - Resultados da n-PCR para as amostras expostas aos vírus e submetidas apenas a lavagem seqüencial

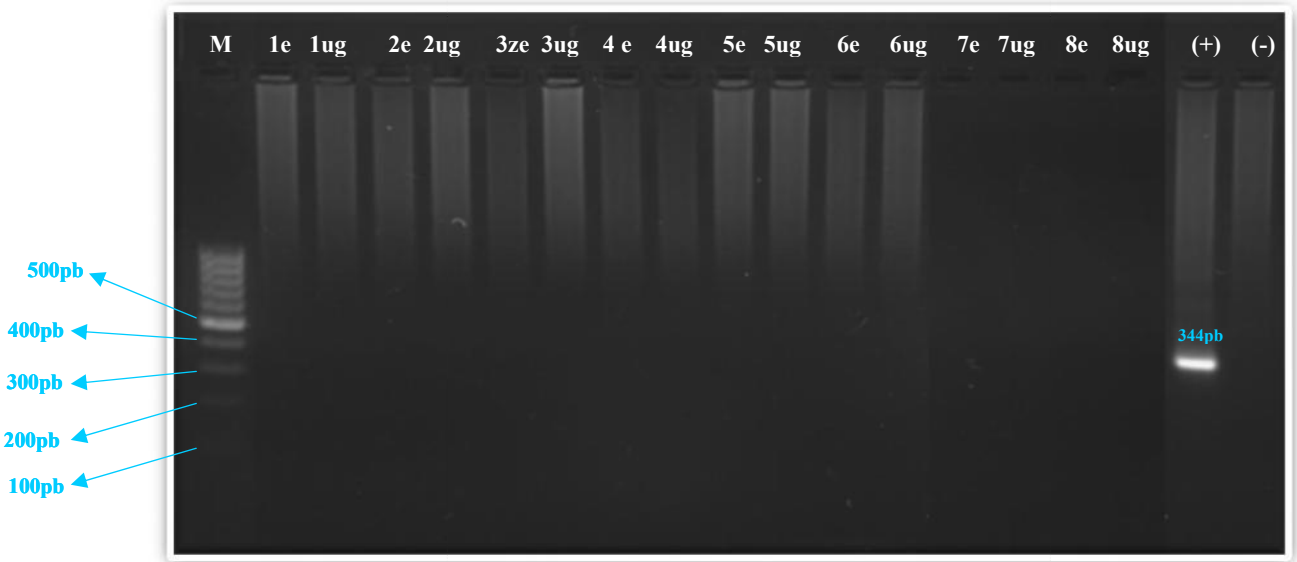
Grupo exposto aos vírus (E)		
Amostras submetidas à Lavagem Seqüencial (LS)		
nº amostra	Amostras contendo embriões ($E_{LS.e}$)	Alíquota da última gota de lavagem ($E_{LS.ug}$)
9	+	+
10	-	+
11	+	+
12	-	-
13	+	+
14	-	+
15	+	-
16	-	-

- Indicação de resultado negativo na n-PCR; + Indicação de resultado positivo na n-PCR

Tabela 4 - Resultados da n-PCR para amostras expostas aos vírus e submetidas ao Tratamento com Tripsina

Grupo exposto aos vírus (E)		
Amostras submetidas ao Tratamento com Tripsina (TT)		
Nº amostra	Amostras contendo embriões ($E_{TT.e}$)	Alíquota da última gota de lavagem ($E_{TT.ug}$)
17	+	+
18	-	-
19	-	+
20	+	-
21	+	-
22	+	-
23	+	+
24	+	-

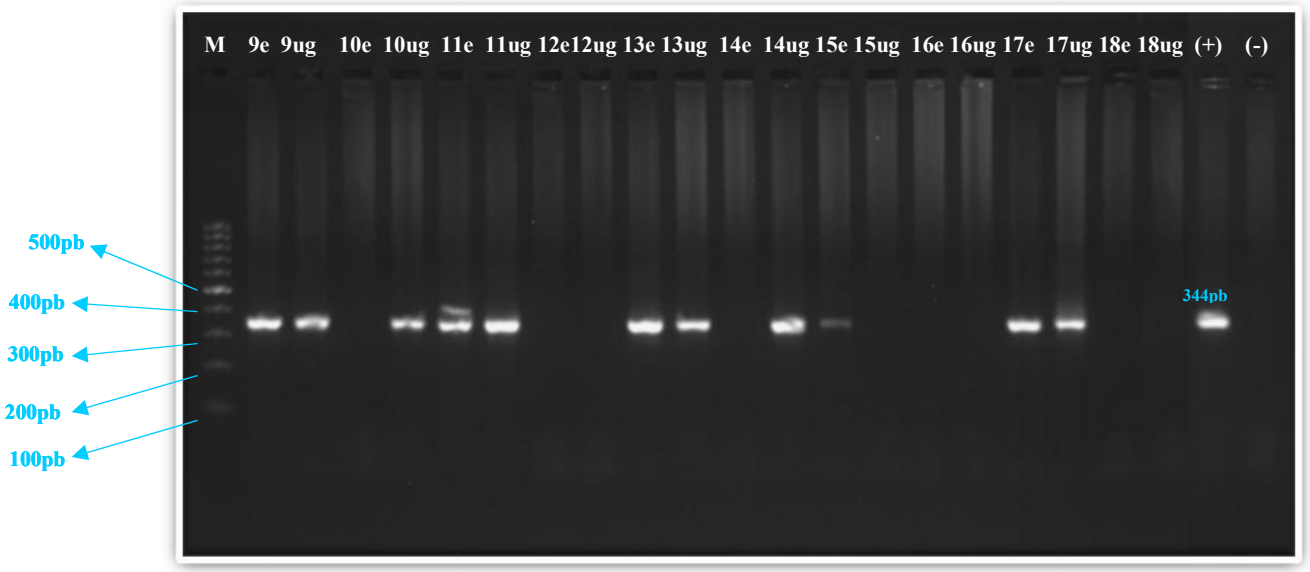
- Indicação de resultado negativo na n-PCR; + Indicação de resultado positivo na n-PCR



Legenda das canaletas:

- **M** – Padrão de peso molecular - DNA *ladder* de 100 pb FERMENTAS (FERMENTAS Life Sciences, Canadá);
- **1e , 2e, 3e, 4e, 5e, 6e, 7e e 8e** – Embriões não contaminados submetidos a Lavagem Seqüencial das amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8, respectivamente;
- **1ug, 2ug, 3ug, 4ug, 5ug, 6ug, 7ug e 8ug** – Alíquotas da última gota de lavagem das amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8, respectivamente;
- **(+)** – Controle positivo;
- **(-)** – Controle negativo.
-

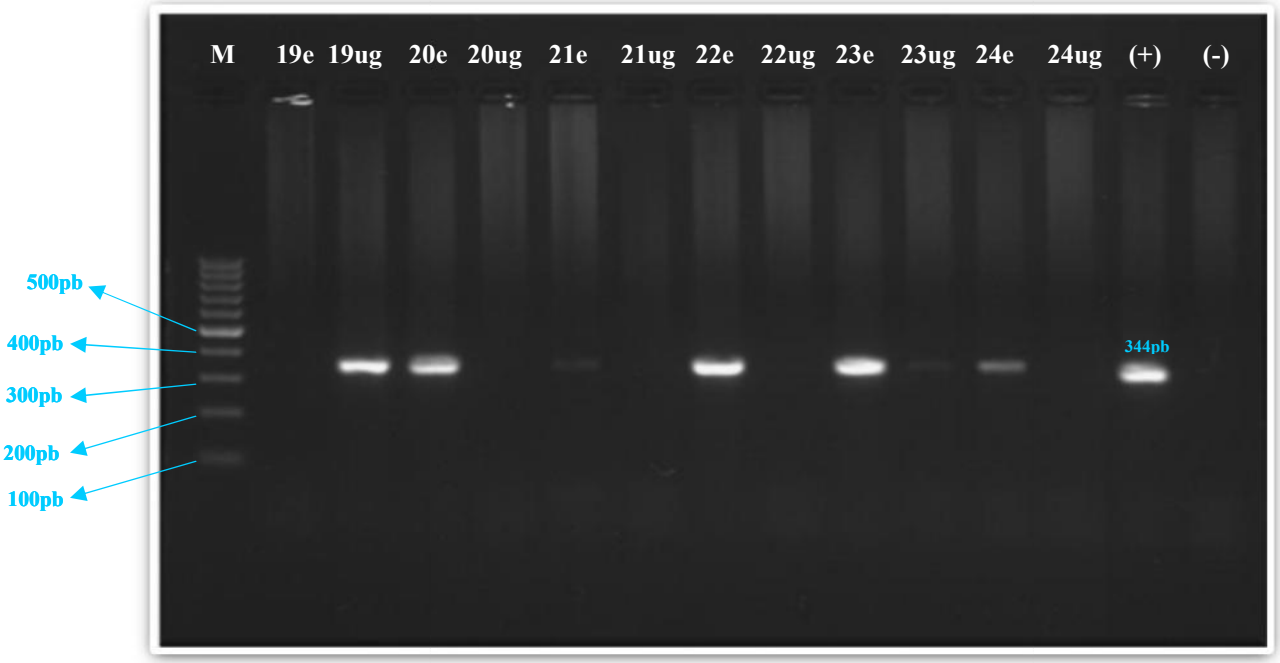
Figura 15: Detecção de produtos amplificados das amostras controle (C_{LS}). nested-PCR.



Legenda das canaletas:

- **M** – Padrão de peso molecular - DNA *ladder* de 100 pb FERMENTAS ;
- **9e , 10e, 11e, 12e, 13e, 14e, 15e, 16e**– Embriões contaminados submetidos a Lavagem Seqüencial das amostras 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16, respectivamente;
- **9ug, 10ug, 11ug, 12ug, 13ug, 14ug, 15ug e 16ug** – Alíquotas da última gota de lavagem das amostras 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16, respectivamente;
- **17e** e **18e** –Embriões contaminados submetidos ao Tratamento com Tripsina das amostras 17 e 18 respectivamente;
- **17ug e 18ug** –– Alíquotas da última gota de lavagem das amostras 17 e 18 respectivamente;
- **(+)** – Controle positivo;
- **(-)** – Controle negativo.

Figura 16: Detecção de produtos amplificados das amostras contaminadas ($E_{LS,}$ e E_{TT}). nested-PCR.



Legenda das canaletas:

- **M** – Padrão de peso molecular - DNA *ladder* de 100 pb FERMENTAS ;
- **19e , 20e, 21e, 22e, 23e e 24e**– Embriões contaminados submetidos ao Tratamento com Tripsina das amostras 19, 20, 21, 22, 23 e 24, respectivamente;
- **19ug, 20ug, 21ug, 22ug, 23ug, 24ug e 25ug** – Alíquotas da última gota de lavagem das amostras 19, 20, 21, 22, 23, 24 e 25, respectivamente;
- **(+)** – Controle positivo;
- **(-)** – Controle negativo.

Figura 17: Detecção de produtos amplificados das amostras contaminadas ($E_{LS,}$ e E_{TT}). nested-PCR.

4.4.2 Análise estatística

Os ensaios de n-PCR para os embriões submetidos à LS (grupo E_{LS}) foram negativos para 50% dos ensaios (4/8) e os embriões submetidos ao TT (grupo E_{TT}) foram negativos para 25% dos ensaios (2/8) das amostras. Verificou-se, segundo Teste Qui-quadrado, com correção de Yates, que não houve diferença significativa entre esses dois tratamentos. (χ^2 de 0.2667 < χ^2 crítico=3,841; α=0,05) (Gráfico 4).

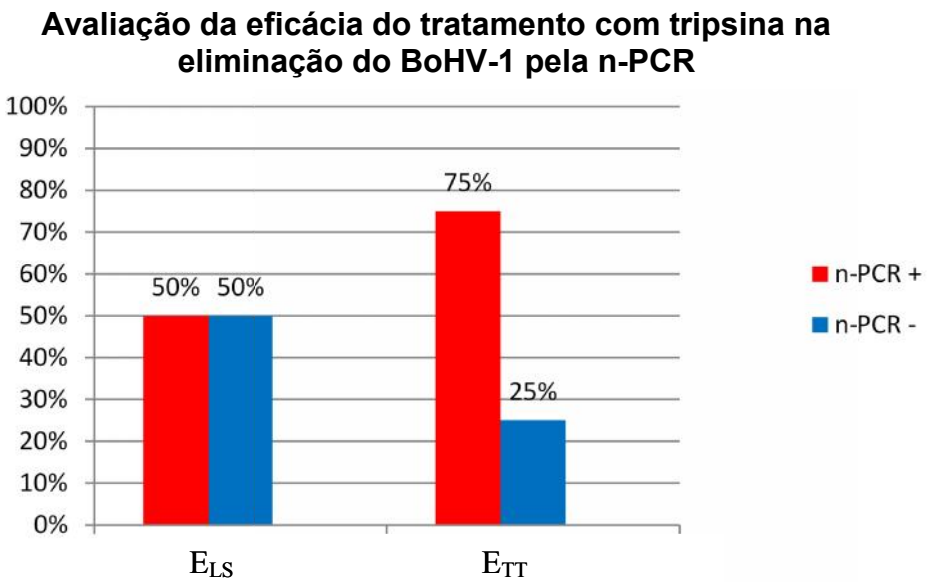


Gráfico 4: Taxa de embriões murinos positivos (n-PCR+) e negativos (n-PCR-) após contaminação e tratamentos, LS (grupo E_{LS}) e TT (grupo E_{TT}).

4.5 Avaliação do tratamento com tripsina na eliminação do vírus BoHV-1 pela observação do efeito citopático em células MDBK- Experimento 5

As análises morfológicas e estatísticas das células MDBK foram realizadas sob microscópio óptico no aumento de 100x.

4.5.1 Análise morfológica

Não foram observados CPE nas culturas MDBK inoculadas com embriões não contaminados com os vírus e submetidos à LS (C_{LS}.e) após 24h. As culturas MDBK inoculadas com a última gota ($C_{LS\cdot ug}$) também não apresentaram CPE (Figura 18 e Tabela 5).

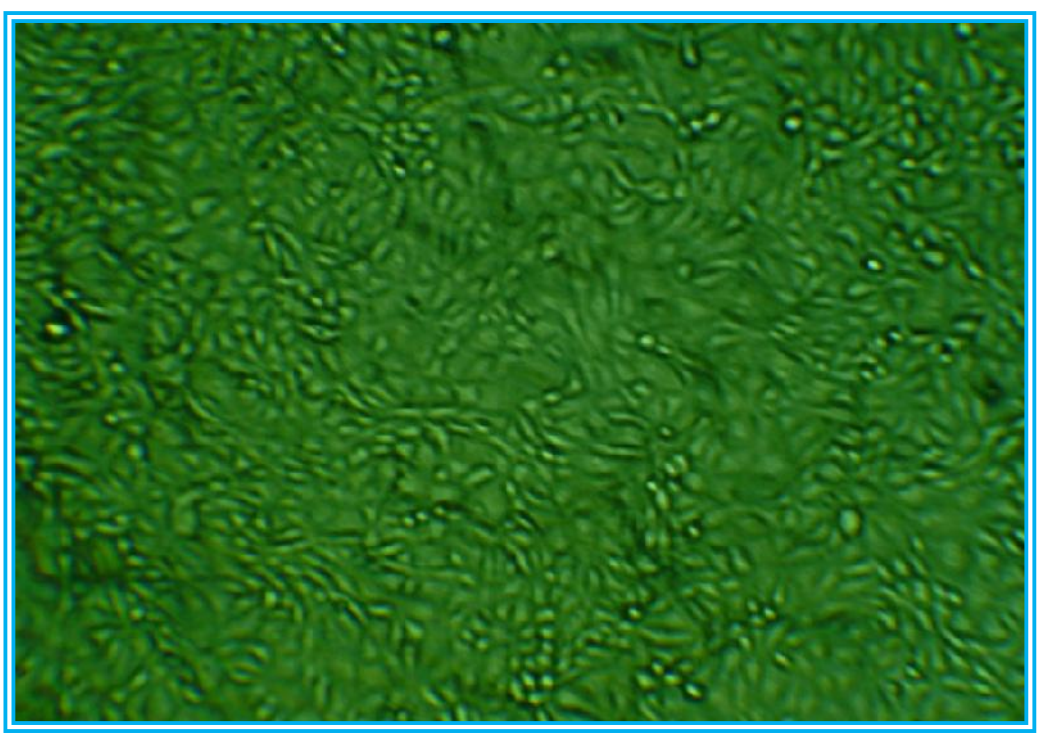


Figura 18: Cultura MDBK inoculadas com $C_{LS\cdot ug}$ (100x, 5Xzoom)

Os resultados apresentados nas tabelas 6 e 7 mostraram que, embriões contaminados com BoHV-1 Colorado, tanto submetidos às LS ($E_{LS.e}$; Figura 19A) quanto ao TT ($E_{TT.e}$; Figura 19B), provocaram CPE em células MDBK. Esse efeito foi menos intenso nas células inoculadas com embriões tratados com tripsina (Figura 19B).

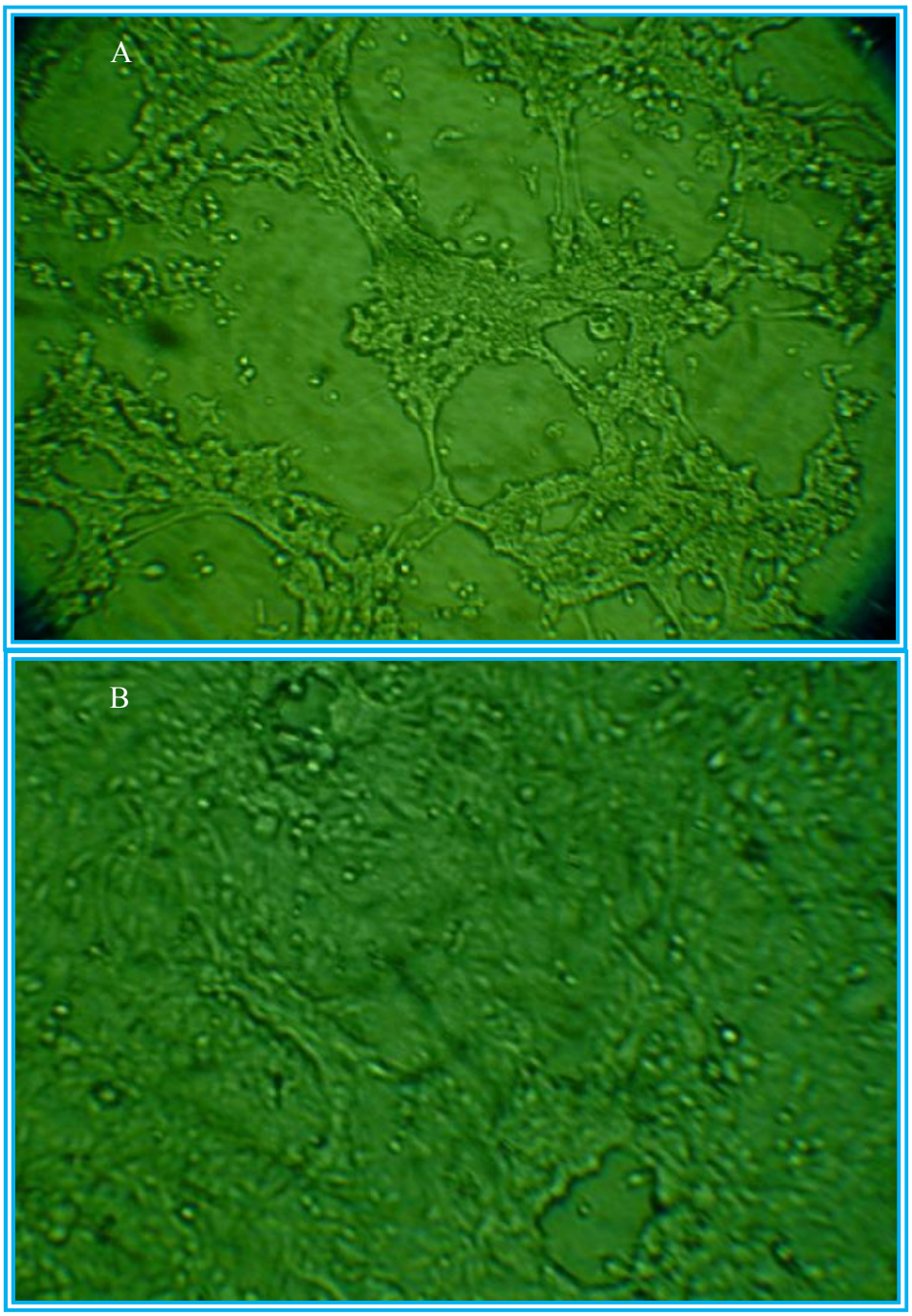


Figura 19: A- Cultura MDBK inoculadas com $E_{LS.e}$; B- Cultura MDBK inoculadas com $E_{TT.e}$ (100x, 2Xzoom)

.

Amostras da última gota da lavagem de embriões submetidos a essas duas técnicas (LS e TT) induziram CPE em células MDBK, porém em menor número e intensidade nas células inoculadas com última gota tratados com tripsina ($E_{TT.ug}$) (Tabelas 6 e 7).

Considerando o grupo exposto ao vírus BoHV-1 Colorado, somente as amostras 12 e 16 (Tabela 6) , submetidas à LS, não apresentaram ECP para

embriões e última gota. Já o grupo exposto ao vírus BoHV-1, as amostras 18, 21, 23 e 24 (Tabela 7) não apresentaram ECP para os embriões e última gota.

4.5.2 Análise estatística

Foram observados nas culturas MDBK inoculadas com embriões submetidos à LS (grupo $E_{LS.}$) ECP negativo igual a 62,5% (5/8 amostras; Tabela 6) e nas culturas MDBK inoculadas com embriões submetidos ao TT (grupo E_{TT}), ECP negativo para 62,5% (5/8 amostras; Tabela 7). Devido à igualdade nas porcentagens, não se constata, evidentemente, diferença estatística (Gráfico 5).

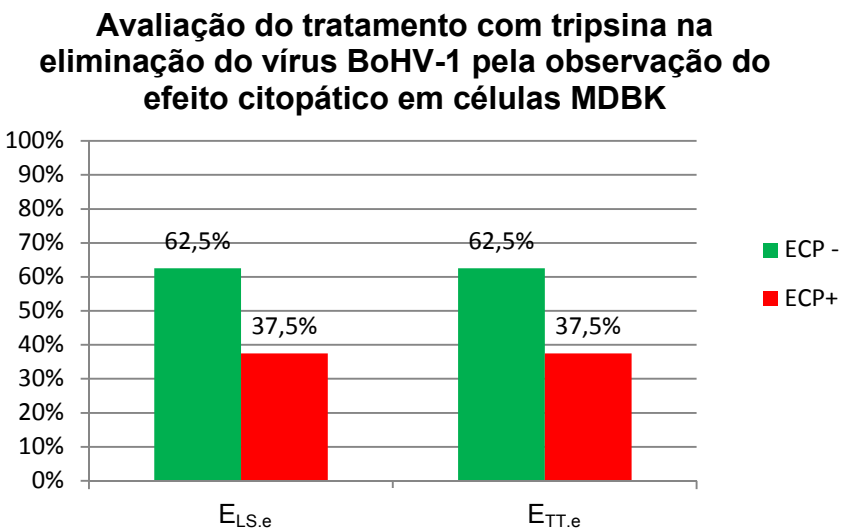


Gráfico 5: Taxa de ECP negativos e positivos em culturas MDBK inoculadas com embriões submetidos à LS ($E_{LS.e}$) e embriões submetidos ao TT ($E_{TT.e}$).

Tabela 5 - Resultados da análise do ECP em células MDBK para as amostras não expostas aos vírus e submetidas à lavagem seqüencial

Grupo não exposto aos vírus (C)		
Amostras submetidas à Lavagem Seqüencial		
Nº amostra	Amostras contendo embriões ($C_{LS.e}$) ECP	Alíquota da última gota de lavagem ($C_{LS.ug}$) ECP
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
8	-	-

- Sem ECP; + Com ECP

Tabela 6 - Resultados da análise do ECP em células MDBK para as amostras expostas aos vírus e submetidas à lavagem seqüencial

Grupo exposto ao vírus (E)		
Amostras submetidas à Lavagem Seqüencial		
Nº amostra	Amostras contendo embriões ($E_{LS.e}$) ECP	Alíquota da última gota de lavagem ($E_{LS.ug}$) ECP
9	-	+
10	-	+
11	+	+
12	-	-
13	+	+
14	-	+
15	+	-
16	-	-

- Sem ECP; + Com ECP

Tabela 7- Resultados da análise do ECP em células MDBK para amostras expostas aos vírus e submetidas ao tratamento com tripsina

Grupo exposto ao vírus (E)		
Amostras submetidas ao Tratamento com Tripsina		
Nº amostra	Amostras contendo embriões($E_{TT.e}$) ECP	Alíquota da última gota de lavagem ($E_{TT.ug}$) ECP
17	+	+
18	-	-
19	-	+
20	+	-
21	-	-
22	+	-
23	-	-
24	-	-

- Sem ECP; + Com ECP

Conforme tabela 9, foi encontrado efeito positivo simultâneo entre nested-PCR e co-cultura nas amostras dos embriões 11, 13 e 15 que foram submetidos à LS. Nas amostras submetidas ao TT, foi encontrado efeito positivo simultâneo entre n-PCR e co-cultura nas amostras dos embriões 17, 20 e 22 (Tabela 10). Constatamos maior número de negatividade entre os embriões submetidos à LS (Tabela 9; amostras 10, 12, 14 e 16) do que os embriões submetidos ao TT (Tabela 10; amostras 18 e 19)

Nas alíquotas das últimas gotas de lavagem foi encontrado efeito positivo simultâneo entre n-PCR e co-cultura nas amostras 9, 10, 11, 13 e 14 (Tabela 9) que foram submetidas à LS. Nas alíquotas das últimas gotas de lavagem submetidas ao TT, foi encontrado efeito positivo simultâneo entre n-PCR e co-cultura apenas nas amostras 17 e 19. Temos maior número de negatividade simultâneo entre n-PCR e co-cultura das alíquotas das últimas gotas submetidas ao TT (Tabela 10; amostras 18, 20, 21, 22 e 24) do que as submetidas à LS (Tabela 9; amostras 12, 15 e 16).

4.6 Relação entre co-cultura e n-PCR

As tabelas 8, 9 e 10 relacionam a detecção pela nested-PCR e a viabilidade do vírus através do ECP entre amostras contendo embriões e alíquota das últimas gotas.

4.6.1 Taxa referente à eficiência do tratamento com tripsina em relação ao número de embriões

Ao realizarmos o confronto entre nested-PCR e o ECP do grupo exposto ao vírus e submetidos ao TT das amostras contendo embriões e últimas gotas (Tabela 10) para classificar cada ensaio como eficiente, eficaz ou não satisfatório, encontramos taxa de eficiência igual a 39,17% (38/97 embriões; soma dos embriões das amostras 21, 23 e 24) (Quadro 7). Se somarmos a eficiência a eficácia (encontrada na amostra 18) do TT teremos uma taxa de 48,45% (47/97 embriões; soma dos embriões das amostras 18, 21, 23 e 24) (Quadro 7). O tratamento não foi satisfatório em 51,55% (50/97 embriões) (Quadro 7).

Tabela 8 - Resultados da análise do ECP em células MDBK comparado ao resultado de n-PCR para as amostras não expostas aos vírus e submetidas apenas a lavagem seqüencial

Grupo não exposto aos vírus (C)				
Amostras submetidas à Lavagem Seqüencial				
Nº amostra	Amostras contendo embriões ($C_{LS.e}$)		Alíquota da última gota de lavagem ($C_{LS.ug}$)	
	n-PCR	ECP	n-PCR	ECP
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-
8	-	-	-	-

- Indicação de resultado negativo na n-PCR; **+** Indicação de resultado positivo na n-PCR;

- Sem ECP; **+** Com ECP

Tabela 9 - Resultados da análise do ECP em células MDBK comparado ao resultado de n-PCR para as amostras expostas aos vírus e submetidas apenas a lavagem seqüencial

Grupo exposto aos vírus (E)				
Amostras submetidas à Lavagem Seqüencial				
Nº amostra	Amostras contendo embriões ($E_{LS.e}$)		Alíquota da última gota de lavagem ($E_{LS.ug}$)	
	n-PCR	ECP	n-PCR	ECP
9	+	-	+	+
10	-	-	+	+
11	+	+	+	+
12	-	-	-	-
13	+	+	+	+
14	-	-	+	+
15	+	+	-	-
16	-	-	-	-

- Indicação de resultado negativo na n-PCR; + Indicação de resultado positivo na n-PCR;

- Sem ECP; + Com ECP

Tabela 10 - Resultados da n-PCR para amostras expostas aos vírus e submetidas ao Tratamento com Tripsina

Grupo exposto ao vírus (E)				
Amostras submetidas ao Tratamento com Tripsina				
Nº amostra	Amostras contendo zigotos ($E_{TT.e}$)		Alíquota da última gota de lavagem ($E_{TT.ug}$)	
	n-PCR	ECP	n-PCR	ECP
17	+	+	+	+
18	-	-	-	-
19	-	-	+	+
20	+	+	-	-
21	+	-	-	-
22	+	+	-	-
23	+	-	+	-
24	+	-	-	-

- Indicação de resultado negativo na n-PCR; + Indicação de resultado positivo na n-PCR

Grupo de 97 embriões expostos aos vírus (E) e submetidos ao Tratamento com Tripsina (TT)			
Tratamento foi	**nº das amostras**	**nº de embriões**	**Porcentagem**
Eficiente	21, 23 e 24	38	38/97= 39,17%
Eficaz	18	9	9/97= 9,27%
Eficiente e Eficaz	18, 21, 23 e 24	47	**47/97= 48,45%**
Não satisfatório	17, 19, 20 e 22	47	**50/97= 51,55%**

Quadro 7: Análise do resultado do Tratamento com Tripsina (Eficiente, Eficaz , 'Eficiente+Eficaz' e não satisfatório) em relação ao número de embriões.

5 DISCUSSÃO

Existem evidências de que oócitos e ovidutos colhidos em abatedouros comerciais para a produção de embriões *in vitro* podem estar contaminados por agentes patogênicos (D'ANGELO, 1998; FERREIRA, 2003). Entre estes o BoHV-1. Sabe-se que animais aparentemente sadios podem conter o BoHV-1 em seus ovários, ovidutos e oócitos (VAN DER MAATEN et al., 1985; GUÉRIN et al., 1989).

Teoricamente, a infecção pode ocorrer antes mesmo da ovulação, pelo contato do vírus com o tecido ovariano e no líquido folicular, ou durante a fecundação, caso o vírus esteja presente externamente em um ou ambos os gametas (GUERIN et al., 1990; BIELANSKI et al., 1993). Embora a zona pelúcida (ZP) tenha sido destacada como uma barreira de proteção para muitos patógenos, a contaminação de oócitos e embriões poderiam ocorrer em conseqüência da suposta adsorção de partículas virais à zona pelúcida (VANROOSE et al., 2000).

Os envelopes dos alphaherpesvírus, incluindo HHV-1 e HHV-2 (*Herpesvírus humano1 e 2*), SuHV-1 (*Herpesvírus suíno 1*) e o BoHV-1 contém um número de glicoproteínas homólogas em sua estrutura e função que estão envolvidas em vários passos da multiplicação viral (ANDRADE, 2006). Estas proteínas são responsáveis pela adesão inicial do vírus aos receptores celulares e à subseqüente penetração nas células hospedeiras, influenciando assim, o tropismo celular e tecidual (BARANOWSKI et al., 1996; SCHWYZER e ACKERMANN, 1996; BRYANT et al., 2003). A fim de avaliar a ação da tripsina sobre embriões murinos contaminados experimentalmente com BoHV-1 Colorado, o presente trabalho objetivou simular situações *in vitro* , nas quais o BoHV-1 Colorado foi introduzido nos zigotos em processo de clivagem *in vitro* e de seu co-cultivo com células MDBK, pois pesquisas mostraram que o BoHV-1 produz efeito citopático, ECP, bastante evidente em vários tipos celulares como os encontrados nas figuras 6, 7 e 8 (FLORES, FRANCO, ROEHE, 2007). Além disso, Ferreira (2003) ao comparar as estirpes Los Angeles (BoHV-1 Los Angeles) a Colorado (BoHV-1 Colorado) em embriões bovinos verificou maior virulência deste último, justificando a preferência pelo BoHV-1 Colorado.

Um fator que deve ser considerado em relação às inoculações experimentais realizadas *in vitro* é a forma pela qual o vírus interage com o embrião, pois essa nunca será igual ao ambiente *in vivo*. O meio no qual o embrião fica exposto ao vírus

pode conter diferentes concentrações de enzimas, provenientes dos fluidos oviductais e uterinos, alterando a interação entre os dois (BOOTH et al., 1999).

A escolha do camundongo como modelo experimental foi baseada em trabalhos previamente publicados (D'ANGELO et al., 2003; MALLEK et al., 1984, GALUPPO, 2002). Mallek et al. (1984) e Galuppo (2002) utilizaram embriões de camundongo como modelo para o estudo das conseqüências da contaminação *in vitro* desses embriões por *B. abortus*. Utilizaram embriões com ZP intacta no estádio 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).

O experimento 1 mostrou que, os zigotos (grupo E) expostos ao BoHV-1 Colorado apresentam CPE intenso (Figuras 6, 7, 8 e 9) e taxa de clivagem significativamente menor (χ^2 de 6,256> χ^2 crítico=3,841; α=0,05) quando comparado com o grupo controle (grupo C; Figura 4 e 5), grupo não exposto ao vírus, o que está de acordo com o verificado por Palazzi et al. (2009). Investigações dos efeitos do BoHV-1 sobre o desenvolvimento de embriões produzidos por FIV, provenientes de oócitos colhidos de vacas infectadas experimentalmente, mostraram que o vírus foi isolado dos embriões, líquidos foliculares, Células epiteliais de oviduto bovino (BOEC) e fluídos uterinos. A taxa de clivagem e a porcentagem de blastocistos desenvolvidos a partir de oócitos colhidos dos animais infectados foram inferiores comparadas com as dos animais controles. Não se sabe ainda, se a interferência no desenvolvimento de embriões *in vitro* foi causada: a) pelo efeito citopático do vírus nas células de oviduto e/ou dos embriões, b) pelo efeito da temperatura elevada associada com o período febril durante o estágio de viremia logo após a inoculação dos animais e, c) pela conjunção desses fatores. Ou seja, esses resultados indicam que animais infectados pelo BoHV-1 podem produzir embriões até o estágio de transferência. Sendo este o grande problema de disseminação da doença, pois existe a possibilidade de estarem associados com o vírus de tal maneira, a ponto de

provocarem um aumento no potencial de transmissão da doença por TE ou FIV (BIELANSKI e DUBUC, 1994).

Com o intuito de se eliminar agentes patogênicos, a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) preparou um guia de procedimentos e informações gerais para o uso da tecnologia de TE, enfatizando produções sanitárias, por parte da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), sobre o manuseio asséptico de oócitos e embriões com os objetivos de descrever técnicas necessárias para assegurar que a TE não resulte em transmissão de agentes patogênicos (STRINGFELLOW et al., 1998). Diversos autores testaram os procedimentos estabelecidos pela IETS, questionando sua eficiência como Stringfellow et al. (1990) que, testaram os tratamentos de lavagens com tripsina para inativação do BoHV-1 e BoHV-4, em 24 e 29 embriões, respectivamente, e verificaram que todos embriões portavam o patógeno após tratamento. Singh et al. (1982) encontraram eficiência de 64% para LS e 57% para TT para embriões contaminados com BoHV-1, ou seja, não houve diferença significativa entre LS e o TT.

Outras pesquisas foram e são feitas tentando estabelecer a efetividade dos tratamentos, porém pouco se comenta sobre os possíveis danos que um embrião pode sofrer por ser submetido a esses tratamentos. Bondioli et al. (1988) e Echternkamp et al. (1989) são os únicos que fazem menção à ação do tratamento com tripsina sugerindo, e não afirmando, que a exposição à tripsina parece não danificar os embriões bovinos. Além da tripsina, são usados, também, antibióticos, luz ultravioleta, agentes fotossensíveis e halaminas orgânicas na tentativa de encontrar um ”agente esterilizante” razoável. A grande preocupação ao utilizar certas estratégias esterilizantes nos embriões incide sobre prováveis danos que esses podem sofrer ao serem submetidos aos diversos tratamentos. No entanto, não há relatos experimentais dos possíveis danos do tratamento com tripsina em embriões murinos. Por isso, testamos os zigotos não contaminados com BoHV-1 Colorado e submetidos à LS (C_{LS}) e TT (C_{TT}), tendo como base, aspectos morfológicos e taxa de clivagem. Dados encontrados em nosso trabalho estão de acordo com Bondioli et al. (1988) e Echternkamp et al. (1989). Verificamos que o tratamento com tripsina não danificou os embriões, ou seja, não houve alteração morfológica (Figuras 10 e 11) e, também, não altera a taxa de clivagem quando comparamos os dois

tratamentos citados (χ^2 de 0,229< χ^2 crítico=3,841 ; α=0,05) (Gráfico 2) (Figuras 10 e 11).

Diferentes patógenos foram testados quanto à eficiência do TT. Bielanski et al. (1998) descreveram que em 71 embriões bovinos contaminados previamente com *Mycoplasma bovis*, após a LS, e em 40 embriões tratados com antibióticos, foi isolado o agente em 100% das amostras; e mesmo após o TT, isolou o microrganismo em todas as suas amostras. Bowen et al. (1982) constataram que o vírus da língua azul e o vírus da diarréia viral bovina foram eliminados com o TT. D`Angelo et al. (2009) testaram o TT em embriões bovinos contaminados experimentalmente com BoHV-1, onde a última gota submetida ao tratamento, inoculada em células MDBK foram separadas para a n-PCR, tendo como negativo para a presença do patógeno. No entanto, os embriões, após tratamento, portavam o patógeno. Em nosso trabalho, também encontramos resultados que, a princípio, sugerem ação esperada da tripsina ao observamos ausência de alterações morfológicas dos embriões murinos expostos ao vírus e submetidos ao tratamento (Figura 12; Tabela 10: amostra 21, 23 e 24). Porém, a positividade de algumas amostras de embriões submetidas ao TT ($E_{TT.e}$) e última gota ($E_{TT.ug}$), pela nested-PCR, assim como a 'diferença não significativa' em relação à taxa de clivagem (χ^2 de 1,57< χ^2 crítico=5,99; α=0,05) (Gráfico 3) e o efeito citopático (ECP; Tabela 7) demonstram resultado não satisfatório. Este resultado está de acordo com D`Angelo (1998) que detectou o vírus pela nested-PCR , após titulação do meio de cultura da co-cultura, apesar da diminuição na concentração de vírus do meio de cultura que passou pelo TT.

A penetração de vírus envelopados nas células hospedeiras envolve as etapas de ligação de proteínas virais de superfície a receptores celulares e, em seguida, a penetração por fusão do envelope com a membrana plasmática. A penetração por fusão pode ocorrer na superfície celular (processo independente de pH) ou no interior de vesículas, após endocitose (processo pH dependente) (ROIZMAN e PALESE, 1996). As fases iniciais de infecção - ligação aos receptores e fusão/penetração - se constituem em etapas críticas na replicação de vários vírus (CHOU, 2007). O sucesso da replicação do vírus na célula requer uma extraordinária cascata de interação entre o vírus e a célula hospedeira. Muitos tem como parte de seu arsenal a habilidade de modular as vias da apoptose no hospedeiro através da

manipulação de uma variedade de proteínas chaves para a apoptose (HAY e KONNOURAKIS, 2002). A apoptose é um processo fisiológico ativo da condensação da cromatina, redução do volume celular e formação de vesículas na membrana chamada corpos apoptóticos, resultando em fragmentos e eliminação de células desnecessárias e danificadas (SCHWARTZMAN e CIDLOWSKI, 1993). Portanto, o tratamento com tripsina só possui ação eficiente quando promove a inativação (inviabilização viral) de um número relativo de glicoproteínas responsáveis pela adsorção do vírus que, ao final do tratamento, poderia promover também, uma diminuição na concentração do vírus abaixo da dose infectante. Porém, observamos não existir diferença significativa (χ^2 de 0.2667 < χ^2 crítico=3,841 ; α=0,05) (Gráfico 4) entre os ensaios de nested-PCR para os embriões submetidos à LS e os embriões submetidos ao TT (Tabelas 3 e 4). Foi possível verificar, também, não só a presença do vírus em embriões ($E_{LS.e}$ e E_{TT}.e; Tabelas 3 e 4) e nas últimas gotas ($E_{LS.ug}$ e $E_{TT.ug}$) como, também, sua viabilidade em células MDBK (Tabelas 6 e 7; Figuras 19A e 19B) através de ECP característico. Constatamos, também, que não houve diferença significativa relacionada ao ECP entre os embriões submetidos à LS e ao TT que foram inoculados em células MDBK (ECP negativo: $E_{LS.e}$ =62,5% e $E_{TT.e}$=62,5%; Gráfico 5).

Podemos fazer uma análise do TT segundo suas possibilidades em: Inativar e Eliminar: 1) Quando detectamos o vírus (no embrião e/ou última gota) pela n-PCR e, em contrapartida, há ECP negativo em células MDBK (inoculadas com embriões ou última gota) podemos dizer que houve inativação e/ou a dose infectante não foi suficiente, portanto neste caso o tratamento foi eficiente, porém não eficaz, pois não houve a eliminação do vírus (n-PCR positivo) (Tabela 10: amostra 21, 23 e 24); 2) Já a eliminação, almejada em manuseio sanitário de embriões, ocorre quando a n-PCR e o ECP (em MDBK) são negativos para a amostra (Tabela 10: amostra 18). Nesse último quesito, tanto o TT quanto a LS tiveram, praticamente, mesmo êxito (Tabela 9: amostras 12 e 16) (Tabela 10: amostra 18). Além disso, a tabela 10 também destaca que a ação da tripsina e o fator diluição (presente no TT), na maioria das amostras, não tiveram ação eficaz para eliminação do vírus, ou seja, considerando o conjunto das amostras submetidas ao TT, verificamos que a ação do TT não foi efetiva, possibilitando, desta forma, risco de transmissão no caso de transferência destes embriões. Também constatamos maior número de positividade nas amostras

contendo embrião do que na alíquota da última gota das amostras submetidas ao TT (Tabela 10: Resultados da análise do ECP em células MDBK comparado ao resultado de n-PCR para as amostras expostas aos vírus e submetidas apenas ao Tratamento com tripsina) em comparação à LS (Tabela 9: Resultados da análise do ECP em células MDBK comparado ao resultado de n-PCR para as amostras expostas aos vírus e submetidas apenas a Lavagem Seqüencial) o que pode se reflexo do estresse causado pela tripsina na ZP e membrana do embrião.

No entanto, considerando o mesmo conjunto das amostras submetidas ao TT, constatamos que o TT não é um tratamento que deve ser descartado, uma vez que em nossos dados houve melhora na morfologia dos embriões (Figura 12), uma taxa de eficiência de 39,17% (Quadro 7: amostras 21, 23 e 24) refletindo, principalmente, o papel da inativação da tripsina. E, finalmente, ao considerarmos a taxa de 'Eficiência +Eficácia' igual a 48,45% (Quadro 7: amostras 18, 21, 23 e 24) podemos dizer que o TT é um método de controle de extrema importância no tratamento de embriões *in vitro* visto que nenhum método sanitário possui eficiência plena.Há, também, a necessidade de adicionar estes estudos a ensaios *in vivo* para que se possa averiguar se a presença dos vírus após tratamento é capaz de causar a doença no animal receptor uma vez que o trabalho realizado merece ressalva fundamental quanto à possibilidade de extrapolar observações feitas em sistemas *in vitro* para sistemas *in vivo*. Entre outros fatores, a presença do sistema imunológico, 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).

6 CONCLUSÕES

6.1 Os zigotos murinos possuem sensibilidade ao BoHV-1 Colorado após exposição *in vitro*, uma vez que foram constatadas alterações em sua morfologia e desenvolvimento.

6.2 O Tratamento com Tripsina não foi efetivo para eliminar o vírus, no entanto em alguns ensaios ocorreu inativação viral, por este motivo destacamos que se trata de um importante e indispensável método de controle *in vitro.*

REFERÊNCIAS*

ACKERMANN M.; PETERHANS E.; WYLER R. DNA of Bovine Herpesvirus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. **Am. J**. **Vet**., v. 43, p. 36-40, 1982.

ACKERMANN, M.; MÜLLER, H. K.; BRUCKNER, L. et al. Eradication of infectious bovine rhinotracheitis in Switzerland: review and prospects. **Veterinary Microbiology**, v. 23, p. 365–370, 1990.

ALICE, F. J. Isolamento do vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) no Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 38, n. 4, p. 919-920, 1978.

ANDRADE, G. I. **Diagnóstico sorológico de *Herpesvirus bovino 1* e *5*: proteínas virais, recombinantes e peptídeos sintéticos em suportes sólidos comerciais e modificados por engenharia de superfície**. 2006. 134 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2006.

BARANOWSKI, E.; KEIL, G.; LYAKU, J. et al. Structural and functional analysis of bovine herpesvirus 1 minor glycoproteins. **Veterinary Microbiology**, v. 53, p. 91–101, 1996.

BIELANSKI, A.; LOEWEN, K.S.; DEL CAMPO, M. R.; SIRARD, M. A.; WILLADSEN, S. **Isolation of bovine herpesvirus-1 (BoHV-1) and bovine viral diarrhea virus (BVDV) in association with the *in vitro* production of bovine embryos**. Theriogenolgy, v. 40, p. 531-538, 1993.

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

BIELANSKI, A.; LUTZE-WALACE, C.; SAPP, T.; JORDAN, L. The efficacy of trypsin for disinfection of *in vitro* fertilized bovine embryos exposed to bovine herpesvirus 1. **Animal reproduction science,** v. 47, p. 1-8, 1996.

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

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informações e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BIELANSKI, A; SURUJBALLI, O.; THOMAS, G.E.; TANAKA, E. Sanitary status of oocytes and embryos collected from heifers experimentally to. **Anim. Rep. Scie.**, v. 54, p. 65-73, 1998.

BOLIN, S.R.; TUREK,J.J.; RUNNELS, L.J.; GUSTAFSON, D.P.; Pseudorabies virus, porcine parvovirus, and porcine enterovirus interactions with the zona pelucida of the porcine embryo. **Am. J. Vet. Res.,** v. 44, n. 6, p. 1036-1039,1983.

BONDIOLI K. R., GRAY K. R., GIBSON J. B., The effect of trypsin washing on post-thaw viability of bovine embryos. **Proc 7th Convention Amer. Emb. Trans. Assoc**., p. 85-89, 1988.

BOOTH, P. J.; COLLINS, M. E.; JENNER, L. Association of noncythopatogenic BVDV with bovine blastocysts: effects of washing, duration of viral exposure and degree of blastocyst expansion. **Veterinary Record,** v. 144, p. 150-152, 1999.

BOWEN, R. A.; HOWARD, T. H; PICKETT, B. W. Interaction of bluetongue virus with peimplantantation embryos from mice and cattle. **Am. J. Vet. Res.**, v. 40, p. 1907-1911, 1982

BRAGGIO, M. M.; MARTINS, A. R. S.; VALERO, V. B. Influência do manejo na produtividade e no desenvolvimento de camundongos (*Mus musculus*). **Arq. Inst. Biol.,** São Paulo, v. 70, p. 149-153, 2003.

BRYANT, N. A.; DAVIS-POYNTER, N.; VANDERPLASSCHEN, A. et al. Glycoprotein G isoforms from some alphaherpesviruses function as broadspectrum chemokine binding proteins. **The EMBO Journal**, v. 22, p. 833–846, 2003.

CERQUEIRA, R. B.; CARMINATI, R.; SILVA, J. M.; SOARES, G. C.; MEYER, R.; SARDI, S. Serological survey for bovine herpesvirus 1 in cattle from different regions in the state of Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science,** v. 37, n. 6, p. 1-8, 2000.

CHOU, T. Stochastic entry of enveloped viruses: fusion versus endocytosis. **Biophysical Journal**, v. 93, n. 4, p. 1116-1123, 2007. Disponível em: <http://www.biophysj.org/cgi/content/abstract/93/4/1116>. Acesso em: 10 set. 2009. doi: 10.1529/biophysj.107.106708.

COLODEL, E. M.; NAKAZATO, L.; WEIBLEN, R.; MELLO, R. M.; SILVA, R. R. P.; SOUZA, M. A.; FILHO, J. A. O.; CARON, L. Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por herpesvírus bovino no Estado de Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural,** v. 32, n. 2, p. 293-298, 2002.

D'ANGELO, M. **Interação do Herpesvirus Bovino tipo-1 (BoHV-1) com oócitos bovinos maturados *in vitro*.** 1998. 52 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Departamento de Microbiologia do 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. Apresentado na Reunião Anual do Instituto Biológico, 14., 2001, São Paulo.

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. Apresentado na Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, Cincinnati, 36., 2003, Ohio.

D'ANGELO, M.; VISINTIN, J. A.; RICHTZENHAIN, L. I.; GONÇALVES, R. F. Evaluation of trypsin treatment on the inactivation of bovine herpesvirus type 1 on in vitro produced pre-implantation embryos. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 44, n. 3, p. 536-539, 2009.

ECHTERNKAMP S. E.; KAPPES S. M.; MAURER R. R. Exposure of bovine embryos to trypsin during washing does not decrease embryonic survival**. Theriogenology,** v. 32, p. 131-137, 1989.

EDWARDS, S. Changing trends in infectious bovine rhinotracheitis in Great Britain. **Veterinary Record**, v. 123, p. 614–618, 1988.

ENGELS, M.; ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Vet. Microbiol**., v. 53, n. 1-2, p. 3-15, 1996.

FENNER, F. J.; GIBBS, E. P. J.; MURPHY, F. A. Herpesviridae. In:_____. **Veterinay Virology**. 2. ed. New York: Academic Press, 1993. p. 335-368

FERREIRA, C. Y. M. R. **Infectividade de distintas estirpes do Herpersvírus Bovino-1 associadas a oócitos bovinos maturados in vitro**. 2003. 51 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Universidade do Estado de São Paulo, Jaboticabal, 2003.

FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M. **Virology**, New York: Raven Press, 1992. 2 v.

FIELDS, B.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M., et al. **Virology.** 4th. ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

FLORES, E. F.; FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. *Herpesviridae.* In: FLORES, E. F. (Org). **Virologia Veterinária.** Santa Maria, Rio Grande do Sul: Ed UFSM, 2007. p 435-440.

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. Apresentado na Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 14, 1999, Campos do Jordão.

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 murined zygotes by the Nested-PCR technique. **Theriogenology**, v 57, p. 571, 2002.

GUERIN, B.; LE GUIENNE , B.; ST. CHAFFAUX, S.; HARLAY, T.; ALLIETTA, M.; THIBIER, M. Contamination des ovocytes et des embryos fecondes *in vitro* après infection experimentale de vaches donneuses par le virus herpes bovin de type 1. ***Recueil de Medicine Veterinaire***, v. 165, n. 10, p. 827-833, 1989.

GUERIN, B.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; ALIETTA, M.; HARLAT, T. & THIBER, M. Effects de la contamination par le BoHV-1 pur la maturation et la fecundation *in vitro* des ovocytes de bovins. **Rec. Méd Vet**., p. 911-7, 1990.

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

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

HUNT, R. Herpesviruses. In:_____(Ed.). **Virology.** South Carolina: Ed. University of South Carolina, 2005. cap. 11. Disponível em: <http://www.med.sc.edu:85/virol/herpes.htm>. Acesso em: 20 jun. 2010.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo Agropecuário; Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA, 2007. Disponível em: <http:// www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp>. Acesso em: 10 jun. 2010.

KUNRATH, C. F.; VOGEL, F. S. F.; OLDONI, I.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; DEZENGRINI, R.; TORRES, F. D.; PAN, K. A. Soroneutralização e imunofluorescência utilizando anticorpos monoclonais no diagnóstico rápido de infecções pelo herpesvírus bovino tipos 1 e 5 (BHV-1 e BHV-5). **Ciência Rural,** v. 34, n. 6, p. 1877-1883, 2004.

LEMAIRE, M.; PASTORET, P. P.; THIRY, E. Le contrôle de l'infection pas le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. **Ann. Méd. Vét**., v. 138, n. 3, p. 167-180, 1994.

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.

MILLER J. M. The effects of IBR virus infection on reprodutive function of cattle; Symposium on Ibr virus. **Veterinary Medicine**, p. 95-8 jan. 1991.

MUELLER, S. B. K.; IKUNO, A. A.; TERESA, M. et al. Isolation and identification of the infectious bovine rhinotracheitis virus in a bovine fetus kidney (IBR/IPV). **Arquivo do Instituto Biológico** (São Paulo), v. 45, p. 187-189, 1978.

NOGUEIRA, F. R. C.; CAMARGO, A. J. R.; RESENDE, O. A. et al. Ocorrência de rinotraqueíte infecciosa bovina/vulvovaginite pustular infecciosa em bovinos no Estado do Rio de Janeiro. **Comunicado Técnico**, n. 167, p. 1-5, 1986.

PALAZZI, E. G.; GOES, A. C; PICCOLOMINI, M. M.; PAVÃO, D. L; BATISTA, M. L, ALVES, M. F., DANGELO, M. Avaliação da Taxa de Clivagem em zigotos murinos infectados, experimentalmente, com o vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (BoHV-1) amostra Colorado. **SBM in Foco** (São Paulo), n. 9, p. 132, 2009.

PITUCO, E.M.; CARNEIRO, B.; MENZ, I.; STEFANO, E.; OKUDA, L.H. Detecção de anticorpos contra o Herpesvírus Bovino tipo 1 (HVB-1) em rebanhos de corte e leite com problemas reprodutivos no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico,** v. 66, p. 126, 1999. Suplemento. Apresentado no Congresso Brasileiro de Buiatria, 3, 1999, São Paulo.

REED, L J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **Am. J. Hyg.,** v. 27, p. 493, 1938.

ROIZMAN, B.; PALESE, P. Multiplication of viruses: an overview. In: FIELDS, B. et al. **Fields virology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1996. cap. 4, p. 101-111.

SAKKAS, D. Preimplantation mouse embryos in co-culture different cell types. **Contracept. Fertil. Sex**., v. 20, n. 10, p. 959-962, 1992.

SCHWYZER, M.; ACKERMANN, M. Molecular virology of ruminant herpesvirus. **Veterinary Microbiology**, v. 53, p. 17-29, 1996.

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

SIGNH, E. L.; THOMAS, F. C.; PAPP-VID, G.; EAGLESOME, M. D.; HARE, C. D. The *in vitro* exposure of preimplantation bovine embryos to infectious bovine rinotracheitis virus; **Theriogenoloy**, v. 18, p. 133-140, 1982.

SINGH, E. L.; HARE, W. C. D; THOMAS, F. C.; 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. p. 169-176,1983.

SINGH, E. L.; THOMAS, F. C.; The in vitro exposure of zona pelucida – intact porcine embryos to swine vesicular disease virus. **Theriogenology,** v. 27, p. 443-449,1987.

STRAUB, O. C. BoHV-1 infectious: relevance and spread in Europe. **Comp. Immunol. And Microbiol. Inf. Dis.**, v. 14, n. 2, p. 175-186, 1991.

STRINGFELLOW, D. A.; LAUERMAN, L. H.; THOMSON, M. S. Trypsin treatment of bovine ova after in vitro exposure to vesicular stomatitis virus. **Am. J. Vet. Res.,** v. 50, n. 6, p. 990-992, 1989.

STRINGFELLOW, D. A.; LAUERMAN, L. H.; NASTI, K. B.; GALIK, P. K. Trypsin treatment of bovine ova after in vitro exposure to infectious bovine rhinotracheitis virus or bovine herpes virus-4. **Theriogenology**, v. 34, n. 3, p. 4 27-434, set. 1990.

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.** Jaboticabal: SBTE, 1998. p. 83-96.

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

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.

VAN DER MAATEN, M. J.; MILLER, J. M.; WHETSTONE, C. A. Ovarian lesions induced in heifers by intravenous inoculation with modified – live infectious bovine rhinotracheitis virus on the day after breeding**. Am. J. Vet.,** v. 46, p. 1196-999, 1985.

VANROOSE, G.; NAUWYNCK, H.; VAN SOON, A.; VANOPDENBOSCH, E.; DE KRUIF, A. Replication of bovine herpesvirus-1 in *in vitro*-produced bovine embryos at different stages of development, **Theriogenology,** v. 45, p. 235, 1996.

VANROOSE, G.; KRUIF, A.; VANSOON, A. embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. **Anim. Reprod. Amsterdam**, p. 143, 2000.

VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A. A produção de embriões bovinos no Brasil: uma nova realidade. **Acta Scientiae Veterinariae,** v. 35, p. s915-s924. 2007. Suplemento 3.

VIEIRA, S.; BRITO, W. M. E. D.; SOUZA, W. J.; ALFAIA, B. T.; LINHARES, D. C. L. Anticorpos para o herpesvírus bovino 1 (BHV-1) em bovinos do Estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira,** v. 4, n. 2, p. 131-137, 2003.

WHITBECK, J. C.; BELLO, L. J.; LAWRENCE, W. C. Comparison of the bovine herpesvirus 1 gI gene and the herpes simplex virus type 1gB gene. **Journal of Virology**, v. 62, p. 3319-3327, 1988.

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.