

SAULLO VINÍCIUS PEREIRA ALVES

**EFEITO DO *Bovine alphaherpesvirus 1* NO DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES
BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* NATURALMENTE E ARTIFICIALMENTE
INFECTADOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: José Domingos Guimarães

Coorientadores: Abelardo Silva Junior
Simone Eliza Facioni Guimarães

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

A474e
2023
Alves, Saullo Vinícius Pereira, 1993-
Efeito do *Bovine alphaherpesvirus 1* no desenvolvimento
de embriões bovinos produzidos *in vitro* naturalmente e
artificialmente infectados / Saullo Vinícius Pereira Alves. –
Viçosa, MG, 2023.

1 tese eletrônica (82 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndice.

Orientador: José Domingos Guimarães.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Veterinária, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.253>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Bovinos - Doenças. 2. Bovinos - Vírus. 3. Fertilização in
vitro. 4. Blastocisto. 5. Apoptose. 6. Imunofluorescência.
I. Guimarães, José Domingos, 1963-. II. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária. III. Título.

CDD 22. ed. 636.2089691


SAULLO VINÍCIUS PEREIRA ALVES

EFEITO DO *Bovine alphaherpesvirus 1* NO DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* NATURALMENTE E ARTIFICIALMENTE INFECTADOS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 10 de fevereiro de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 SAULLO VINICIUS PEREIRA ALVES
Data: 08/05/2023 17:14:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Saullo Vinícius Pereira Alves
Autor

Documento assinado digitalmente
 JOSE DOMINGOS GUIMARAES
Data: 09/05/2023 08:33:48-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

José Domingos Guimarães
Orientador

Dedico esse trabalho aos meus amados pais, José e Adriana e meus
filhos, Theo e Bernardo que são as razões
da minha vida, meus maiores bens.

AGRADECIMENTOS

Gratidão a todos que estiveram ao meu lado durante essa jornada é o sentimento que fica após essa importante etapa da minha vida profissional. Foram anos intensos de muito aprendizado, trabalho, dedicação e crescimento pessoal.

Aos meus pais, José e Adriana, obrigado por tudo, pelo amor, carinho e por serem os grandes incentivadores da formação e educação de seus filhos, não há palavras para descrever tamanha admiração e gratidão que tenho por vocês. Aos meus irmãos, Marcelle e Talles, agradeço pelo exemplo e momentos de alegria compartilhados. Grato também aos meus familiares, amigos e colegas pelo apoio, companheirismo, atenção e pelos momentos de felicidade.

À minha esposa Daniela, obrigado pela amizade, carinho e pelo amor devotado pelos nossos filhos.

Aos grandes mestres da minha jornada acadêmica, professores da Universidade Federal de Viçosa, da University of Minnesota e ao grande professor Dr. James Richard Pursley da Michigan State University, fica o meu eterno agradecimento por todo o conhecimento compartilhado e por terem suscitado minha grande admiração à vida acadêmica.

Ao meu orientador Jota (Dr. José Domingos Guimarães), obrigado pela orientação, pela oportunidade de executar esse trabalho e pela compreensão em momentos difíceis de ordem médica do meu filho.

Aos professores Dr. Abelardo Silva Junior e Dra. Simone Eliza Facioni Guimarães agradeço pela coorientação, auxílio e aprendizados durante o experimento. Grato também a Dra. Vanessa Lopes Dias Queiroz e ao Dr. Jurandir Mauro Penitente Filho pela participação e colaboração na banca.

Agradecimento especial à Vivian, por todos esses anos de convivência e parceria, pelas inúmeras rotinas no laboratório e viagens de madrugada para coleta para tornar possível esse trabalho. Amizade que levarei para o resto da vida.

À Vanessa, Faider, Domingos e Andréia, agradeço pela amizade e cooperação além dos momentos de aprendizado e descontração durante o doutorado.

Aos servidores técnico-administrativos da Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Walmir, a Rosi, o Marquinhos e a Divina, que sempre estiveram dispostos a ajudar, bem-aventurado fico pelo fundamental auxílio prestado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela oportunidade de realizar o curso de doutorado e pela concessão da bolsa de estudo.

Sobretudo, obrigado Deus! Pela fiel companhia e por ter me concedido o imenso prazer da vida e saúde dos meus filhos e da vivência com pessoas tão especiais durante esses anos.

BIOGRAFIA

Saullo Vinícius Pereira Alves, filho de José Calisto Alves e Adriana Aparecida Pereira Alves, pai de Theo Vallim Alves e Bernardo Vallim Alves, natural da cidade de Sete Lagoas, Minas Gerais, nasceu em 21 de setembro de 1993.

Iniciou a sua vida acadêmica no ensino superior quando ingressou na Universidade Federal de Viçosa em março de 2011, vindo a graduar-se como médico veterinário em janeiro de 2017. Durante esse período, nos anos de 2014 e 2015 recebeu oportunidade de realizar graduação sanduíche por meio de bolsa de estudos do Programa Ciências sem Fronteiras nos Estados Unidos, tendo estudado na University of Minnesota-Crookston e na Michigan State University, East Lansing.

Iniciou o curso de Mestrado em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Viçosa em março de 2017, vindo a realizar defesa da dissertação em 23 de julho de 2018.

Em agosto de 2018 ingressou no curso de Doutorado em Medicina Veterinária na área de Reprodução e Produção Animal do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, foi aprovado no exame de qualificação em 30 de julho de 2021, vindo a realizar defesa de tese em 10 de fevereiro de 2023.

“Try to make sense of what you see and wonder about what makes the universe exist. Be curious, and however difficult life may seem, there is always something you can do, and succeed at. It matters that you do not just give up.”

(Stephen Hawking)

RESUMO

ALVES, Saullo Vinícius Pereira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2023. **Efeito do *Bovine alphaherpesvirus 1* no desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro* naturalmente e artificialmente infectados.** Orientador: José Domingos Guimarães. Coorientadores: Abelardo Silva Junior e Simone Eliza Facioni Guimarães.

O *bovine alphaherpesvirus 1* (BHV1) é um agente que encontra-se amplamente disseminado nos rebanhos bovinos de corte e leite no Brasil e no mundo. Sua reconhecida capacidade de transmissão por meio das biotécnicas reprodutivas de manipulação das células germinativas masculinas e femininas, como a produção *in vitro* de embriões, atrai atenção especial tendo em vista a vasta e crescente difusão dessa técnica na bovinocultura. Essa infecção viral é responsável por prejuízos à pecuária mundial que estão relacionados principalmente aos aspectos reprodutivos. Esse estudo, dividido em dois capítulos, teve por objetivo avaliar os efeitos do BHV1 sobre o desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro* em modelo de infecção natural e artificial. Além disso, analisou-se também a expressão de transcritos relacionados à apoptose celular, estresse oxidativo, remodelamento gênico e desenvolvimento embrionário, bem como investigou-se a presença e localização viral nos embriões produzidos. Para os procedimentos experimentais, foram coletados sangue e ovários de fêmeas bovinas provindas de rebanhos sabidamente sem histórico de vacinação contra o BHV1. O capítulo I abrangeu o estudo de ovócitos de doadoras não vacinadas mas naturalmente infectadas. Já no capítulo II, ovócitos de animais soronegativos para o BHV1 foram artificialmente expostos ao vírus em diferentes etapas: (1) durante a etapa de maturação (2) fecundação e (3) cultivo, além do (4) grupo controle. No capítulo I, menor taxa de produção de embriões viáveis (13,66 %) foi observado no grupo de doadoras soropositivas ($P < 0,05$) quando comparado com a obtida em doadoras soronegativas (21,27 %). Embriões oriundos de animais soropositivos, ainda que considerados viáveis, tiveram maior expressão da caspase 2, gene envolvido no processo de apoptose. Diferença significativa também foi observada para taxa de produção de embriões inviáveis, sendo menor no grupo de doadoras soronegativas (9,52 %). No teste de imunofluorescência, não foram identificadas partículas de BHV1 em embriões de doadoras soronegativas, mas em 7/31 (22,58 %) dos embriões de doadoras soropositivas foi identificado o BHV1. No capítulo II, verificou-se redução ($P < 0,05$) na taxa de clivagem do grupo 1 quando comparado ao grupo controle. O grupo de infecção durante o cultivo (3) foi o mais afetado quanto as taxas de produção de embriões viáveis e

inviáveis (9,84 e 45,35 %) comparado ao grupo controle (57,14 e 9,30 %). A infecção artificial pelo BHV1 ocasionou também efeitos ($P < 0,05$) no aumento da expressão dos genes APAF1 e CASP2, envolvidos no processo de apoptose celular, e dos genes DNMT3B, GJA1 E FGF9 relacionados ao remodelamento gênico e desenvolvimento embrionário. Diante disso, conclui-se que o BHV1 foi capaz de afetar negativamente o desenvolvimento *in vitro* de ovócitos e embriões tanto nas condições de infecção *in vitro* e especialmente em condições naturais de infecção, elucidando o menor desempenho reprodutivo observado desses animais.

Palavras-chave: Apoptose. Blastocisto. Cultivo *in vitro*. Imunofluorescência. Vírus.

ABSTRACT

ALVES, Saullo Vinícius Pereira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2023. **Effect of Bovine alphaherpesvirus 1 on development of *in vitro* produced bovine embryos naturally and artificially infected.** Advisor: José Domingos Guimarães. Co-advisors: Abelardo Silva Junior, and Simone Eliza Facioni Guimarães.

Bovine alphaherpesvirus 1 is widely disseminated in beef and dairy cattle herds in Brazil and worldwide. Its recognized ability of transmission through reproductive biotechniques such as the *in vitro* embryo production, attracted special attention in view of the dissemination of this technique in cattle breeding. This viral infection is responsible for important livestock losses worldwide that are mainly related to reproductive aspects. This study, divided into two chapters, aimed to evaluate the effects of bovine alphaherpesvirus 1 (BHV1) on the development of *in vitro* produced bovine embryos in a natural and artificial infection model. In addition, the expression of transcripts related to cell apoptosis, oxidative stress, genomic remodeling and embryonic development was also analyzed, as well as the presence and viral localization. For the experimental procedures, blood and ovaries were collected from slaughterhouse cows unvaccinated against BHV1. Chapter I covered the study of naturally infected oocytes from unvaccinated donors, while in Chapter II, oocytes from seronegative animals were artificially exposed to the virus at different stages (1) during the *in vitro* maturation stage, (2) *in vitro* fertilization, (3) *in vitro* culture, and (4) control group. In chapter I, a lower viable embryos rate (13.66 %) was observed in the group of seropositive donors ($P < 0.05$) when compared with that obtained in seronegative donors (21.27 %). Embryos from seropositive animals, although considered viable, had a higher expression of caspase 2, a gene involved in the apoptosis process. A significant difference was also observed for the non-viable embryos rate, being lower in the group of seronegative donors (9.52 %). In the immunofluorescence test, BHV1 particles from seronegative donor embryos were not identified, but BHV1 was identified in 7/31 (22.58 %) of the embryos from seropositive donors. In chapter II, there was a significant reduction ($P < 0.05$) in the cleavage rate of group 1 when compared to the control group. The infection group during *in vitro* culture (3) was the most affected in terms of the viable and non-viable embryos rates (9.84 and 45.35 %) compared to the control group (57.14 and 9.30 %). The artificial infection by BHV1 also caused effects ($P < 0.05$) in the increase of the expression of APAF1 and CASP2 genes, involved in the cell apoptosis process, and of the DNMT3B, GJA1 and FGF9 genes, related to

gene remodeling and embryonic development. In view of this, it is concluded that BHV1 was able to impair the *in vitro* development of oocytes and embryos both in *in vitro* infection conditions and especially in natural infection conditions, elucidating the lower reproductive performance observed in these animals.

Keywords: Apoptosis. Blastocyst. Immunofluorescence. *In vitro* culture. Virus.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1** - Embriões bovinos viáveis produzidos *in vitro* em diferentes estágios de desenvolvimento visualizados com auxílio de microscópio estereoscópio. Bl = Blastocisto, Bx = Blastocisto expandido e Bn = Blastocisto em eclosão..... 46
- Figura 2** – Expressão gênica relativa em fold-change dos genes APAF1, BAX, CASP2, CASP3, DNMT1, DNMT3B, FGF9, GATA6, GPX1, IFNT, MCL1, NANOG, POU5F1 e SOD2 de embriões bovinos de acordo com a origem dos ovócitos: doadoras soropositivas e soronegativas para o BHV1. Valores positivos de fold-change significam maior expressão gênica daqueles oriundos de doadoras soronegativas em comparação com soropositivas, enquanto valores negativos representam maior expressão gênica em embriões oriundos de doadoras soropositivas. *P < 0.05. 49
- Figura 3** – Embriões bovinos oriundos de animais soropositivos (A) e (B) e doadoras soronegativas (C) e (D). A imagem (A) e (B) destacam a presença do BHV1 apontado pelas setas brancas, caracterizada pelos pontos de fluorescência verde presente nas células embrionárias..... 51
- Figura 4** – Sequência de imagens z-Stack de embrião oriundo de vaca soropositiva na microscopia confocal em diferentes focos, elucidando a presença do BHV1 (pontos verde-fluorescentes indicados pelas setas) na superfície da zona pelúcida e no interior de células embrionárias..... 52

CAPÍTULO II

- Figura 1** – Microgotas de cultivo *in vitro* de embriões bovinos mostrando variadas estruturas presentes no dia 7 pós fecundação *in vitro* de doadora do grupo experimental de infecção durante a MIV (A), CIV (B), FIV(C) e do grupo controle (D), sendo visualizadas com auxílio de microscópio estereoscópio..... 72
- Figura 2** – Expressão gênica relativa em fold-change dos genes APAF1, BAX, CASP2, CASP3, DNMT1, DNMT3B, FGF9, GATA6, GPX1, GJA1, IFNT, MCL1, NANOG, POU5F1 e SOD2 de embriões bovinos de acordo com o grupo controle e de infecção artificial na MIV pelo BHV1..... 73
- Figura 3** – Expressão gênica relativa em fold-change dos genes APAF1, BAX, CASP2, CASP3, DNMT1, DNMT3B, FGF9, GATA6, GPX1, GJA1, IFNT, MCL1, NANOG, POU5F1 e SOD2 de embriões bovinos de acordo com o grupo controle e de infecção artificial na FIV pelo BHV1. *P < 0.05..... 74

Figura 4 – Expressão gênica relativa em fold-change dos genes APAF1, BAX, CASP2, CASP3, DNMT1, DNMT3B, FGF9, GATA6, GPX1, GJA1, IFNT, MCL1, NANOG, POU5F1 e SOD2 de embriões bovinos de acordo com o grupo controle e de infecção artificial no CIV pelo BHV1. *P < 0.05.....	74
Figura 5 – Expressão gênica relativa em fold-change dos genes APAF1, BAX, CASP2, CASP3, DNMT1, DNMT3B, FGF9, GATA6, GPX1, GJA1, IFNT, MCL1, NANOG, POU5F1 e SOD2 de embriões bovinos de acordo com o grupo de infecção artificial na MIV e FIV pelo BHV1. *P < 0.05.....	75
Figura 6 – Expressão gênica relativa em fold-change dos genes APAF1, BAX, CASP2, CASP3, DNMT1, DNMT3B, FGF9, GATA6, GPX1, GJA1, IFNT, MCL1, NANOG, POU5F1 e SOD2 de embriões bovinos de acordo com o grupo de infecção artificial na FIV e CIV pelo BHV1. *P < 0.05.....	75
Figura 7 – Expressão gênica relativa em fold-change dos genes APAF1, BAX, CASP2, CASP3, DNMT1, DNMT3B, FGF9, GATA6, GPX1, GJA1, IFNT, MCL1, NANOG, POU5F1 e SOD2 de embriões bovinos de acordo com o grupo de infecção artificial no CIV e MIV pelo BHV1. *P < 0.05.....	76
Figura 8 – Embriões bovinos infectados artificialmente pelo BHV1 durante as fases de MIV (A), FIV (B) e CIV (C). O blastocisto mostrado em D pertence ao grupo controle. As imagens A, B e C destacam a presença do BHV1 apontado pelas setas brancas, caracterizada pelos pontos de fluorescência verde presente nas células embrionárias e zona pelúcida.....	77

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 – Classificação sorológica das fêmeas bovinas soropositivas do estudo experimental.....	44
Tabela 2 – Distribuição da classificação de ovócitos (grau I a IV) e taxa de viabilidade de acordo com o status sorológico de fêmeas para o BHV1.....	45
Tabela 3 – Taxa de clivagem, viabilidade e inviabilidade de embriões produzidos <i>in vitro</i> de acordo com o status sorológico de fêmeas para o BHV1.....	46
Tabela 4 – Imunomarcção do BHV1 em embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> de acordo com o status sorológico das vacas doadoras.....	50

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Distribuição da classificação de ovócitos (grau I a IV) e taxa de viabilidade de acordo com o tratamento – diferentes etapas de infecção artificial com $10^{4,3}$ TCID ₅₀ /mL BHV1.....	68
Tabela 2 – Taxa de clivagem, viabilidade e inviabilidade de embriões produzidos <i>in vitro</i> de acordo com a etapa de co-cultivo com $10^{4,3}$ TCID ₅₀ /mL BHV1.....	69
Tabela 3 – Imunomarcção do BHV1 em embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> de acordo com a infecção viral experimental.....	77

SUMÁRIO

	Página
1	Introdução geral..... 17
2	Revisão de Literatura..... 19
2.1	<i>Bovine herpesvirus 1</i> 19
2.2	Epidemiologia do BoHV-1..... 21
2.3	Produção <i>in vitro</i> de embriões..... 24
3	Referências..... 27
4	Hipóteses..... 32
5	Objetivos..... 33
6	Capítulo I - Modelo de infecção natural de gametas e embriões pelo BHV1..... 34
6.1	Introdução..... 35
6.2	Materiais e métodos..... 36
6.2.1	Sinopse dos procedimentos experimentais..... 36
6.2.2	Coleta das amostras..... 37
6.2.3	Processamento das amostras..... 38
6.2.4	Soroneutralização viral..... 38
6.2.5	Real time qPCR..... 39
6.2.6	Aspiração folicular..... 41
6.2.7	Maturação, fecundação e cultivo <i>in vitro</i> 41
6.2.8	Capacidade de fecundação e desenvolvimento embrionário... 42
6.2.9	Microscopia Confocal de Varredura a Laser..... 43
6.2.10	Análises estatísticas..... 44
6.3	Resultados e discussão..... 44
6.4	Conclusão..... 52
6.5	Referências..... 54
7	Capítulo II - Modelo de infecção artificial de gametas e embriões pelo BHV1..... 56
7.1	Introdução..... 57
7.2	Materiais e métodos..... 58
7.2.1	Sinopse dos procedimentos experimentais..... 58

7.2.2	Coleta das amostras.....	60
7.2.3	Processamento das amostras.....	61
7.2.4	Soroneutralização viral.....	61
7.2.5	Real time qPCR.....	62
7.2.6	Aspiração folicular.....	64
7.2.7	Maturação, fecundação e cultivo <i>in vitro</i>	64
7.2.8	Capacidade de fecundação e desenvolvimento embrionário...	65
7.2.9	Microscopia Confocal de Varredura a Laser.....	66
7.2.10	Análises estatísticas.....	67
7.3	Resultados e discussão.....	67
7.4	Conclusão.....	78
7.5	Referências.....	78
8	Conclusões gerais.....	81
	Apêndice I.....	82

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil assume protagonismo na bovinocultura quanto ao uso de biotecnologias reprodutivas associadas ao embrião, sendo responsável atualmente por grande parcela de transferências de embriões produzidos *in vitro* no mundo. Nos últimos dados divulgados pela Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões, 345.126 embriões bovinos foram produzidos *in vitro* no país, destaque mundial, juntamente com os Estados Unidos, detentores dos mais expressivos números relacionados a produção *in vitro* de embriões (IETS, 2021). Além disso, o país é o detentor do maior rebanho comercial de bovinos do mundo (IBGE, 2021).

Esses números são respaldados pela crescente difusão do uso das biotécnicas reprodutivas como a produção *in vitro* de embriões (PIVE) e a transferência de embriões (TE). Essas biotécnicas reprodutivas, via de regra, têm contribuído para a redução na transmissão de patógenos, no entanto, ressalta-se que os riscos de transmissão de patógenos por meio dessas técnicas não podem ser desprezados. Nesse contexto, a infecção pelo BHV1 é de grande importância econômica, fácil disseminação e difícil controle, estando amplamente disseminada nos rebanhos bovinos de corte e de leite (MÉDICI et al., 2000; TAKIUCHI et al., 2001; THIBIER e WRATHALL, 2012).

Algumas pesquisas relatam o efeito negativo do BHV1 no sistema de PIVE, no entanto, não existe referência na literatura consultada sobre os efeitos do BHV1 em embriões oriundos de animais soropositivos naturalmente infectados (GUERIN et al. 1990; BIELANSKI e DUBUC, 1994; VANROOSE et al. 1999; MAKAREVICH, 2007; ALVES et al. 2019) que foi foco desse estudo.

Durante as etapas que constituem a PIVE os embriões sofrem inúmeras alterações, particularmente na estrutura da zona pelúcida, a exemplo da fase de fertilização (VANROOSE et al., 2000), tornando-a com maior ou menor vulnerabilidade à ação viral.

Essa pesquisa trouxe continuidade aos trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa que vem avançando na compreensão mais detalhada sobre a relação do BHV1 com gametas e embriões bovinos. Ovócitos oriundos de animais naturalmente infectados sem sintomatologia clínica e de alta titulação de anticorpos para o BHV1 apresentaram comprometimento da taxa de maturação *in vitro*, primeira etapa da produção *in vitro* de embriões (ALVES et al., 2019). Além disso, detectou-se partículas virais nas células do *cumulus*, zona pelúcida e dentro de COCs oriundos de animais naturalmente infectados, evidenciando que esse vírus pode estar implicado no comprometimento do desempenho reprodutivo desses animais (QUEIROZ-CASTRO et al., 2018).

Diante disso, o presente estudo investigou os efeitos do BHV1 na produção *in vitro* de embriões em modelos de infecção natural e artificial. Além disso, estudou-se qual seria o momento (etapa de maturação, fertilização e cultivo *in vitro*) em que embriões bovinos produzidos *in vitro* apresentam maior susceptibilidade a infecção pelo BHV1. Esse estudo trouxe contribuições relevantes e esclarecimentos quanto às particularidades da ação viral no embrião bovino durante as etapas da PIVE, bem como aqueles relacionados à capacidade e a eficiência da zona pelúcida em prevenir a infecção pelo BHV1.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Bovine alphaherpesvirus 1 (BHV1)*

O BHV1 pertence à Família *Herpesviridae*, Subfamília *Alphaherpesvirinae*, Gênero *Varicellovirus*. Os vírions tem entre 120 a 300 nm de diâmetro e são constituídos por um capsídeo icosaédrico, envelope glicoproteico e genoma DNA linear de fita dupla (FRANCO e ROEHE, 2007) e caracteriza-se pelo ciclo replicativo rápido (24-48 h), acompanhado de lise das células infectadas. O DNA de cadeia dupla codifica cerca de 70 proteínas, entre enzimas virais, proteínas estruturais, não-estruturais e reguladoras. No Brasil, no estado da Bahia, a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) foi registrada em 1962 e o BHV1 isolado pela primeira vez em 1978, a partir de pústulas vaginais de vacas (ALICE, 1978).

Estudos utilizando enzimas de restrição possibilitaram a divisão do BHV1 em dois subtipos, BHV1.1 (*IBR-like*) e BHV1.2, este último em 2a e 2b. A maioria das cepas de BHV1.1 estão relacionadas com problemas respiratórios, reprodutivos e casos de conjuntivite, e os subtipos BHV1.1 e BHV1.2a têm sido associados com abortos e infecções fetais. Já o subtipo 2b, menos virulento e incomum no Brasil, ainda não foi associado com abortos (MILLER et al., 1991; SMITH et al., 1995; MUYLKENS et al., 2007).

A transmissão do BHV1 pode ocorrer por inalação de aerossóis contaminados ou por contato direto com secreções nasais de animais infectados. Ambas as formas de transmissão são consideradas importantes na disseminação do vírus em rebanhos criados sob condições confinadas. A transmissão indireta ocorre, principalmente, pela ingestão de água e alimentos contaminados e pelo uso, nas coletas de sêmen, de vaginas artificiais contaminadas. Outra forma de transmissão é a venérea, pela monta natural e/ou inseminação artificial na qual o sêmen desempenha papel fundamental na cadeia epidemiológica. O sêmen pode se contaminar durante a ejaculação, quando o líquido seminal entra em contato com a mucosa

contaminada ou ainda pela Transferência de Embriões, em que o patógeno pode estar associado à zona pelúcida ou estar presente nos meios onde o embrião é transferido (VAN DONKERSGOED e BABIUK, 1991; PHILPOT, 1993; ENGELS e ACKERMANN, 1996; D'ANGELO, 1998).

A infecção caracteriza-se por diversas formas clínicas que comprometem os órgãos respiratório e reprodutivo. Nas fêmeas, o BHV1 pode determinar repetição de estros a intervalos regulares/irregulares, abortamentos, natimortalidade, mortalidade perinatal, redução na fertilidade e infertilidade temporária devido à infecção uterina. Os abortamentos causados por este agente viral são frequentemente observados do quarto ao oitavo mês de gestação e sugere-se que estes sejam causados a partir do carreamento do agente infeccioso por meio de leucócitos sanguíneos até as veias placentárias. A morte fetal ocorre dentro de 24 horas após a entrada do BHV1 na circulação. Mais especificamente, a forma genital manifesta-se clinicamente pelo aparecimento de pequenas vesículas de 1 a 2 mm de diâmetro que evoluem para pústulas e erosões na vulva e vagina. O epitélio vulvar apresenta-se edemaciado, hiperêmico e com secreção, que pode se tornar mucopurulenta devido à contaminação bacteriana secundária (GIVENS, 2006).

Além disso, o BHV1 pode também determinar lesões necrosantes nos ovários, principalmente se a infecção ocorrer no período da ovulação, afetando o corpo lúteo em formação, com conseqüente queda na concentração de progesterona, resultando em falha na prenhez. Em touros, lesões similares são observadas no prepúcio e no pênis caracterizando os quadros de balanopostite pustular infecciosa (GIBBS e RWEYEMANN, 1977; MILLER e VAN DER MAATEN, 1986; WYLER et al. 1989).

2.2 Epidemiologia do BHV1

A Rinotraqueíte infecciosa bovina foi descrita pela primeira vez na Alemanha, durante o século XIX, apontando o BHV1 como agente causador da vulvovaginite e balanopostite. Esse vírus possui distribuição cosmopolita, ou seja, encontra-se difundido em rebanhos bovinos por todo o mundo. Além disto, de acordo com a região e principalmente o manejo reprodutivo, apresenta incidência bastante distinta (ENGELS e ACKERMANN, 1996; GRAHAM, 2013).

Perdas gestacionais em torno de aproximadamente 37 a 50 % são associadas às doenças infecciosas, dentre elas a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (KHODAKARAM-TAFI e IKEDE, 2005), particularmente afetando a função ovariana e causando morte embrionária (MILLER e VAN DER MAATEN, 1986).

De acordo com Aono et al. (2013), propriedades brasileiras que realizam a vacinação contra doenças reprodutivas como IBR, Diarreia Viral Bovina (BVD) e Leptospirose, apresentam incidência significativamente reduzida de perdas gestacionais quando comparadas às outras que não a praticam ou apenas vacinam contra Leptospirose. Ademais, vacas vacinadas contra IBR e BVD tiveram maiores taxas de prenhez em programas de inseminação artificial em tempo fixo, o que ressalta a importância fulcral da imunização adequada.

Na maioria dos países europeus, a situação é endêmica e as taxas de infecção descritas são muito variáveis. Na Grã-Bretanha, o percentual de rebanhos soropositivos atinge 40 a 50 % e na Bélgica, 62 %. Na Estônia, grande parte dos rebanhos leiteiros é endemicamente infectada com o BHV1. Por outro lado, Dinamarca e Suíça, possuem baixa frequência de animais soropositivos em consequência da implantação, no passado, de um rígido programa de erradicação com a eliminação dos animais portadores, obtendo atualmente a condição de países livres do vírus (ACKERMANN et al., 1990; RAAPERI et al., 2010).

Na Ásia, mais especificamente na Índia, o governo tomou várias medidas para rastrear todas as amostras de sêmen de touros, a fim de detectar a presença de organismos causadores de doenças sexualmente transmissíveis, incluindo o BHV1, antes de permitir a sua utilização em programas de inseminação artificial. Amostras de soro de touros foram testadas para anticorpos contra o BHV1 e 38,6 % das amostras foram positivas (NANDI et al., 2009; NANDI et al., 2011).

Estudo conduzido por Ravishankar et al. (2013) com soro sanguíneo e sêmen de 65 reprodutores, no norte da Índia, utilizando ensaio imunoenzimático (ELISA) e PCR em tempo real (RT-PCR) detectou que no ELISA, 63 amostras sanguíneas (96,92 %) foram positivas. Já as amostras de sêmen testadas por meio do RT-PCR, apresentou o DNA do BHV1 em apenas 40 (61,54 %), indicando que nem todos os touros soropositivos estavam eliminando o vírus no sêmen.

Na América do Norte, a infecção apresenta caráter endêmico, sendo que os sinais clínicos são controlados por meio de programas de vacinação. No Canadá, foram descritas taxas de 37,8 e 59,5 % de animais e de rebanhos, respectivamente, infectados pelo BHV1, sendo que programas imunoproliféricos são de uso rotineiro neste país. No Oriente Médio, na região central do Irã (província Esfahan), a soroprevalência atingiu 72 %, uma das áreas de produção leiteira mais importante do país. Já no Reino Unido, rebanhos de corte e leite irlandeses atingiram 74,9 % de soropositividade, não diferenciando entre os rebanhos e apenas 1,8 % foram vacinados (DURHAM e HASSARD, 1990; COWLEY et al., 2011; SHIRVANI et al., 2012).

Na América do Sul, a soroprevalência foi de 82,1 % no Equador. Destaca-se que no Brasil inexistente programa de controle e erradicação do BHV1, e nem há disponibilidade comercial de vacinas marcadas, estratégias essas que conduziram países como a Áustria,

Dinamarca, Finlândia, Suíça, Suécia e Noruega para a condição de livres do BHV1 (CARBONERO et al., 2011; DIAS et al., 2013; CAN et al., 2016).

Dados de diversos pesquisadores mostram a elevada soroprevalência do BHV1 em rebanhos bovinos brasileiros, revelando a expressiva disseminação do vírus em rebanhos nacionais. Mueller et al. (1981) verificaram 42,2 % de animais reagentes no Estado de São Paulo. No Rio Grande do Sul foram descritas taxas de soropositividade de 81,7 % (RAVAZZOLO et al., 1989) e 71,3 % (VIDOR et al., 1995).

Lovato et al. (1995) utilizando 7.956 amostras de bovinos leiteiros provenientes de 99 municípios do Rio Grande do Sul, verificaram que 91,9 % eram soropositivos. Ainda neste estado, Piovesan et al. (2013), encontraram 52,9 % de soropositividade no total de 6.092 amostras examinadas.

Rocha et al. (2001), verificaram 58,2 % de soropositivos em pesquisa realizada no período de 1990 a 1999 (5.511 amostras), provenientes de propriedades de 335 municípios de Minas Gerais. Os autores verificaram que 93,4 % dos municípios apresentaram pelo menos um bovino com sorologia positiva.

Em Goiás, estudo com 6.932 animais não vacinados, provenientes de 892 propriedades (232 municípios), foi encontrado 51,9 % de soroprevalência, sendo que 98,5 % das propriedades apresentaram pelo menos, um animal soropositivo. Ainda neste estado, foram testadas 343 amostras, sendo 103 de sêmen, 123 de secreção vaginal e 117 de secreção nasal. Em 18,4 % das amostras foi detectado o BHV1, dessas, 19,4 % no sêmen, 23,6 % na secreção vaginal e 12 % na secreção nasal (BARBOSA et al., 2005; SILVA, 2013).

No Paraná, Dias et al. (2013) verificaram 59,0 % de soropositividade, avaliando amostras de 14.803 fêmeas oriundas de 2.018 rebanhos não vacinados. Verificaram ainda que 71,3 % dos rebanhos mostraram-se positivos para BHV1. Esses autores ressaltaram que no Brasil não há um programa de controle oficial de IBR e de acordo com a frequência de

infecção pelo BHV1 no Paraná, há grande perda econômica para o agronegócio brasileiro, evidenciando a necessidade urgente de adoção de programas de prevenção e controle para este agente viral. Esses autores ainda ressaltaram que no Brasil não há um programa de controle oficial de IBR e de acordo com a frequência de infecção pelo BHV1 no Paraná, há grande perda econômica para o agronegócio brasileiro evidenciando a necessidade urgente de adoção de programas de prevenção e controle para este agente viral.

Pituco (1988) e Rocha et al. (1994) realizaram inquéritos sorológicos em touros de centrais de inseminação de vários estados brasileiros, constatando prevalência de 72,5 e 63,15 % respectivamente, de animais soropositivos.

Portanto, em rebanhos com problemas de fertilidade, o BHV1 deve ser considerado como um dos fatores de risco, sendo seu controle e erradicação fundamentais na busca por melhorias no desempenho reprodutivo do rebanho (RAAPERI et al. 2012).

2.3. Produção *in vitro* de embriões

As biotecnologias reprodutivas tem apresentado comportamento cada vez mais crescente no cenário da pecuária mundial pois estão diretamente relacionadas com a eficiência dos sistemas de produção de corte e leite. Dentre elas, a tecnologia de embriões vem apresentando grande crescimento na série histórica das últimas duas décadas, com expressivo número recorde superior a 1,5 milhões de embriões bovinos produzidos no ano de 2020 (IETS, 2021).

No Brasil, semelhante fenômeno pode ser observado. O país é detentor do maior rebanho de bovinos do mundo, com cerca de 224,6 milhões de cabeças, configurando-se como maior exportador mundial de carne bovina e assume igual protagonismo quanto ao uso de biotecnologias reprodutivas relacionados ao embrião, seja produzido *in vivo* ou *in vitro*.

(EMBRAPA, 2021; IBGE 2021). Nos últimos anos, a produção de embriões *in vitro* ultrapassou aqueles de tecnologia *in vivo* e tal cenário vem se mantendo como tendência.

O Brasil é responsável atualmente por expressiva parcela de transferência de embriões produzidos *in vitro* no mundo, nos últimos dados divulgados pela Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões, referente a atividades do ano de 2020, 366.253 embriões bovinos foram produzidos no país, sendo a segunda maior produção mundial, tendo evidenciado expressivo aumento no último ano de 22,1 %, o dobro daquele reportado pelos Estados Unidos, país líder na produção de embriões. São os dois únicos países do mundo a ter números na casa dos 6 dígitos, sendo a tecnologia de produção *in vitro* a mais predominante. Juntos, Brasil e Estados Unidos respondem por cerca de 77,2 % de todos os embriões produzidos *in vitro* no mundo em 2020, sendo a maior parte deles relacionadas ao gado de leite (IETS, 2021).

Esse evidente crescimento é decorrente de vários fatores, por exemplo, as melhorias nos sistemas de cultivo e o uso bem sucedido do sêmen sexado. (SARTORI et al., 2016; WATANABE et al., 2017) Contudo, a trajetória da PIVE em bovinos no país já passou por diferentes momentos e foram distinguidos por Gonçalves & Viana et al. (2018) em três momentos que serão tomados como referência: 1997, 2007 e 2017.

Em 1997 a PIVE já era considerada uma biotécnica emergente em outras regiões do mundo como Europa, Ásia e Oceania. Os primeiros registro de nascimentos de bovinos nascidos pela técnica de PIVE no Brasil ocorreram do início dos anos 90 e foram realizado por grupos de pesquisas associados a instituições federais, no entanto, os laboratórios comerciais surgiram somente em 1998. Portanto, até o ano de 1997 a PIVE no país era uma biotecnologia restrita a fins acadêmico-científicos, sendo considerada de alto custo com, ainda, resultados pouco satisfatórios.

Após essa fase, a biotecnologia de embriões ganhou força no mundo em 10 anos, tendo registrado crescimento de 197,8 % até 2007 e causou profundas mudanças no mercado da tecnologia de embriões, tendo as Américas como novo centro (55,5 % de todos os embriões produzidos no mundo) orquestrado pelos Estados Unidos na produção *in vivo* e o Brasil na PIVE. Portanto, em 2007 o Brasil já era detentor dos mais expressivos números de PIVE bovinos no contexto mundial, correspondendo a 211.433 de 434.581 embriões produzidos, quase 50 % de toda produção. Nesse momento, a maior parte dos embriões produzidos pelo país, eram oriundos de animais zebuínos, especialmente da raça Nelore (73,5 %) que devido a maior eficiência de recuperação de ovócitos e produção de embriões, contribuiu para redução dos custos por gestação e viabilizou a melhor difusão da técnica nesse momento onde a eficiência da técnica era considerada baixa (WATANABE et al., 2017; GONÇALVES & VIANA, 2018).

A PIVE continuou evoluindo no Brasil e no mundo apresentando crescimento exponencial, tendo sido consolidada como a técnica de eleição para produção de bovinos tanto em rebanhos de corte quanto em rebanhos de leite. No Brasil, o uso do sêmen sexado com bons resultados e predomínio de nascimentos de bezerras além de melhoras progressivas da técnica em si, alavancaram o seu uso também na bovinocultura de leite. Em 2014, pela primeira vez a quantidade de embriões bovinos oriundos de rebanhos leiteiros superou a quantidade de rebanhos de corte, fenômeno que tem se mantido característico atualmente. Em 2017, a tecnologia de embriões registrou um marco histórico no uso da biotecnologia de embriões, a quantidade de PIVE bovinos ultrapassou aqueles produzidos *in vivo* (992.289 e 406.287, respectivamente) acompanhando uma tendência que já se mostrava acontecer desde o início dos anos 2010. Nesse mesmo ano, o Brasil perdeu a hegemonia na PIVE bovinos para os Estados Unidos, ainda que em número de transferências, ainda liderava e seguia como

referência produzindo 34,8 % de todos os embriões produzidos *in vitro* do mundo (GONÇALVES & VIANA, 2018).

Atualmente, o uso da PIVE vai ao encontro das exigências do mercado e do setor de produção animal, cada vez mais focado nos ganhos com o melhoramento animal e o refinamento de técnicas para melhor eficiência reprodutiva e produtiva da bovinocultura nacional. Ou seja, essa biotécnica dá pleno suporte aos anseios atuais da indústria da bovinocultura, diminuindo o intervalo entre gerações e potencializando a difusão de animais de alto mérito genético e produtivo.

Portanto, a tecnologia de embriões bovinos é uma inovação que tem contribuído muito no avanço produtivo e genético da pecuária nacional, uma vez que consiste em uma das formas mais rápidas, dentro de programas de melhoramento, de se alcançar expressivos resultados em rebanhos bovinos de corte e leite. Vale ressaltar que, como toda biotecnologia, as particularidades da técnica de produção *in vitro* de embriões devem estar associadas àquelas dos próprios sistemas de produção animal para seu adequado uso e interpretação.

Os desafios da Produção *in vitro* de embriões bovinos ainda são vários e englobam desde melhorias nos sistemas de cultivo *in vitro*, criopreservação, taxas de gestação, até mesmo relacionados a sua difusão. No entanto, a evolução dessa biotecnologia no cenário da pecuária nacional e mundial é factível, acompanhando o dinamismo e demandas do mercado, o que também contribuirá para suas melhorias e adequações.

3. REFERÊNCIAS

ACKERMANN, M. et al. Round table on infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis virus infection diagnosis and control. **Veterinary Microbiology**, v.23, p.361-363, 1990.

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

ALVES, S.V.P.; COSTA, E.P.; QUEIROZ-CASTRO, V.L.D.; MACHADO-NEVES, M.; GUIMARÃES, J.D.; GOMES, L.L.; AZEVEDO JUNIOR, M.A.; SILVA-JUNIOR, A.

Bovine herpesvirus 1 can impact the bovine oocyte development during in vitro maturation. **Research in Veterinary Science**, v.123, p.135-140, 2019.

AONO, F.H.; COOKE, R.F.; ALFIERI, A.A.; VASCONCELOS, J.L.M. Effects of vaccination against reproductive diseases on reproductive performance of beef cows submitted to fixed-timed AI in Brazilian cow-calf operations. **Theriogenology**, v.79, p. 242–248, 2013.

BARBOSA, A.C.V.C.; BRITO, W.M.E.D.; ALFAIA B.T. Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) no Estado de Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, v.35, n.6, p.1368-1373, 2005.

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

CAN, M. F.; ATASEVEN, V. S.; YALÇIN, C. Estimation of production and reproductive performance losses in dairy cattle due to bovine herpesvirus 1 (BoHV1) infection. **Veterinary archives**, 86, 499-513, 2016.

CARBONERO, A.; SAA, L.R.; JARA, D.V.; GARCÍA-BOCANEGRA, I. ARENAS, A.; BORGES, C.; PEREA, A. Seroprevalence and risk factors associated to Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) infection in non-vaccinated dairy and dual purpose cattle herds in Ecuador. **Preventive Veterinary Medicine**, v.100, p.84–88, 2011.

COWLEY, D.J.B.; CLEGG, T.A; DOHERTY, M.L.; MORE, S.J. Aspects of bovine herpesvirus-1 infection in dairy and beef herds in the Republic of Ireland. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.53, p. 40, 2011.

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

DIAS, J.A.; ALFIERI, A.A.; FERREIRA-NETO, J.S.; GONCALVES, V.S.P.; MULLER, E.E. Seroprevalence and Risk Factors of Bovine Herpesvirus 1 Infection in Cattle Herds in the State of Paraná, Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.60, p.39-47, 2013.

DURHAM, P. J. K.; HASSARD, L. E. Prevalence of antibody to infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza 3, bovine respiratory syncytial, and bovine viral diarrhoea viruses in cattle in Saskatchewan and Alberta. **Canadian Veterinary Journal**, v.31, p.815- 820, 1990.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. (2021) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasil é o quarto maior produtor de grãos e o maior exportador de carne bovina do mundo, diz estudo. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/62619259/brasil-e-o-quarto-maior-produtor-de-graos-e-o-maior-exportador-de-carne-bovina-do-mundo-diz-estudo>

ENGELS, M., ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminants pestivirus infections. **Veterinary Microbiology**, v.53, p.3-15, 1996.

FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. **Herpesviridae** In: FLORES, E.F. Virologia Veterinária, Ed. UFSM, cap.17, p.433-88. 2007.

- GIBBS, E. P. J.; RWEYEMANN, M. M. Bovine herpesviruses. Part I. Bovine herpesvirus 1. **Veterinary Bulletin**, v.47, n.5, 1977.
- GIVENS, M.D. A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle. **Theriogenology**, v.66, p. 648-654, 2006.
- GONÇALVES R.L.R, VIANA J.H.M. (2018) Situação atual da produção de embriões bovinos no Brasil e no mundo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.43, n.2, p.156-159.
- GRAHAM, D.A. Bovine herpes virus-1 (BHV1) in cattle—a review with emphasis on reproductive impacts and the emergence of infection in Ireland and the United Kingdom. **Irish Veterinary Journal**, v.66, p.1-15, 2013.
- GUERIN, B.; LE GUIENNE, B.; ALLIETTA, M.; HARLAY, T.; THIBIER, M. Effets de la contamination par le BHV-1 sur la maturation et fécondation in vitro des ovocytes des bovines. **Recueil de Medecine Veterinaire**, v.66, p.911-917, 1990.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE)**. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal. Censo Agropecuário 2021. Acessado em 02 de janeiro de 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/bovinos/br>
- INTERNATIONAL EMBRYO TECHNOLOGY SOCIETY (IETS)** – 2020 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. World embryo industry grows despite the Pandemic. Embryo Technology Newsletter, v. 39, n.4, 2021
- KHODAKARAM-TAFI, A.; IKEDE, B.O. A retrospective study of sporadic bovine abortions, stillbirths, and neonatal abnormalities in Atlantic Canada, from 1990 to 2001. **The Canadian Veterinary Journal**, v.46, p.635–637, 2005.
- LOVATO, L.T.; WEIBLEN, R.; TOBIAS, L.F.; MORAES, M.P. Herpesvírus bovino tipo 1 (HVB 1): Inquérito soro epidemiológico no rebanho leiteiro no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, **Ciência Rural**, v.25, n.3, p. 425-430, 1995.
- MAKAREVICH, A.V. PIVEKO, J.; KUBOVICOVA, E.; CHRENEK, M.; SLEZAKOVA, M.; LOUDA, F. Development and viability of bovine preimplantation embryos after the in vitro infection with bovine herpesvirus-1 (BHV-1): immunocytochemical and ultrastructural studies. **Zygote**, v.15, p.307-315, 2007.
- MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1, decorrente de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. **Ciência Rural**, v.30, n.2, p.347-350, 2000.
- MILLER, J.M.; VAN DER MAATEN, M.J.; WHETSTONE, C.A. Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA. **American Journal of Veterinary Research**, v.52, p.458-461, 1991.
- MUELLER, S. B. K. et al. Prevalência de anticorpos contra o vírus da Rinotraqueíte Infeciosa Bovina / Vulvovaginite Pustular Infeciosa (IBR/IPV) em bovinos do Estado de São Paulo. **Instituto Biológico de São Paulo**, v.47, n.2, p.55- 59, 1981.

MUYLKENS, B.; THIRY, J.; KIRTEN, P.; SCHYNTS, F.; THIRY, E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Research**, v. 38, p.181–209, 2007.

NANDI, S.; KUMAR, M.; MANOHAR, M.; CHAUHAN, R.S. Bovine herpes virus infections in cattle. **Animal Health Research Reviews**, v.10, n.1, p. 85-98, 2009.

NANDI, S.; KUMAR, M.; YADAV, V.; CHANDER, V. Serological Evidences of Bovine Herpesvirus-1 Infection in Bovines of Organized Farms in India. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.58, p.105-109, 2011.

PHILPOT, M. The dangers of disease transmission by artificial insemination by Embryo Transfer. **British Veterinary Journal**, v.149, p.339-369, 1993.

PIOVESAN, M.; FERNANDES, M.H.V.; CORRÊA, R.A.; PRADO, M.H.J.; CAMARGO, A.D.; RODRIGUES, P.R.C. Anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1, vírus da diarreia viral bovina e vírus da leucose enzoótica bovina na região da campanha do estado do Rio Grande do Sul. **Science and Animal Health**, v.1, p.38-49, 2013.

PITUCO, E. M. Ocorrência da Rinotraqueíte Infeciosa dos Bovinos / Vulvovaginite Pustular Infeciosa (IBR/IPV) em rebanhos criados no estado de São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná, Minas Gerais. **Tese** (doutorado em patologia bovina) Faculdade de medicina veterinária e zootecnia, São Paulo, 1988.

QUEIROZ-CASTRO, V.L.D.; COSTA, E.P.; ALVES, S.V.P.; SILVA-JUNIOR, A.; MACHADO-NEVES, M.; GUIMARÃES, J.D. Detection of bovine herpesvirus 1 in cumulus-oocyte complexes of cows. **Research in Veterinary Science**. v.120, p.54-56, 2018.

RAAPERI, K., BOUGEARD, B.; ALEKSEJEV, A.; ORRO, T.; VILTROP, A. Association of herd BRSV and BHV-1 seroprevalence with respiratory disease and reproductive performance in adult dairy cattle. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.54, p.4, 2012.

RAVAZZOLO, A. P.; PIZZOL, M. D.; MOOJEN, V. Evidência da presença de anticorpos para o vírus da Rinotraqueíte Infeciosa dos Bovinos, em alguns municípios do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivo Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.17, p.89-95, 1989.

RAVISHANKAR, C.; NANDI, S.; CHANDER, V.; MOHAPATRA, T.K. Concurrent testing of breeding bulls for bovine herpesvirus 1 infection (BHV-1) in India. **Veterinaria Italiana**, v.49, p.145-150, 2013.

ROCHA, M. A.; GOUVEIA, A. M. G.; LOBATO, Z. I. P. et al. Pesquisa de anticorpos para IBR em amostragem de demanda no Estado de Minas Gerais, 1990-1999. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.53, n.6, 2001.

SARTORI R., PRATA A.B., FIGUEIREDO A.C.S., SANCHES B.V., PONTES G.C.S., VIANA J.H.M., PONTES J.H., VASCONCELOS J.L.M., PEREIRA M.H.C., DODE MAN, MONTEIRO JR PLJ, BARUSELLI PL. (2016) Update and overview on assisted reproductive technologies (ARTs) in Brazil. **Animal Reproduction**, v.13, n.3, p.300-312. DOI: 10.21451/1984-3143-AR873

SHIRVANI, E.; LOTFI, M.; KAMALZADEH, M.; NOAMAN, V.; BAHRIARI, M.; MOROVATI, H.; HATAMI, A. Seroepidemiological study of bovine respiratory viruses

(BRSV, BHV1, PI-3V, BVDV, and BAV-3) in dairy cattle in central region of Iran (Esfahan province). **Tropical Animal Health and Production**, v.44, p.191–195, 2012.

SILVA, A.M. Detecção, isolamento e caracterização molecular de Herpesvírus bovino tipos 1 e 5 de bovinos do estado de Goiás, Brasil. 2013, 103f. **Tese (Doutorado em Ciência Animal)** – Universidade de Goiás, Goiás, 2013.

SMITH, G.A.; YOUNG, P.L.; REED, K.C. Emergence of a new bovine herpesvirus 1 strain in Australian feedlots. **Archives of Virology**, v. 140, p. 599-603, 1995.

TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Herpesvírus bovino tipo 1: tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. **Semina: Ciências Agrárias**, v.22, p.203- 209, 2001.

THIBIER, M.; WRATHALL, T. **International Trade of Livestock Germplasm**. New York: Taylor & Francis. (Encyclopedia of Biotechnology in Agriculture and Food) 4p, 2012.

VAN DONKERSGOED, J.; BABIUK, L. A. Diagnosing and managing the respiratory form of infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Medicine**, v.86, n.1, p.86-94, 1991.

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

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

VIDOR, T. HALFEN, D. C., LEITE, T. E. Herpesvírus Bovino tipo 1(HVB-1). Sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos. **Ciência. Rural**, v.25, n.3, p.421-424, 1995.

WATANABE Y.F., SOUZA A.H., MINGOTI R.D., FERREIRA R.M., BATISTA E.O.S., DAYAN A., WATANABE O., MEIRELLES F.V., NOGUEIRA M.F.G., FERRAZ J.B.S., BARUSELLI P.S. (2017) Number of oocytes retrieved per donor during OPU and its relationship with in vitro embryo production and field fertility following embryo transfer. **Animal Reproduction**, 14(3):635-644. DOI:10.21451/1984-3143-AR1008

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

WYLER, R.; ENGELS, M.; SCHWYZR, M. Infectious bovine rhinotracheitis/ vulvovaginitis (BHV-1). In: WITTMANN, G. Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs. Boston: **Kluwer Academic Publishers**, p.1-72, 1989.

4. HIPÓTESES

A hipótese global desse trabalho é de que a capacidade de desenvolvimento de ovócitos e embriões é afetada pelo bovine alphaherpesvírus 1. Para cada um dos experimentos realizados e divididos nos capítulos apresentados, foram construídas as seguintes hipóteses:

Capítulo I – A capacidade de desenvolvimento de ovócitos e embriões é afetada pelo status sorológico de anticorpos anti BHV1 das doadoras.

Capítulo II – A capacidade de desenvolvimento de ovócitos e embriões é afetada pela ação viral nas diferentes etapas da produção *in vitro* de embriões bovinos: maturação, fecundação e cultivo.

5. OBJETIVOS

Esse trabalho de pesquisa teve como objetivo geral avaliar os efeitos do BHV1 na capacidade de desenvolvimento *in vitro* de complexos *cumulus*-ovócitos e embriões bovinos.

Ovócitos foram alvos desse estudo após infecção artificial *in vitro* em 3 momentos diferentes da produção *in vitro* de embriões (PIVE): maturação, fecundação e cultivo embrionário *in vitro* (MIV, FIV e CIV, respectivamente).

O presente trabalho objetivou ainda analisar a expressão gênica de transcritos relacionados a apoptose, estresse oxidativo, remodelamento gênico e desenvolvimento embrionário, bem como detectar e localizar o BHV1 em embriões bovinos infectados naturalmente e *in vitro* por meio da microscopia confocal de varredura a laser.

**6. CAPÍTULO I – INFECÇÃO NATURAL DE GAMETAS E EMBRIÕES PELO
BHV1.**

6.1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui atualmente o maior rebanho comercial de bovinos do mundo, com rebanho efetivo de 224,6 milhões de animais, com maiores concentrações no Centro-Oeste do país (IBGE, 2021), além disso é considerado um dos países que mais produz embriões bovinos *in vitro* no mundo (IETS, 2021). Nesse cenário, é real a crescente utilização de biotécnicas reprodutivas, dentre elas, a produção *in vitro* de embriões (PIVE).

Essas técnicas oferecem potenciais riscos na transmissão de agentes patogênicos (THIBIER e WRATHALL, 2012). Nesse cenário, o BHV1 representa grande relevância por ser de difícil controle e fácil dispersão, além de gerar inúmeros prejuízos econômicos que vão desde a redução na produção de leite e repetição de cio, até abortamentos e gastos relacionados ao controle da infecção (STATHAM, 2015; SAYERS, 2017). Estima-se um gasto financeiro médio de U\$379 por vaca em decorrência dos inúmeros possíveis prejuízos causados pela infecção pelo BHV1 (CAN et al., 2016).

Esse estudo deu continuidade aos trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa que vem avançando na compreensão mais detalhada sobre a relação do BHV1 com gametas e embriões bovinos. Animais naturalmente infectados sem sintomatologia clínica e de alta titulação para o BHV1 apresentaram comprometimento na taxa de maturação *in vitro*, primeira etapa da PIVE. Além disso, detectou-se partículas virais nas células do *cumulus*, zona pelúcida e dentro de COCs oriundos de animais naturalmente infectados, evidenciando que esse vírus pode estar implicado no comprometimento do desempenho reprodutivo desses animais (QUEIROZ-CASTRO et al., 2018; QUEIROZ-CASTRO et al., 2019; ALVES et al., 2019).

Ressalta-se a inexistência de trabalhos na literatura consultada estudando a relação do BHV1 com a PIVE em animais soropositivos naturalmente infectados, seus efeitos e

implicações quanto a expressão gênica, alvo de nossa pesquisa durante a condução dos experimentos.

Os resultados encontrados foram de grande relevância no estudo do BHV1 face sua estreita relação com as células germinativas e embriões no contexto reprodutivo, permitindo e contribuindo para um estudo mais detalhado da ação viral sobre os embriões bovinos provindos de animais naturalmente infectados tendo em vista os grandes prejuízos que causa na eficiência reprodutiva de bovinos.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento experimental envolveu a manipulação de gametas e embriões bovinos simulando o cenário de produção *in vitro* de embriões. Foram realizados testes de soroneutralização, qPCR, avaliação da taxa de viabilidade, clivagem e de desenvolvimento embrionário. Ao final do processo de PIVE, os embriões foram analisados quanto a expressão gênica e avaliados quanto a presença e localização viral obtidos pela microscopia confocal de varredura a laser.

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, com autorização do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa, sob protocolo número 38/2020 (Apêndice I).

6.2.1 Sinopse dos procedimentos experimentais

Ovários e amostras de sangue de fêmeas bovinas foram obtidos em frigorífico #SIF 2556, distante 80 quilômetros do Laboratório de Produção *in vitro* e Criopreservação de Embriões. Os ovários foram então devidamente identificadas e acondicionados à 37°C, até serem processados. O soro obtido da amostra de sangue foi utilizado para a realização do teste

de soroneutralização viral, cujo procedimento encontra-se melhor detalhado em item específico. Esse teste foi utilizado para realizar a triagem das doadoras em soronegativas e soropositivas, bem como para quantificação de anticorpos neutralizantes anti-BHV1 naqueles animais soropositivos. Já os ovários, foram aspirados individualmente para recuperação dos ovócitos que posteriormente foram maturados em estufa de CO₂ a 5 % e 38,5 °C, fertilizados e acompanhados durante o seu desenvolvimento embrionário. Após o resultado da sorologia, os dados de complexos *cumulus*-ovócito oriundos de animais soropositivos foram comparados como controle, com os resultados obtidos em de animais soronegativos.

Além do estudo da capacidade de fecundação e do desenvolvimento embrionário, os embriões que foram obtidos ao final de cada rotina de produção *in vitro* de embriões, foram analisados quanto a expressão gênica de transcritos relacionados ao processo de proliferação e apoptose celular, desenvolvimento e remodelamento gênico embrionário e estresse oxidativo. Ademais, parte dos embriões gerados também foram avaliados por meio do teste de imunofluorescência utilizando a microscopia confocal de varredura a laser na busca pela identificação e localização do BHV1.

6.2.2 Coleta das amostras

As amostras experimentais foram coletadas no Frigorífico Sabor de Minas #SIF 2556, localizado no município de Muriaé, distante 80 quilômetros da Universidade Federal de Viçosa.

Foram utilizadas amostras de sangue e ovários de fêmeas bovinas mestiças destinadas ao abate, provenientes de rebanhos sabidamente não vacinados contra o BHV1, a fim de evitar a interferência da vacinação nos resultados do teste sorológico.

Logo após a insensibilização, durante a etapa de sangria foram coletadas amostras de sangue de cada animal, sem anticoagulante, utilizando-se de tubos de ensaio de 5 mL, os quais foram identificados e acondicionados sob refrigeração.

Já na etapa de evisceração, foram coletados os ovários dos respectivos animais, sendo identificados e acondicionados individualmente em solução de cloreto de sódio 0,9 %, acrescida de gentamicina. Esta solução foi mantida à temperatura de 37 °C, por meio de caixa térmica, durante o transporte até o laboratório.

6.2.3 Processamento das amostras

No Laboratório de Produção *in vitro* e Criopreservação de Embriões, as amostras de sangue sem anticoagulante foram preparadas para a realização da soroneutralização.

Para isso, as amostras foram colocadas em banho-maria à 37 °C por 15 minutos e, em seguida, centrifugadas a 860 G por cinco minutos para facilitar a separação do soro que, logo após, foi transferido para microtubos de 1,5 mL previamente identificados. Então, as amostras de soro foram inativadas à 56 °C por 30 minutos antes de serem remetidas ao Laboratório de Virologia Animal – DVT, para realização da sorologia em microplacas.

6.2.4 Soroneutralização viral

O teste para o diagnóstico sorológico foi realizado empregando-se da prova de soroneutralização em microplacas, de acordo com a metodologia proposta por House e Baker (1971).

Foram utilizadas microplacas de 96 cavidades (CORNING COSTAR®), nas quais, a primeira coluna foram constituídas do controle de células, não recebendo soro nem suspensão viral, sendo substituído por 100 µL de Minimum Essential Medium (MEM) livre de Soro Fetal Bovino (SFB). Por sua vez, a segunda coluna foi constituída do controle de toxicidade

do soro. Essa coluna recebeu a suspensão celular e soro não diluído. A diluição do soro deu-se entre as colunas 3 e 12 da microplaca e foram utilizadas diluições na base 2 crescentes do soro, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 e 1:128.

Dessa forma, cada diluição do soro ocupou uma coluna da microplaca (8 cavidades) em ordem decrescente de concentração. Posteriormente às diluições, cada cavidade receberam uma dose constante de vírus, contendo 100 TCID₅₀/50 µL do isolado BHV1 LA, com exceção das colunas 1 e 2. Após incubação da mistura soro-vírus por 12 h a 37 °C, em estufa de CO₂ uma suspensão de células Madin-Darby Bovine Kidney de 50 µL na concentração de 300.000 células/mL foi adicionada, seguida de incubação em estufa de CO₂ a 37 °C.

A leitura dos testes foi realizada após 96 horas de incubação, por meio do monitoramento do efeito citopático. Foram considerados os títulos de anticorpos neutralizantes as maiores diluições do soro capazes de inibir a replicação viral e conseqüente produção de efeito citopático, sendo classificados em grupos: soronegativos (titulação ≤ 2) e soropositivos (>2). Cada soro foi testado em duplicata e a medida de anticorpos neutralizantes foi calculada pela média aritmética das repetições. Amostras sabidamente positivas e negativas foram utilizadas como controle da técnica.

6.2.5 Real time qPCR

Foram selecionados para esse estudo 20 genes, seis relacionados a processos biológicos de apoptose celular: BCL-2 Apoptosis Regulator (BCL2), Apoptotic Peptidase Activating Factor 1 (APAF1), BCL-2 Associated X (BAX), MCL-1 Apoptosis Regulator (MCL1), Caspase 2 (CASP2) e Caspase 3 (CASP3), dois relacionados ao estresse oxidativo: Superoxide Desmutase 2 (SOD2) e Glutathione Peroxidase 1 (GPX1), cinco relacionados ao remodelamento gênico: DNA metiltransferase 1 (DNMT1), DNA metiltransferase 3A (DNMT3A), DNA metiltransferase 3B (DNMT3B), Pou Class 5 Homeobox 1 (POU5F1) e

Nanog Homeobox (NANOG), quatro relacionados ao desenvolvimento embrionário: Gap Junction Protein Alpha 1 (GJA1), Gap Junction Protein Beta 3 (GJB3), Fibroblast Growth Factor 9 (FGF9) e Insulin Like Growth Factor 1 (IGF1), além do gene endógeno Glyceraldehyde 3 Phosphate Dehydrogenase (GAPDH).

Os embriões bovinos produzidos *in vitro* de cada um dos grupos experimentais em 2 μ L de solução salina tamponada foram rapidamente congelados em criotubos imersos em botijão de nitrogênio líquido. Para extração do RNA total e síntese do cDNA, as amostras foram descongeladas em grupos de 5 embriões viáveis cada réplica. Para isso, foi utilizado o kit comercial Cells-to-cDNA II Invitrogen Thermofisher (Ambion–Austin, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Após essa etapa, a quantificação da concentração de cDNA foi realizada no espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare). Após isso, as amostras foram diluídas para concentração de 10 ng/ μ L e mantidas a - 20 °C para análise da qPCR.

A quantificação relativa dos genes foi realizada in duplicata no termociclador ABI Prism 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) usando o GoTaq qPCR Master Mix (Promega Corporation, Madison, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. As condições de amplificação foram de 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos e extensão a 60 °C por 60 segundos.

A expressão relativa de cada gene foi calculada utilizando o método de Δ Ct (Ct gene alvo – Ct gene endógeno) para cada amostra, na qual Ct é expresso pelo número do ciclo da PCR na qual houve emissão de fluorescência cruza um limiar definido conforme os padrões do termociclador. As diferenças de expressão dos genes foram estimadas usando a expressão $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001; PFAFFL, 2001).

6.2.6 Aspiração folicular

Os folículos ovarianos antrais presentes nos ovários de cada animal foram puncionados com agulhas descartáveis de 40 x 1,2 mm 21 G acopladas em seringas de 3 mL. O líquido aspirado foi depositado em microtubos de 2 mL identificados para sedimentação dos complexos *cumulus*-ovócito. Após cinco minutos de sedimentação, o sobrenadante foi descartado, no intuito de separar os complexos.

Os complexos *cumulus*-ovócito (COCs) rastreados e recuperados foram transferidos para placas de cultivo de 60 mm contendo solução de PBS (Phosphate Buffered Saline) acrescido de 10 % de SFB a 37 °C e avaliados em microscópio estereoscópio com aumento final de 40 x. Posteriormente, foram então transferidos para outra placa de Petri contendo meio Talp-Hepes e então classificados morfológicamente, de acordo com Stringfellow e Givens (2010). A avaliação foi realizada e registrada individualmente para cada animal.

Após a classificação foram selecionados somente os ovócitos considerados viáveis e de classificação grau I e II de acordo com avaliação morfológica das camadas de células do *cumulus* e citoplasma. Foram considerados inviáveis, ovócitos de classificação grau III e IV, não sendo utilizados para as etapas de cultivo *in vitro*.

6.2.7 Maturação, fecundação e cultivo *in vitro*

Os COCs aspirados foram rastreados em PBS, lavados em meio Talp-hepes e meio de maturação e foram transferidos para microgotas em placa de cultivo de 35 mm de diâmetro. A fim de alcançar a maturação, os COCs foram cultivados por 24 horas à 38,5 °C sob atmosfera controlada a 5 % de CO₂ em ar atmosférico e umidade máxima em estufa incubadora. Todo o processo de produção *in vitro* de embriões foi realizado de maneira individual por doadora.

Após esse período, os ovócitos foram novamente lavados em meio Talp-hepes e fecundados com sêmen convencional. Para a fertilização *in vitro* (FIV), os ovócitos e

espermatozoides foram co-incubados por 18 horas, nas mesmas condições utilizadas para a MIV.

O sêmen utilizado no processo de fertilização foi obtido de uma única partida comercial de touro com resultado negativo para BHV1 na PCR das amostras de sêmen utilizadas. O sêmen foi centrifugado em gradiente de Percoll (45 e 90 %) a 6.000 rotações por minuto por 5 minutos. O pellet formado foi lavado em meio TALP a 3.000 rotações por minuto por 2 minutos. Após isso, o sedimento foi então diluído em meio de fecundação suplementado com 3 mg/mL de heparina e solução de PHE (2 mM de penicilamina, 1 mM de hipotaurina e 250 mM de epinefrina, Sigma-Aldrich®) a fim de obter uma concentração final de 10^6 espermatozoides/mL nas microgotas de fecundação.

Após período de coincubação dos gametas em meio de fecundação, os possíveis zigotos foram desnudados por meio de processo mecânico auxiliado por pipetagens sucessivas. Após isso, os possíveis zigotos foram lavados em meio de cultivo *in vitro* (CIV) e foram mantidos por sete dias pós fecundação em estufa incubadora à 38,5 °C sob atmosfera controlada de 5 % de CO₂ e 5 % de O₂ em ar atmosférico e umidade máxima. Os meios de MIV, FIV e CIV utilizados nesse estudo foram adquiridos da empresa comercial Vitrogen Biotecnologia (Cravinhos, São Paulo).

6.2.8 Capacidade de fecundação e desenvolvimento embrionário

Para a avaliação da capacidade de fecundação foi avaliada a taxa de clivagem como sendo o número de ovócitos fecundados que iniciaram as primeiras divisões mitóticas até às 72 horas pós-fecundação. Já o desenvolvimento embrionário, foi avaliado pelo número de embriões que atingiram o estágio de mórula (Mo), blastocisto inicial (Bi), blastocisto (Bl), blastocisto expandido (Bx) e blastocisto eclodido (Be) até às 168 h pós-fecundação *in vitro*. Os embriões obtidos foram ainda classificados, conforme recomendado pela Sociedade

Internacional de Tecnologia de Embriões em graus de I a IV (STRINGFELLOW e GIVENS, 2010). Após essas avaliações e registros, os embriões foram destinados para testes de imunofluorescência e expressão gênica.

6.2.9 Microscopia Confocal de Varredura a Laser

Os embriões bovinos processados para o teste de imunofluorescência foram fixados por uma hora em solução de Zamboni (paraformaldeído 4 % e ácido pícrico 0,4 % em tampão fosfato de sódio (PBS) a 0,1 M e pH 7,2). Em seguida, foram realizadas 15 lavagens sucessivas e intervaladas de 10 minutos com PBS, a fim de remover o excesso da solução fixadora. As amostras foram então transferidas para uma solução de PBS acrescida de Triton X-100 (SIGMA-ALDRICH®) a 1 % por um período de uma hora e meia para a permeabilização seguida de novas lavagens.

As amostras foram incubadas com o anticorpo primário monoclonal (VMRD®), isotipo IgG2b, específico para a glicoproteína gC do BHV1 (1:100) por período de 16 horas. Após a incubação nova seção de 15 lavagens foi executada e em seguida as amostras foram incubadas com o anticorpo secundário (SIGMA-ALDRICH®) anti-IgG conjugado com isotiocianato de fluoresceína – FITC (1:200) por 16 horas no escuro.

Nova seção de 15 lavagens foi executada e as amostras foram incubadas por 30 minutos com o corante de ácido nucléico – TO-PRO®3 iodeto (1:1000), etapa essa seguida de novas lavagens. Após isso, as amostras foram montadas em lâminas utilizando MOWIOL® e analisadas em Microscópio Confocal de Varredura a Laser Zeiss LSM 510 META, disponível no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa. Todas as amostras foram realizadas em duplicata, sendo uma amostra utilizada como controle da técnica com a omissão da incubação com o anticorpo primário.

6.2.10 Análises estatísticas

As variáveis qualitativas dicotômicas (presença ou ausência do BHV1) e as taxas de viabilidade ovocitária, clivagem e desenvolvimento embrionário, bem como os dados de expressão gênica, foram comparados em tabelas de contingência e analisadas pelo teste de qui-quadrado, a 5 % de probabilidade (SAMPAIO, 2002).

A expressão gênica relativa foi avaliada por meio do fold-change, calculado por meio da fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$. As análises estatísticas foram realizadas no software SAS (Statistical Analysis System) adotando-se significância de $\alpha = 0,05$.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste sorológico revelou uma soroprevalência de anticorpos anti BHV1 entre os animais amostrados de 69,81 % (37 de 53 fêmeas), valor esse considerado muito próximo daqueles observados em outros estudos (DURHAM e HASSARD, 1990; VIDOR et al., 1995; COWLEY et al., 2011; SHIRVANI et al., 2012). Dentre os 37 animais soropositivos, destaca-se uma grande quantidade de animais apresentando alta titulação de anticorpos, 91,89 % deles com título de anticorpos ≥ 32 TCID₅₀, conforme apresentado pela tabela 1. Elevados títulos de anticorpos para infecções virais, sugerem infecções recentes ou ainda em estado de viremia, tal fato pode elucidar alguns achados e contribuir para interpretação dos resultados a respeito dos animais soropositivos com alta titulação de anticorpos.

Tabela 1 – Classificação sorológica das fêmeas bovinas soropositivas do estudo experimental.

Classificação	Animais	
	N	%
Título de 8	2	5,41
Título de 16	1	2,70
Título de 32	8	21,62
Título de 64	7	18,92
Título de 128	19	51,35
Total	37	100

Os ovócitos, possíveis zigotos e embriões foram todos manipulados de maneira individual de acordo com a doadora, objetivando reunir os dados após o teste de sorologia que foi realizado ao término das rotinas laboratoriais de PIVE.

Nesse estudo, do total de 1.776 ovócitos oriundos de 53 animais, 1.091 foram considerados viáveis quanto a aspectos morfológicos na classificação de qualidade em graus de I a IV, sendo 468 de grau I (26,35 %), 623 grau II (35,08 %), 295 grau III (16,61 %) e 390 grau IV (21,96 %). Foram considerados viáveis os de classificação I e II compondo aqueles que seguiram o cultivo para o estudo em questão. Conforme mostrado na tabela 2 abaixo, a taxa de viabilidade dos ovócitos oriundos de fêmeas soropositivas e soronegativas foi de 61,92 % e 60,16 %, respectivamente, sendo considerados valores estatisticamente equivalentes.

Tabela 2 – Distribuição da classificação de ovócitos (grau I a IV) e taxa de viabilidade de acordo com o status sorológico de fêmeas para o BHV1

	G I	G II	G III	G IV	Total	Viáveis	
						(N)	(%)
Soropositivo (n=37)	340	452	213	274	1279	792	61,92 ^a
Soronegativo (n=16)	128	171	82	116	497	299	60,16 ^a
Total	468	623	295	390	1776	1091	61,43

Porcentagens sobrescritas com letras diferentes indicam diferença ($P < 0,05$) pelo teste do qui-quadrado.

Os dados referentes a clivagem e desenvolvimento embrionário encontram-se reunidos na tabela 3. Ao final do estudo experimental, foram produzidos um total de 184 embriões, sendo 154 (83,70 %) classificados como viáveis (grau I e II) conforme ilustrado na figura 1. Desses, 65 foram devidamente acondicionados e utilizados para avaliação da expressão gênica e 89 foram fixados e processados para realização do teste de imunofluorescência.

Tabela 3 – Taxa de clivagem, viabilidade e inviabilidade de embriões produzidos *in vitro* de acordo com o status sorológico de doadoras para o BHV1

	Avaliação 3dpf	Clivagem		Embriões 7dpf	Embriões viáveis %	Embriões inviáveis %
		N	%			
Soropositivo (n=37)	710	324	45,63 ^a	121	13,66 ^b	19,83 ^a
Soronegativo (n=16)	268	131	48,88 ^a	63	21,27 ^a	9,52 ^b
Total	978	455	46,52	184	15,75	16,30

Dpf = dias pós fecundação *in vitro*. Porcentagens sobrescritas com letras diferentes indicam diferença ($P < 0,05$) pelo teste do qui-quadrado.



Figura 1 – Embriões bovinos viáveis produzidos *in vitro* em diferentes estágios de desenvolvimento visualizados com auxílio de microscópio estereoscópio. Bl = Blastocisto, Bx = Blastocisto expandido e Bn = Blastocisto em eclosão.

Os dados de taxa de clivagem apesar de semelhantes entre os grupos, foram considerados baixos em relação ao esperado e usualmente obtido nas rotinas de padronização das técnicas do laboratório. Esse fato foi atribuído a fertilidade do sêmen do touro utilizado para a fecundação *in vitro*, sendo considerado um fator extremamente importante que afeta a PIVE (WATANABE et al., 2017).

Quanto às taxas de produção de embriões viáveis e inviáveis, nota-se redução ($P < 0,05$) na eficiência de ovócitos oriundos de vacas soropositivas em ter competência para desenvolver-se até blastocisto e maior porcentagem de embriões considerados inviáveis desse grupo quando comparado ao grupo de animais soronegativos.

O BHV1 tem sido associado à transmissão viral por embriões produzidos *in vitro* devido a sua possível presença no soro, tecidos reprodutivos, sêmen, meios de cultura (soro fetal bovino, albumina sérica bovina), assim como materiais e equipamentos de coleta e cultivo de embriões (WRATHALL et al., 2006; OLIVEIRA, 2007).

Na literatura consultada, algumas pesquisas já reportam efeitos negativos do BHV1 no sistema de PIVE, no entanto, o presente estudo é o primeiro que aborda esse achado em ovócitos oriundos de vacas soropositivas infectadas naturalmente. Corroborando os achados desse estudo, reduzida proporção de desenvolvimento de blastocistos viáveis foi descrita por Guérin et al. (1990), Bielanski e Dubuc (1994), Vanroose et al. (1999) e Makarevich (2007). Esse último observou também comprometimento no desenvolvimento embrionário pré-implantação após exposição ao BHV1.

Segundo Guérin et al. (1997) o risco sanitário de embriões PIVE pela exposição a patógenos é maior para embriões produzidos *in vitro* do que *in vivo*, uma vez que diferenças na zona pelúcida (ZP) nesses sistemas permitem mais facilmente a adsorção de patógenos.

Vanroose et al. (2000) simulando o tamanho do BHV1 com o uso de microesferas, afirmaram que partículas com tamanho aproximado de 180–200 nm podem atravessar parte

da ZP, chegando a camadas mais internas, no entanto não conseguiriam atravessá-la totalmente. Esse mesmo autor, ressaltou ainda que o vírus pode aderir a ZP e infectar o embrião na ocasião em que ocorreu a fecundação, momento esse considerado de instabilidade da ZP.

Na estrutura da ZP de zigotos fecundados, foi observado por Vanroose et al. (2000) a formação de escavações e fissuras com as dimensões da cabeça espermática, podendo proporcionar um ponto de entrada para o vírus no momento da fecundação. Outro momento no qual os embriões bovinos podem ser considerados susceptíveis a infecção pelo BHV1 é a partir da fase de blastocisto, quando já se inicia o processo de degeneração da zona pelúcida. Segundo Bowen (1985) e Bielanski et al. (1987), embriões sem a ZP permitiriam a replicação viral.

A reduzida taxa de embriões viáveis e elevada taxa de embriões inviáveis encontradas no grupo de doadoras soropositivas pode ser atribuída a possível replicação viral nas células embrionárias, acarretando lise celular conhecida como efeito citopático (TSUBOI e IMADA, 1997; VANROOSE et al., 1999). Desta forma, ocorre redução no número de células viáveis e aptas a suportar o desenvolvimento embrionário harmônico, esclarecendo o melhor desempenho de embriões oriundos do grupo de animais soronegativos.

A avaliação da expressão gênica foi realizada em um total de 65 blastocistos que foram obtidos ao final das rotinas de produção *in vitro* de embriões de classificação padronizada grau I ou grau II, considerados viáveis e aptos para transferência a fresco ou criopreservação. Os embriões foram analisados em réplicas formadas por 13 grupos de 5 embriões cada, tendo sido avaliados quanto a expressão de 20 genes relacionados a processos biológicos de apoptose e proliferação celular, remodelamento genômico, desenvolvimento embrionário e estresse oxidativo.

O perfil de expressão gênica dos genes alvo foi avaliado pela técnica quantitativa de PCR em tempo real e encontra-se representada pela Figura 2. Do total de 20 genes selecionados para avaliação, incluso o gene endógeno Glyceraldheyde 3 Phosphate Dehydrogenase (GAPDH), as amostras de embriões avaliadas não apresentaram expressão significativa dos seguintes genes: BCL-2, DNMT3A, GJA1, GJB3 e IGF1.

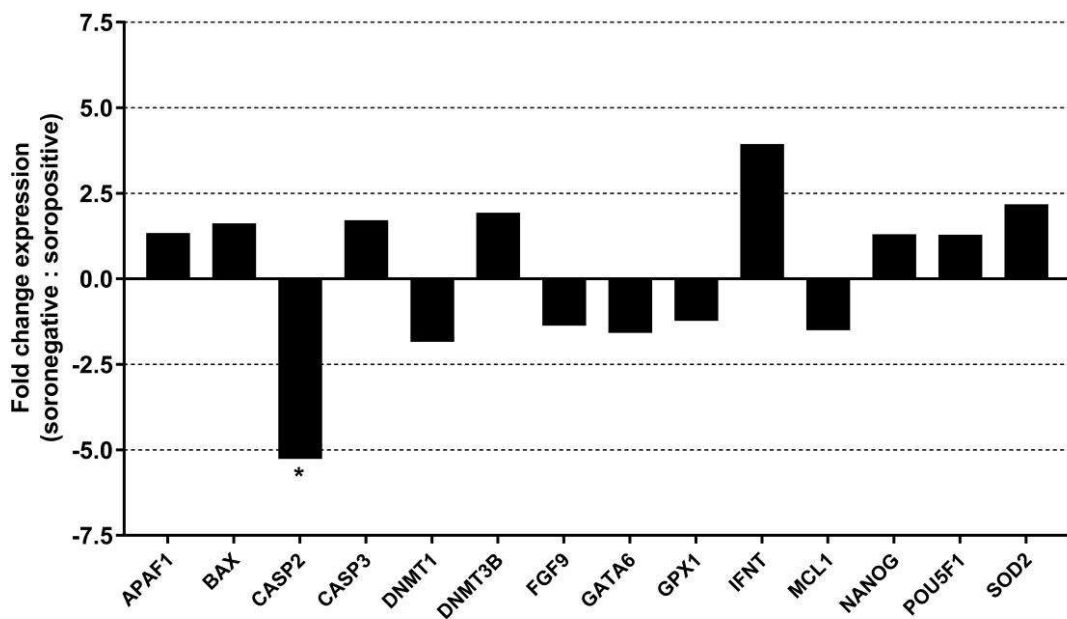


Figura 2 – Expressão gênica relativa em fold-change dos genes APAF1, BAX, CASP2, CASP3, DNMT1, DNMT3B, FGF9, GATA6, GPX1, IFNT, MCL1, NANOG, POU5F1 e SOD2 de embriões bovinos de acordo com a origem dos ovócitos: doadoras soropositivas e soronegativas para o BHV1. Valores positivos de fold-change significam maior expressão gênica daqueles oriundos de doadoras soronegativas em comparação com soropositivas, enquanto valores negativos representam maior expressão gênica em embriões oriundos de doadoras soropositivas. * $P < 0,05$.

A análise estatística dos dados foi executada conforme o status sorológico das fêmeas doadoras dos ovócitos que originaram os embriões produzidos *in vitro* e revelou diferença de expressão gênica ($P < 0,05$) somente do gene Caspase 2 (CASP2). Essa maior expressão do gene CASP2 no grupo de embriões de vacas soropositivas pode estar relacionada ao ciclo replicativo lítico realizado pelo BHV1, no qual para proliferação viral, ocorre destruição e morte das células hospedeiras, processo mediado por fatores reguladores da apoptose.

Esses achados corroboram com aqueles encontrados por Silva-Frade et al. (2010) para o BHV5, em que foi possível concluir que o vírus foi capaz de modular as rotas de controle da morte celular por meio do estudo de genes associados a apoptose.

Ressalta-se também maior expressão do gene Interferon tau (IFNT) em embriões produzidos de vacas soronegativas. Esse gene é responsável pela codificação de uma proteína de mesmo nome, essencial no reconhecimento materno e estabelecimento da gestação. Portanto, a menor expressão desse gene em embriões de vacas soropositivas pode elucidar o fato de animais infectados pelo vírus possuírem problemas reprodutivos relacionados a subfertilidade, repetição de estro e perda embrionária o que poderia estar relacionado a uma falha no processo de sinalização embrionário-materna da gestação (Zhao et al., 2017).

Para os ensaios de imunofluorescência, em nenhum dos 24 embriões avaliados oriundos de doadoras soronegativas foi identificado a partícula viral (Figura 3). Já para o grupo de embriões de vacas soropositivas, como apresentado na tabela 4, em 7 de 31 embriões avaliados foi possível a identificação do BHV1 distribuído no interior de células embrionárias e na zona pelúcida dos embriões (Figura 3 e 4), evidenciando capacidade de transpassar a zona pelúcida, característica essa já reportada em ovócitos, assim como o conhecimento do útero, ovários e tuba uterina como possíveis sítios de replicação viral (QUEIROZ-CASTRO et al., 2018; ALVES et al., 2019; QUEIROZ-CASTRO et al., 2019).

Tabela 4 – Imunomarcacão do BHV1 em embriões bovinos produzidos *in vitro* de acordo com o status sorológico das vacas doadoras

CLASSIFICAÇÃO	Embriões avaliados	Identificação do BHV1	
	N	N	%
Soronegativo	24	-	-
Soropositivo	31	07	22,58

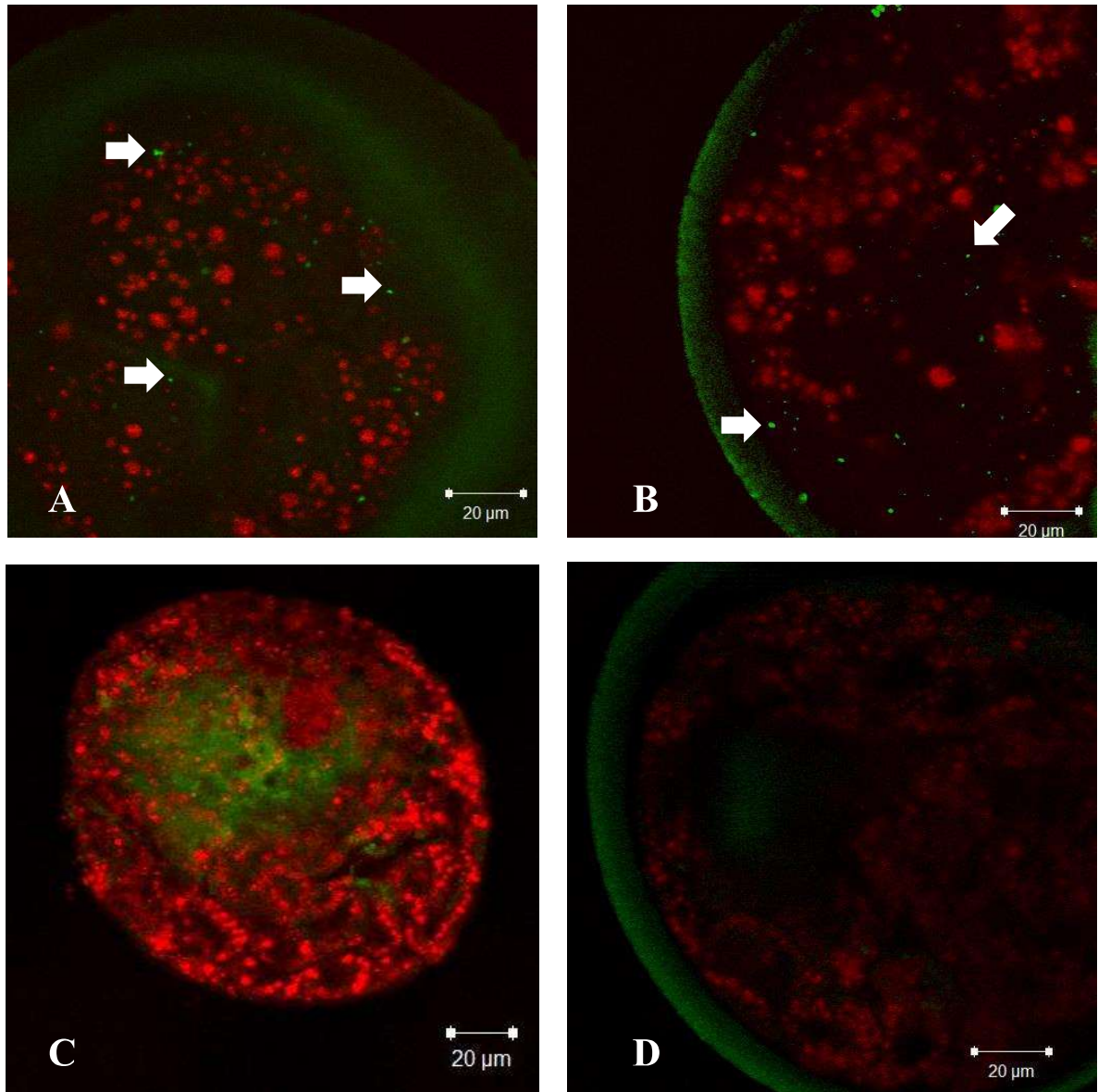


Figura 3 – Embriões bovinos oriundos de animais soropositivos (A) e (B) e doadoras soronegativas (C) e (D). A imagem (A) e (B) destacam a presença do BHV1 apontado pelas setas brancas, caracterizada pelos pontos de fluorescência verde presente nas células embrionárias.

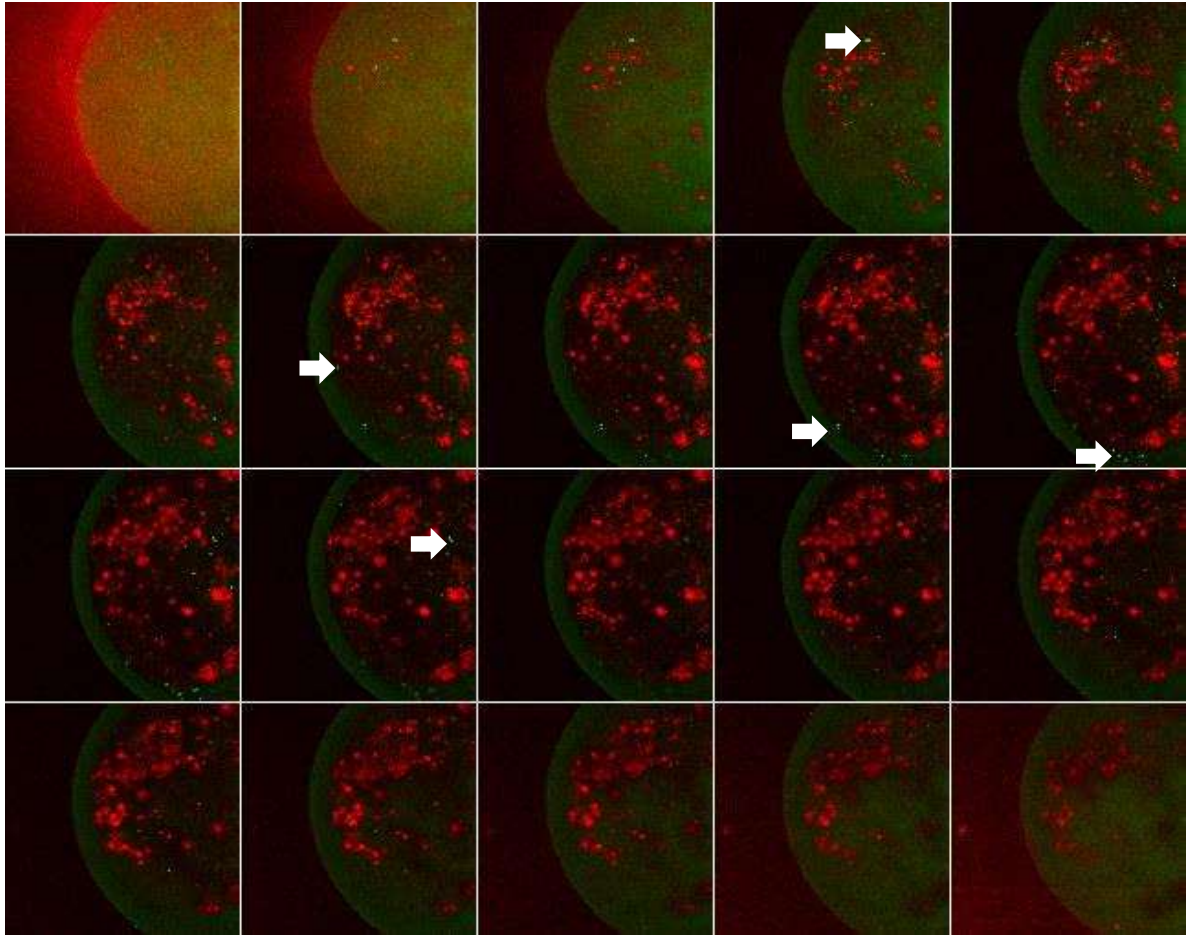


Figura 4 – Sequência de imagens z-Stack de embrião oriundo de vaca soropositiva na microscopia confocal em diferentes focos, elucidando a presença do BHV1 (pontos verde-fluorescentes indicados pelas setas) na superfície da zona pelúcida e no interior de células embrionárias.

Estudos mostraram que o vírus pode ser capaz de alcançar a membrana celular do embrião na ausência da ZP ou ultrapassá-la (SPEAR, 2004). Segundo, Miller et al. (1991), Bielanski et al. (1997) e Vanroose et al. (1998) em qualquer fase da gestação, o vírus pode ser capaz de comprometer o desenvolvimento embrionário e do feto.

6.4 CONCLUSÃO

Esse experimento trouxe achados importantes no que diz respeito às particularidades da relação do BHV1 com o ambiente de produção *in vitro* de embriões. Embriões de doadoras soropositivas tiveram capacidade de expressão gênica alterada quanto aos genes envolvidos

no processo biológico de apoptose, tendo sido atribuído a ação viral. Animais de alta titulação de anticorpos contra o BHV1 apresentaram seus ovócitos e embriões com menor capacidade de desenvolvimento e viabilidade, o que pode comprometer a eficiência reprodutiva desses animais.

6.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S.V.P.; COSTA, E.P.; QUEIROZ-CASTRO, V.L.D.; MACHADO-NEVES, M.; GUIMARÃES, J.D.; GOMES, L.L.; AZEVEDO JUNIOR, M.A.; SILVA-JUNIOR, A. Bovine herpesvirus 1 can impact the bovine oocyte development during in vitro maturation. **Research in Veterinary Science**. v.123, p.135-140, 2019.
- BIELANSKI, A.; LUTZE-WALLACE, C.; SAPP, T.; JORDAN, L. The efficacy of trypsin for disinfection of in vitro fertilized bovine embryos exposed to bovine herpesvirus 1. **Animal Reproduction Science**, v.47, p.1-8, 1987.
- BIELANSKI, A.; DUBUC, C. In vitro fertilization and culture of ova from heifers infected with bovine herpesvirus-1 (BHV-1). **Theriogenology**, v.41, p.1211-17, 1994.
- BIELANSKI, A.; JORDAN, L.; Lutze-Wallace, C. et al. 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, 1997.
- BOWEN, R.A.; ELDSSEN, R.P.; SEIDEL, G.E. Infection of early bovine embryos with Bovine Herpes virus-1. **American Journal of Veterinary Research**, v.46, p.1095-97, 1985.
- CAN, M. F.; ATASEVEN, V. S.; YALÇIN, C. Estimation of production and reproductive performance losses in dairy cattle due to bovine herpesvirus 1 (BoHV1) infection. **Veterinary archive**, 86, 499-513, 2016.
- COWLEY, D.J.B.; CLEGG, T.A.; DOHERTY, M.L.; MORE, S.J. Aspects of bovine herpesvirus-1 infection in dairy and beef herds in the Republic of Ireland. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.53, p. 40, 2011.
- DURHAM, P. J. K.; HASSARD, L. E. Prevalence of antibody to infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza 3, bovine respiratory syncytial, and bovine viral diarrhoea viruses in cattle in Saskatchewan and Alberta. **Canadian Veterinary Journal**, v.31, p.815- 820, 1990.
- GUERIN, B. ; LE GUIENNE, B. ; ALLIETTA, M. ; HARLAY, T. ; THIBIER, M. Effets de la contamination par le BHV-1 sur la maturation et fécondation in vitro des ovocytes des bovines. **Recueil de Medecine Veterinaire**, v.66, p.911-917, 1990.
- GUERIN, B.; NIBART, M.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P. Sanitary risks related to embryo transfer in domestic species. **Theriogenology**, v.47, p.33-42, 1997.

HOUSE, J.A.; BAKER, J.A. Bovine herpesvirus IBR-IPV. The antibody virus neutralization reaction. **Cornell Veterinary**. v.61, p.320-335, 1971.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal. Censo Agropecuário 2021. Acessado em 02 de janeiro de 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/bovinos/br>

International Embryo Technology Society (IETS) – 2020 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. World embryo industry grows despite the Pandemic. **Embryo Technology Newsletter**, v. 39, n.4, 2021

LIVAK K.J., SCHMITTGEN T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**. 2001; 25: 402–408

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

MILLER, J.M.; VAN DER MAATEN, M.J.; WHETSTONE, C.A. Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA. **American Journal of Veterinary Research**, v.52, p.458-461, 1991.

OLIVEIRA, A.P. **Pesquisa do vírus da rinotraquíte infecciosa dos bovinos em complexos cumulus-oócito e líquido folicular**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte ,2007.

PFAFFL MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**. 2001; 29: 2002–2007.

QUEIROZ-CASTRO, V.L.D.; COSTA, E.P.; ALVES, S.V.P.; SILVA-JUNIOR, A.; MACHADO-NEVES, M.; GUIMARÃES, J.D. Detection of bovine herpesvirus 1 in cumulus-oocyte complexes of cows. **Research in Veterinary Science**. v.120, p.54-56, 2018.

QUEIROZ-CASTRO V.L.D., DA COSTA E.P., ALVES S.V.P., MACHADO-NEVES M., GUIMARÃES J.D., GOMES L.L., DOMINGOS S.V., RIBEIRO C.G., CALDAS R.T., SILVA-JUNIOR A. (2019a) Bovine herpesvirus 1 can cross the intact zona pellucida of bovine oocytes after artificial infection. **Plos One**, 14(7): e0218963.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 265p., 2002

SAYERS, R.G. Associations between exposure to bovine herpesvirus 1 (BHV1) and milk production, reproductive performance, and mortality in Irish dairy herds. **Journal of Dairy Science**. 100:1340–1352, 2017.

SHIRVANI, E.; LOTFI, M.; KAMALZADEH, M.; NOAMAN, V.; BAHRIARI, M.; MOROVATI, H.; HATAMI, A. Seroepidemiological study of bovine respiratory viruses (BRSV, BHV1, PI-3V, BVDV, and BAV-3) in dairy cattle in central region of Iran (Esfahan province). **Tropical Animal Health and Production**, v.44, p.191–195, 2012.

SILVA-FRADE, C.; MARTINS JR, A.; BORSANELLI, A.C.; CARDOSO, T.C. Effects of bovine *Herpesvirus* Type 5 on development of in vitro-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v.71, p. 324-31, 2010

STATHAM, J. M. E.; RANDALL, L.V.; ARCHER, S.C. Reduction in daily milk yield associated with subclinical bovine herpesvirus 1 infection. **Veterinary Records**. 177:339, 2015.

STRINGFELLOW, D. A.; GIVENS, M. D. Manual of the International Embryo Transfer Society, 4 ed. **International Embryo Transfer Society**, Champaign, 2010.

THIBIER, M.; WRATHALL, T. **International Trade of Livestock Germplasm**. New York: Taylor & Francis. (Encyclopedia of Biotechnology in Agriculture and Food) 4p, 2012.

TSUBOI, T.; IMADA, T. Effect of bovine herpes virus- 1, bluetongue virus and akabane virus on the in vitro development of bovine embryos. **Veterinary Microbiology**, 51, 135-142, 1997.

VANROOSE, G.; NAUWYNCK, H.; VAN SOOM, A.; VANOPDENBOSCH, E.; DE KRUIF, A. Replication of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhea virus in zona-free and zona-intact in vitro-produced bovine embryos and the effect on embryo quality. **Biology of Reproduction**, v.58, p.857-866, 1998.

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

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

VIDOR, T. HALFEN, D. C., LEITE, T. E. Herpesvírus Bovino tipo 1(HVB-1). Sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos. **Ciência Rural**, v.25, n.3, p.421-424, 1995.

ZHAO S, WU Y, GAO H, EVANS A, ZENG SM. Roles of interferon-stimulated gene 15 protein in bovine embryo development. **Reproduction Fertility and Development**. 29(6):1209-1216, 2017.

WATANABE Y.F., SOUZA A.H., MINGOTI R.D., FERREIRA R.M., BATISTA E.O.S., DAYAN A., WATANABE O., MEIRELLES F.V., NOGUEIRA M.F.G., FERRAZ J.B.S., BARUSELLI PS. (2017) Number of oocytes retrieved per donor during OPU and its relationship with in vitro embryo production and field fertility following embryo transfer. **Animal Reproduction**, 14(3):635-644.

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

**7. CAPÍTULO II – INFECCÃO ARTIFICIAL DE GAMETAS E EMBRIÕES PELO
BHV1.**

7.1 INTRODUÇÃO

O uso de biotécnicas reprodutivas que envolvem a produção de embriões bovinos, seja *in vitro* ou *in vivo* apresenta grande crescimento nos últimos anos respaldando os grandes avanços no contexto de produção e melhoramento genético obtidos no Brasil e no mundo (IETS, 2021). No contexto geral, essas biotecnologias contribuem para a redução na possibilidade de transmissão de patógenos quando comparadas a monta natural. No entanto, ressalta-se que não se deve desconsiderar os riscos dessas técnicas na transmissão de agentes patogênicos

Essas biotécnicas reprodutivas, no contexto geral, têm contribuído para a menor possibilidade de transmissão de patógenos quando comparadas a monta natural. No entanto, ressalta-se que não se deve desconsiderar os riscos destas técnicas na transmissão de patógenos. Nesse contexto, a infecção pelo BHV1 é de grande importância econômica, fácil disseminação e difícil controle, estando amplamente disseminada nos rebanhos bovinos de corte e de leite (THIBIER & WRATHALL, 2012).

Durante as etapas que constituem a produção *in vitro* de embriões bovinos, os embriões sofrem inúmeras alterações, particularmente na estrutura da zona pelúcida, a exemplo da fase de fertilização, tornando-a com maior ou menor vulnerabilidade a ação viral (VANROOSE et al., 2000).

Diante disso, o presente estudo pretende investigar qual é a etapa da produção *in vitro* de embriões em que embriões bovinos apresentam maior susceptibilidade a infecção pelo BHV1. Esses conhecimentos trarão contribuições relevantes quanto às particularidades das etapas da PIVE bovinos quanto à capacidade e a eficiência da zona pelúcida em prevenir a infecção pelo BHV1.

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento experimental envolveu a manipulação de gametas e embriões bovinos simulando o cenário de produção *in vitro* de embriões. Foram realizados testes de soroneutralização, qPCR, avaliação da taxa de viabilidade, clivagem e de desenvolvimento embrionário. Ao final do processo de PIVE, os embriões foram analisados quanto a expressão gênica e avaliados quanto a presença e localização viral nos embriões obtidos pela microscopia confocal de varredura a laser.

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, com autorização do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa, sob protocolo número 38/2020 (Apêndice I).

7.2.1 Sinopse dos procedimentos experimentais

Ovários e amostras de sangue de fêmeas bovinas foram obtidos em frigorífico #SIF 2556, distante 80 quilômetros do laboratório. Essas amostras foram então devidamente identificadas e acondicionados à 37 °C, até serem processados no Laboratório de Produção *in vitro* e Criopreservação de Embriões. O soro obtido da amostra de sangue foi utilizado para a realização do teste de soroneutralização viral, cujo procedimento encontra-se melhor detalhado em item específico. Esse teste foi utilizado para realizar a triagem das doadoras em soronegativas e soropositivas, tendo por objetivo utilizar somente os animais soronegativos nesse estudo. Já os ovários, foram aspirados individualmente para recuperação dos ovócitos que posteriormente foram maturados em estufa de CO₂ a 5 % e 38,5 °C, fertilizados e acompanhados durante o seu desenvolvimento embrionário.

Nesse capítulo, como não foi possível saber sobre o status sorológico dos animais previamente ao abate, os complexos *cumulus*-ovócito das doadoras foram aleatoriamente

designadas a 4 tratamentos considerando a infecção experimental pelo BHV1: durante a etapa de MIV (1), FIV (2), CIV (3) e grupo controle (4). O grupo controle foi formado por ovócitos ou embriões que não receberam partículas do BHV1 em nenhuma dessas etapas.

Para a etapa I, a incubação com o vírus se deu durante a etapa de maturação ovocitária, na qual os ovócitos foram transferidos para microgotas de meio de MIV, contendo BHV1 na concentração de $10^{4.3}$ TCID₅₀/mL. As estruturas permaneceram incubadas com o vírus durante todo o período de maturação por 24 horas a 38,5 °C em 5 % de CO₂ (SILVA-FRADE, 2010).

Na etapa II, a infecção experimental se deu durante a etapa de fertilização, seguindo as mesmas padronizações adotadas para a etapa I quanto a concentração viral. Por sua vez, a etapa III consistiu de inoculação viral do BHV1 na etapa posterior a fertilização (10 µL de BHV1 a cada 100 µL de meio no título de $10^{5.3}$ TCID₅₀/mL), ou seja, durante a fase de desenvolvimento embrionário. As estruturas permaneceram incubadas com o vírus durante todo o período de 7 dias de desenvolvimento embrionário. Os embriões produzidos foram lavados em meio Talp-hepes entre os momentos que diferem cada etapa: MIV, FIV e CIV.

Após 7 dias da fertilização *in vitro*, parte dos embriões foram congelados para posterior estudo da expressão gênica, a outra metade foi processada para identificação e localização de partículas virais do BHV1 por meio da técnica de microscopia confocal de varredura a laser.

Quando houve necessidade de multiplicação viral para aumento do título, o vírus foi inoculado em monocamadas de células MDBK, incubado em estufa de CO₂ à temperatura de 37 °C por 60 minutos, para a adsorção do vírus às células. Em seguida foram realizados três eventos de congelamento e descongelamento da garrafa de cultivo no freezer a -20 °C. O conteúdo foi posteriormente aliquotado em criotubos e armazenados a -80 °C para verificação do título viral de acordo com metodologia descrita por Brum e Weiblen (2007).

Após o resultado da sorologia, os dados já obtidos de complexos *cumulus*-ovócito e embriões oriundos de animais soropositivos foram descartados, utilizando-se somente daqueles onde não houve infecção natural, ou seja, somente dados oriundos de doadoras soronegativas foram utilizados nesse capítulo.

Além do estudo da capacidade de fecundação e desenvolvimento embrionário, os embriões que foram obtidos ao final de cada rotina de produção *in vitro* de embriões, foram analisados quanto a expressão gênica de transcritos relacionados ao processo de proliferação e apoptose celular, desenvolvimento e remodelamento gênico embrionário e estresse oxidativo. Além disso, parte dos embriões gerados também foram avaliados por meio do teste de imunofluorescência utilizando a microscopia confocal de varredura a laser na busca pela identificação e localização do BHV1.

7.2.2 Coleta das amostras

As amostras experimentais foram coletadas no Frigorífico Sabor de Minas #SIF 2556, localizado no município de Muriaé, distante 80 quilômetros da Universidade Federal de Viçosa.

Foram utilizadas amostras de sangue e ovários de fêmeas bovinas mestiças destinadas ao abate, provenientes de rebanhos sabidamente não vacinados contra o BHV1, a fim de evitar a interferência da vacinação nos resultados do teste sorológico.

Logo após a insensibilização, durante a etapa de sangria foram coletadas amostras de sangue de cada animal, sem anticoagulante, utilizando-se de tubos de ensaio de 5 mL, os quais foram identificados e acondicionados sob refrigeração.

Já na etapa de evisceração, foram coletados os ovários dos respectivos animais, sendo identificados e acondicionados individualmente em solução de cloreto de sódio 0,9 %,

acrescida de gentamicina. Esta solução foi mantida à temperatura de 37 °C, por meio de caixa térmica, durante o transporte até o laboratório.

7.2.3 Processamento das amostras

No Laboratório de Produção *in vitro* e Criopreservação de Embriões, as amostras de sangue sem anticoagulante foram preparadas para a realização da soroneutralização.

Para isso, as amostras foram colocadas em banho-maria à 37 °C por 15 minutos e, em seguida, centrifugadas a 860 G por cinco minutos para facilitar a separação do soro que, logo após, foi transferido para microtubos de 1,5 mL previamente identificados. Então, as amostras de soro foram inativadas à 56 °C por 30 minutos antes de serem remetidas ao Laboratório de Virologia Animal – DVT, para realização da sorologia em microplacas.

7.2.4 Soroneutralização viral

O teste para o diagnóstico sorológico foi realizado empregando-se da prova de soroneutralização em microplacas, de acordo com a metodologia proposta por House e Baker (1971).

Foram utilizadas microplacas de 96 cavidades (CORNING COSTAR®), nas quais, a primeira coluna foram constituídas do controle de células, não recebendo soro nem suspensão viral, sendo substituído por 100 µL de Minimum Essential Medium (MEM) livre de Soro Fetal Bovino (SFB). Por sua vez, a segunda coluna foi constituída do controle de toxicidade do soro. Essa coluna recebeu a suspensão celular e soro não diluído. A diluição do soro deu-se entre as colunas 3 e 12 da microplaca e foram utilizadas diluições na base 2 crescentes do soro, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 e 1:128.

Dessa forma, cada diluição do soro ocupou uma coluna da microplaca (8 cavidades) em ordem decrescente de concentração. Posteriormente às diluições, cada cavidade receberam

uma dose constante de vírus, contendo 100 TCID₅₀/50 µL do isolado BHV1 LA, com exceção das colunas 1 e 2. Após incubação da mistura soro-vírus por 12 h a 37 °C, em estufa de CO₂ uma suspensão de células Madin-Darby Bovine Kidney de 50 µL na concentração de 300.000 células/mL foi adicionada, seguida de incubação em estufa de CO₂ a 37 °C.

A leitura dos testes foi realizada após 96 horas de incubação, por meio do monitoramento do efeito citopático. Foram considerados os títulos de anticorpos neutralizantes as maiores diluições do soro capazes de inibir a replicação viral e conseqüente produção de efeito citopático, sendo classificados em grupos: soronegativos (titulação ≤ 2 TCID₅₀) e soropositivos (>2 TCID₅₀). Cada soro foi testado em duplicata e a quantidade de anticorpos neutralizantes foi calculada pela média aritmética das repetições. Amostras sabidamente positivas e negativas foram utilizadas como controle da técnica.

7.2.5 Real time qPCR

Foram selecionados para esse estudo 20 genes, 6 relacionados a processos biológicos de apoptose celular: BCL-2 Apoptosis Regulator (BCL2), Apoptotic Peptidase Activating Factor 1 (APAF1), BCL-2 Associated X (BAX), MCL-1 Apoptosis Regulator (MCL1), Caspase 2 (CASP2) e Caspase 3 (CASP3), 2 relacionados ao estresse oxidativo: Superoxide Desmutase 2 (SOD2) e Glutathione Peroxidase 1 (GPX1), 5 relacionados ao remodelamento gênico: DNA metiltransferase 1 (DNMT1), DNA metiltransferase 3A (DNMT3A, DNA metiltransferase 3B (DNMT3B), Pou Class 5 Homeobox 1 (POU5F1) e Nanog Homeobox (NANOG), 4 relacionados ao desenvolvimento embrionário: Gap Junction Protein Alpha 1 (GJA1), Gap Junction Protein Beta 3 (GJB3), Fibroblast Growth Factor 9 (FGF9) e Insulin Like Growth Factor 1 (IGF1), além do gene endógeno Glyceraldehyde 3 Phosphate Dehydrogenase (GAPDH).

Os embriões bovinos produzidos *in vitro* de cada um dos grupos experimentais foram rapidamente congelados em criotubos imersos em botijão de nitrogênio líquido. Para extração do RNA total e síntese do cDNA, as amostras foram descongeladas em grupos de 5 embriões viáveis cada réplica. Para isso, foi utilizado o kit comercial Cells-to-cDNA II Invitrogen Thermofisher (Ambion–Austin, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Após essa etapa, a quantificação da concentração de cDNA foi realizada no espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare). Após isso, as amostras foram diluídas para concentração de 10 ng/μL e mantidas a - 20 °C para análise da qPCR.

A quantificação relativa dos genes foi realizada in duplicata no termociclador ABI Prism 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) usando o GoTaq qPCR Master Mix (Promega Corporation, Madison, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. As condições de amplificação foram de 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos e extensão a 60 °C por 60 segundos.

A expressão relativa de cada gene foi calculada utilizando o método de ΔCt (Ct gene alvo – Ct gene endógeno) para cada amostra, na qual Ct é expresso pelo número do ciclo da PCR na qual houve emissão de fluorescência cruza um limiar definido conforme o padrão do termociclador. As diferenças de expressão dos genes foram estimadas usando a expressão $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001; PFAFFL, 2001).

Ademais, a técnica de qPCR também foi utilizada para detectar a possível presença de DNA do BHV1 em todas amostras de meios de cultivo, sêmen e os ovócitos de cada uma das doadoras soronegativas. Para isso, foi utilizado um par de primer específico para este agente viral descrito por Candido et al. (1999) com a sequência de oligonucleotídeos: PF 5'-GTACTGGCTC ATGTTTCC -3' e PR 5'-CATGTACCGCCAGGGCAC -3' amplificando um fragmento de 456bp da proteína ORF1 do BHV1.

7.2.6 Aspiração folicular

Os folículos ovarianos antrais presentes nos ovários de cada animal foram puncionados com agulhas descartáveis de 40 x 1,2 mm 21 G acopladas em seringas de 3 mL. O líquido aspirado foi depositado em microtubos de 2 mL identificados para sedimentação dos complexos *cumulus*-ovócito. Após cinco minutos de sedimentação, o sobrenadante foi descartado, no intuito de separar os complexos.

Os complexos *cumulus*-ovócito (COCs) rastreados e recuperados foram transferidos para placas de cultivo de 60 mm contendo solução de PBS (Phosphate Buffered Saline) acrescido de 10 % de SFB a 37 °C e avaliados em microscópio estereoscópio com aumento final de 40 x. Os ovócitos foram então transferidos para outra placa de Petri contendo meio Talp-Hepes e então classificados morfológicamente, de acordo com Stringfellow e Givens (2010). A avaliação foi realizada e registrada individualmente para cada animal.

Após a classificação, foram selecionados somente os ovócitos considerados viáveis e de classificação grau I e II de acordo com avaliação morfológica das camadas de células do *cumulus* e citoplasma. Foram considerados inviáveis, ovócitos de classificação grau III e IV, não sendo utilizados para as etapas de cultivo *in vitro*.

7.2.7 Maturação, fecundação e cultivo *in vitro*

Os COCs aspirados foram rastreados em PBS, lavados em meio Talp-hepes e meio de maturação e foram transferidos para microgotas em placa de cultivo de 35 mm de diâmetro. A fim de alcançar a maturação, os COCs foram cultivados por 24 horas à 38,5 °C sob atmosfera controlada a 5 % de CO₂ em ar atmosférico e umidade máxima em estufa incubadora. Todo o processo de produção *in vitro* de embriões foi realizado de maneira individual por doadora.

Após esse período, os ovócitos foram novamente lavados em meio Talp-hepes e fecundados com sêmen convencional. Para a fertilização *in vitro* (FIV), os ovócitos e

espermatozoides foram co-incubados por 18 horas, nas mesmas condições utilizadas para a MIV.

O sêmen utilizado no processo de fertilização foi obtido de uma única partida comercial de touro com resultado negativo para a PCR das amostras de sêmen utilizadas. O sêmen foi centrifugado em gradiente de Percoll (45 e 90 %) a 6.000 rotações por minuto por 5 minutos. O pellet formado foi lavado em meio TALP a 3.000 rotações por minuto por 2 minutos. Após isso, o sedimento foi então diluído em meio de fecundação suplementado com 3 mg/mL de heparina e solução de PHE (2 mM de penicilamina, 1 mM de hipotaurina e 250 mM de epinefrina, Sigma-Aldrich®) a fim de obter uma concentração final de 10^6 espermatozoides/mL nas microgotas de fecundação.

Após período de coincubação dos gametas em meio de fecundação, os possíveis zigotos foram desnudados através de processo mecânico auxiliado por pipetagens sucessivas. Após isso, os possíveis zigotos foram lavados em meio de cultivo *in vitro* (CIV) e foram mantidos por 7 dias pós fecundação em estufa incubadora à 38,5 °C sob atmosfera controlada de 5 % de CO₂ e 5 % de O₂ em ar atmosférico e umidade máxima. Os meios de MIV, FIV e CIV utilizados nesse estudo foram adquiridos da empresa comercial Vitrogen Biotecnologia (Cravinhos, São Paulo).

7.2.8 Capacidade de fecundação e desenvolvimento embrionário

Para a avaliação da capacidade de fecundação foi avaliada a taxa de clivagem como sendo o número de ovócitos que foram fecundados e iniciaram as primeiras divisões mitóticas às 72 horas pós-fecundação. Já o desenvolvimento embrionário, foi avaliado pelo número de embriões que atingiram o estágio de mórula (Mo), blastocisto inicial (Bi), blastocisto (Bl), blastocisto expandido (Bx) e blastocisto eclodido (Be) às 168 h pós-fecundação *in vitro*. Os embriões obtidos foram ainda classificados, conforme recomendado pela Sociedade

Internacional de Tecnologia de Embriões em graus de I a IV (STRINGFELLOW e GIVENS, 2010). Após essas avaliações e registros, os embriões foram destinados para testes de imunofluorescência e expressão gênica.

7.2.9 Microscopia Confocal de Varredura a Laser

Os embriões bovinos processados para o teste de imunofluorescência foram fixados por uma hora em solução de Zamboni (paraformaldeído 4 % e ácido pícrico 0,4 % em tampão fosfato de sódio (PBS) a 0,1 M e pH 7,2). Em seguida, foram realizadas 15 lavagens sucessivas e intervaladas de 10 minutos com PBS, a fim de remover o excesso da solução fixadora. As amostras foram então transferidas para uma solução de PBS acrescida de Triton X-100 (SIGMA-ALDRICH®) a 1 % por um período de uma hora e meia para a permeabilização seguida de novas lavagens.

As amostras foram incubadas com o anticorpo primário monoclonal (VMRD®), isotipo IgG2b, específico para a glicoproteína gC do BHV1 (1:100) por período de 16 horas. Após a incubação nova seção de 15 lavagens foi executada e em seguida as amostras foram incubadas com o anticorpo secundário (SIGMA-ALDRICH®) anti-IgG conjugado com isotiocianato de fluoresceína – FITC (1:200) por 16 horas no escuro.

Nova seção de 15 lavagens foi executada e as amostras foram incubadas por 30 minutos com o corante de ácido nucléico – TO-PRO®3 iodeto (1:1000), etapa essa seguida de novas lavagens. Após isso, as amostras foram montadas em lâminas utilizando MOWIOL® e analisadas em Microscópio Confocal de Varredura a Laser Zeiss LSM 510 META, disponível no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa. Todas as amostras foram realizadas em duplicata, sendo uma amostra utilizada como controle da técnica com a omissão da incubação com o anticorpo primário.

7.2.10 Análises estatísticas

As variáveis qualitativas dicotômicas (presença ou ausência do BHV1) e as taxas de viabilidade ovocitária, clivagem e desenvolvimento embrionário, bem como os dados de expressão gênica, foram comparados em tabelas de contingência e analisadas pelo teste de qui-quadrado, a 5 % de probabilidade (SAMPAIO, 2002).

A expressão gênica relativa foi avaliada por meio do fold-change, calculado por meio da fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. As análises estatísticas foram realizadas no software SAS (Statistical Analysis System) adotando-se significância de $\alpha = 0,05$.

7.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse estudo um total de 107 doadoras foram coletadas tendo seus ovócitos atribuídos a cada um dos 4 tratamentos experimentais: infecção artificial com BHV1 na MIV, FIV, CIV e grupo controle. Portanto, os ovócitos, possíveis zigotos e embriões foram todos manipulados de maneira individual de acordo com cada doadora. A fim de excluir a possibilidade de infecção prévia dos complexos *cumulus* ovócitos em vacas soropositivas já demonstrado por trabalhos de pesquisa, foram descartados todos os dados referentes a 49 doadoras que após revelado o resultado do teste sorológico, mostraram-se com a presença de anticorpos anti BHV1 (ALVES et al., 2019; QUEIROZ CASTRO et al., 2018).

Nesse estudo, após aspiração folicular e rastreamento, foram obtidos 1.779 ovócitos oriundos de 58 vacas soronegativas dos quais 1.098 (61,72 %) foram considerados viáveis quanto a aspectos morfológicos na classificação de qualidade em graus de I a IV, sendo 544 de grau I (30,58 %), 554 grau II (31,14 %), 281 grau III (15,80 %) e 400 grau IV (22,48 %).

Conforme mostrado na tabela 1, a taxa de viabilidade dos ovócitos dos grupos infecção artificial de BHV1 na MIV, FIV, CIV e grupo controle foi de 62,23 %, 60,97 %, 60,66 % e 63,72 % respectivamente, sendo considerados valores estatisticamente equivalentes.

Tabela 1 – Distribuição da classificação de ovócitos (grau I a IV) e taxa de viabilidade de acordo com o tratamento – diferentes etapas de infecção artificial com $10^{4,3}$ TCID₅₀/mL BHV1.

Tratamento	G I	G II	G III	G IV	Total	Viáveis	
						(N)	(%)
MIV	202	195	102	139	638	397	62,23 ^a
FIV	206	247	120	170	743	453	60,97 ^a
CIV	63	48	23	49	183	111	60,66 ^a
Controle	73	64	36	42	215	137	63,72 ^a
Total	544	554	281	400	1779	1098	61,72

Porcentagens sobrescritas com letras diferentes indicam diferença ($P < 0,05$) pelo teste do qui-quadrado.

Os dados referentes a clivagem e desenvolvimento embrionário encontram-se reunidos na tabela 2. Ao final desse estudo, foram produzidos um total de 173 embriões, sendo 120 (69,36 %) classificados como viáveis (grau I e II). Desses, 54 foram devidamente acondicionados e utilizados para avaliação da expressão gênica e 66 foram fixados e processados para realização do teste de imunofluorescência.

Tabela 2 – Taxa de clivagem, viabilidade e inviabilidade de embriões produzidos *in vitro* conforme etapa de co-cultivo com $10^{4,3}$ TCID₅₀/mL BHV1.

Etapas	Avaliação 3dpf	Clivagem		Embriões 7dpf	TxBlcliv viáveis %	TxBltot viáveis %	TxMoBl inviável %
		N	%				
MIV	351	107	30,48 ^b	39	22,43 ^b	6,84 ^c	38,46 ^b
FIV	420	219	52,14 ^a	77	23,29 ^b	12,14 ^b	33,77 ^b
CIV	95	61	64,21 ^a	14	9,84 ^c	6,32 ^c	57,14 ^a
Controle	127	86	67,72 ^a	43	45,35 ^a	30,71 ^a	9,30 ^c
Total	993	473	47,63	173	25,37	12,08	30,64

Mo = Mórula, Bl = Blastocisto, e dpf = dias pós fecundação *in vitro*. Porcentagens sobrescritas com letras diferentes indicam diferença ($P < 0,05$) pelo teste do qui-quadrado.

Verificou-se redução ($P < 0,05$) na taxa de clivagem do grupo de infecção experimental na MIV quando comparado as demais grupos, mostrando grande sensibilidade de ovócitos viáveis a ação viral. Esse fenômeno já havia sido reportado por estudo prévio do nosso grupo de pesquisa (ALVES et al., 2019). A maturação *in vitro* é a etapa na qual o ovócito passa por alterações bioquímicas, estruturais e moleculares no núcleo e no citoplasma a fim de alcançar condições necessárias para suportar as sucessivas etapas do desenvolvimento ovocitário. É um processo complexo que envolve, dentre outras, mudanças de configuração cromossômica, reorganização de organelas, armazenamento de mRNAs, proteínas e fatores de transcrição (FERREIRA, 2009).

Devido a sua capacidade de causar lise nas células do *cumulus* como forma de se replicar, ação característica dos herpesvírus conhecida como efeito citopático, o BHV1 tem potencial de interferir nos processos celulares que envolvem a maturação ovocitária. As células do *cumulus* tem fundamental importância nesse complexo processo de comunicação celular uma vez que são responsáveis, dentre outras, pelo transporte e troca bidirecional de

moléculas e proteção do ovócito (TSUBOI et al., 1992; TSUBOI e IMADA, 1997; LOLICATO et al., 2014; UHDE et al., 2017).

Vale ressaltar a relevância da função anabólica dessas células na produção de componentes químicos para o ovócito, como por exemplo, os micros RNAs que atuam como reguladores de genes envolvidos diretamente nos processos de maturação (TONG et al., 2014; GILCHRIST et al., 2016; MACAULAY et al., 2016). Adicionalmente, fatores inibidores e indutores da meiose estão relacionados com o controle da maturação por meio da comunicação das células do *cumulus* com o ovócito mediada pelas junções *gap* (MAHMOUDI et al., 2005).

Oliveira (2014) detectou DNA viral do BHV1 em amostra de COCs e fluido folicular oriundos de animais naturalmente infectados após imunossupressão. Em estudos recentes do grupo de pesquisa, COCs obtidos de animais naturalmente infectados pelo BHV1 com alta titulação de anticorpos, apresentaram comprometimento na sua capacidade de maturação nuclear *in vitro*. Além disso, foi possível a identificação viral em COCs de animais assintomáticos, estes estavam localizados nas células do *cumulus*, na zona pelúcida e até mesmo dentro dos ovócitos (QUEIROZ-CASTRO et al., 2018; ALVES et al., 2019; QUEIROZ-CASTRO et al., 2019).

Nota-se grande impacto da infecção experimental pelo vírus em função de redução das taxas de produção de embriões viáveis e aumento daqueles considerados inaptos para transferência. O grupo de infecção durante o CIV, simulando infecção do embrião na tuba uterina ou no útero foi o mais afetado quanto as taxas de produção de embriões viáveis e inviáveis (9,84 e 45,35 %) comparado ao grupo controle (57,14 e 9,30 %). Esse fenômeno foi relacionado ao maior tempo de exposição ao vírus durante o cultivo.

Corroborando com os resultados desse estudo, a reduzida proporção de desenvolvimento de blastocistos viáveis foi descrita também por Guérin et al. (1990), Bielanski e Dubuc (1994), Vanroose et al. (1999) e Makarevich (2007).

A zona pelúcida, estrutura porosa de filamentos de glicoproteínas que recobre ovócitos e embriões durante parte de seu desenvolvimento, tem sido alvo de estudos implicados na proteção efetiva ou ineficaz contra a ação do BHV1. A zona pelúcida (ZP) facilita a passagem dos embriões pela tuba uterina e protege o embrião durante os estádios iniciais de desenvolvimento. (EPIFANO e DEAN, 1994)

Vanroose et al. (2000) simulando o tamanho do BHV1 com o uso de microesferas, afirmaram que partículas com tamanho aproximado de 180–200 nm podem atravessar parte da ZP, chegando a camadas mais internas, no entanto não conseguiriam atravessá-la totalmente. Esse mesmo autor, ressalta ainda que o vírus pode aderir a zona pelúcida e infectar o embrião na ocasião em que ocorreu a fecundação, momento esse considerado de instabilidade da zona pelúcida.

Na estrutura da ZP de zigotos fecundados, foi observado por Vanroose et al. (2000) a formação de escavações e fissuras com as dimensões da cabeça espermática, podendo proporcionar um ponto de entrada para o vírus no momento da fecundação. Outro momento no qual os embriões bovinos podem ser considerados susceptíveis a infecção pelo BHV1 é a partir da fase de blastocisto, quando já se inicia o processo de degeneração da zona pelúcida. Segundo Bowen (1985) e Bielanski et al. (1987) embriões sem a ZP permitiriam a replicação viral. A possível ação viral nessa fase simularia a infecção *in vivo* no ambiente uterino.

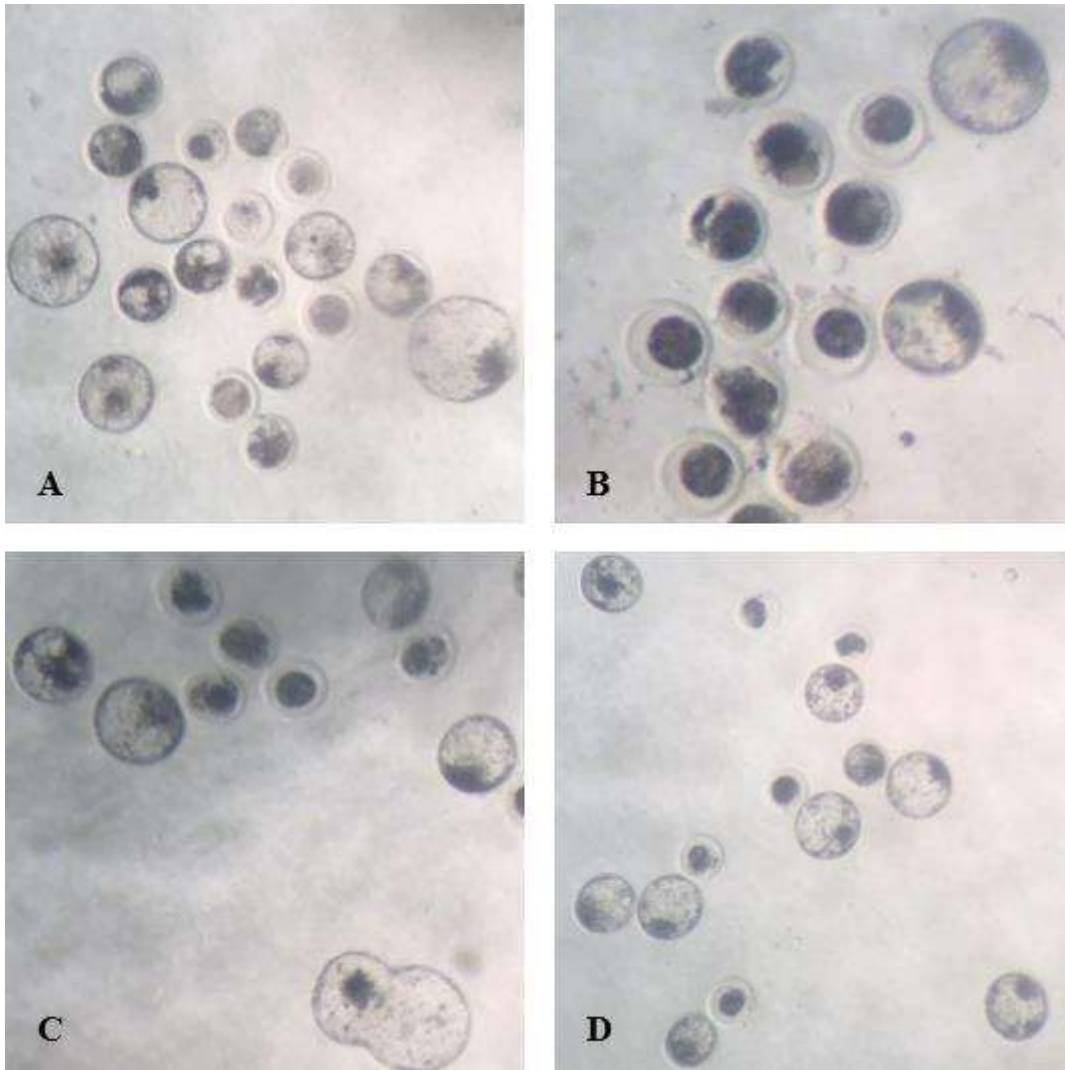


Figura 1 – Microgotas de cultivo *in vitro* de embriões bovinos mostrando variadas estruturas presentes no dia 7 pós fecundação *in vitro*. de doadora do grupo experimental de infecção durante a MIV (A), CIV (B), FIV(C) e do grupo controle (D), sendo visualizadas com auxílio de microscópio estereoscópio.

A avaliação da expressão gênica foi realizada em um total de 54 blastocistos (18 grupos de 3 blastocistos cada) que foram obtidos ao final das rotinas de produção *in vitro* de embriões de classificação padronizada grau I e grau II, considerados viáveis e aptos para transferência a fresco ou criopreservação. Os embriões foram analisados em réplicas formadas por grupos de 3 embriões cada, tendo sido avaliados quanto a expressão de 20 genes relacionados a processos biológicos de apoptose e proliferação celular, remodelamento genômico e desenvolvimento embrionário e estresse oxidativo.

O perfil de expressão gênica dos genes alvo foi avaliado pela técnica quantitativa de PCR em tempo real e encontra-se representado pelas figuras 2, 3 e 4 (expressão gênica relativa comparativa dos grupos de infecção experimental com o grupo controle) e pelas figuras 5, 6 e 7 (expressão gênica relativa comparativa entre os grupos de infecção experimental). Do total de 20 genes selecionados para avaliação, incluso o gene endógeno Glyceraldehyde 3 Phosphate Dehydrogenase (GAPDH), as amostras de embriões avaliadas não apresentaram expressão significativa dos seguintes genes: BCL-2 Apoptosis Regulator (BCL-2), DNA Methyltransferase 3^a (DNMT3A), Gap Junction Protein Beta 3 (GJB3) e Insulin Like Growth Factor (IGF1).

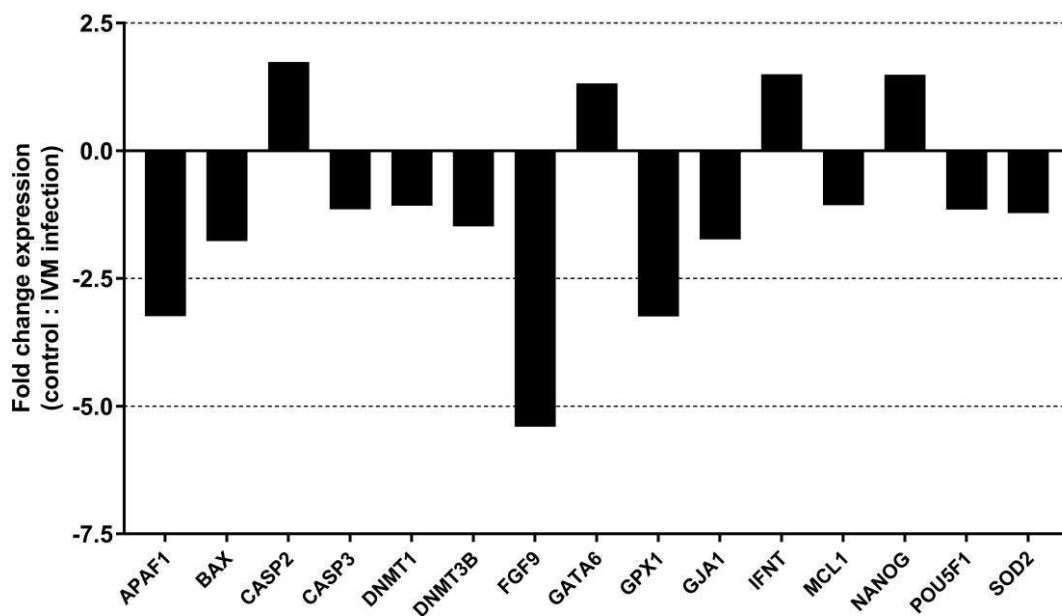


Figura 2 – Expressão gênica relativa em fold-change dos genes APAF1, BAX, CASP2, CASP3, DNMT1, DNMT3B, FGF9, GATA6, GPX1, GJA1, IFNT, MCL1, NANOG, POU5F1 e SOD2 de embriões bovinos de 7 dias de desenvolvimento de acordo com o grupo controle e de infecção artificial na MIV pelo BHV1. Valores positivos de fold-change significam maior expressão gênica daqueles oriundos do grupo controle em comparação com infecção na MIV, enquanto valores negativos representam maior expressão gênica em embriões infectados.

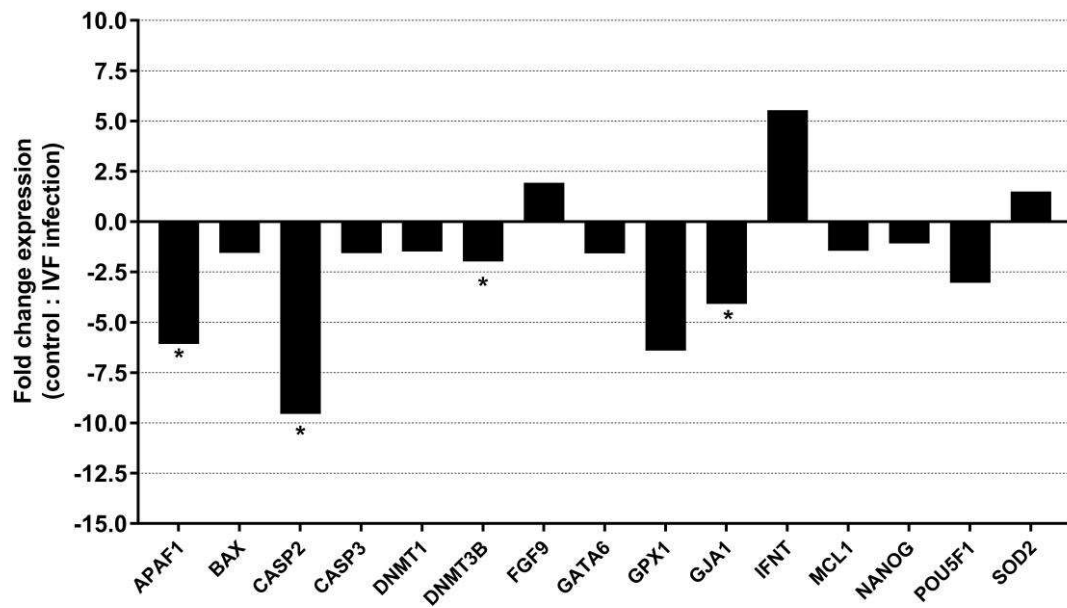


Figura 3 – Expressão gênica relativa em fold-change dos genes APAF1, BAX, CASP2, CASP3, DNMT1, DNMT3B, FGF9, GATA6, GPX1, GJA1, IFNT, MCL1, NANOG, POU5F1 e SOD2 de embriões bovinos de 7 dias de desenvolvimento de acordo com o grupo controle e de infecção artificial na FIV pelo BHV1. Valores positivos de fold-change significam maior expressão gênica daqueles oriundos do grupo controle em comparação com infecção na FIV, enquanto valores negativos representam maior expressão gênica em embriões infectados. *P < 0,05.

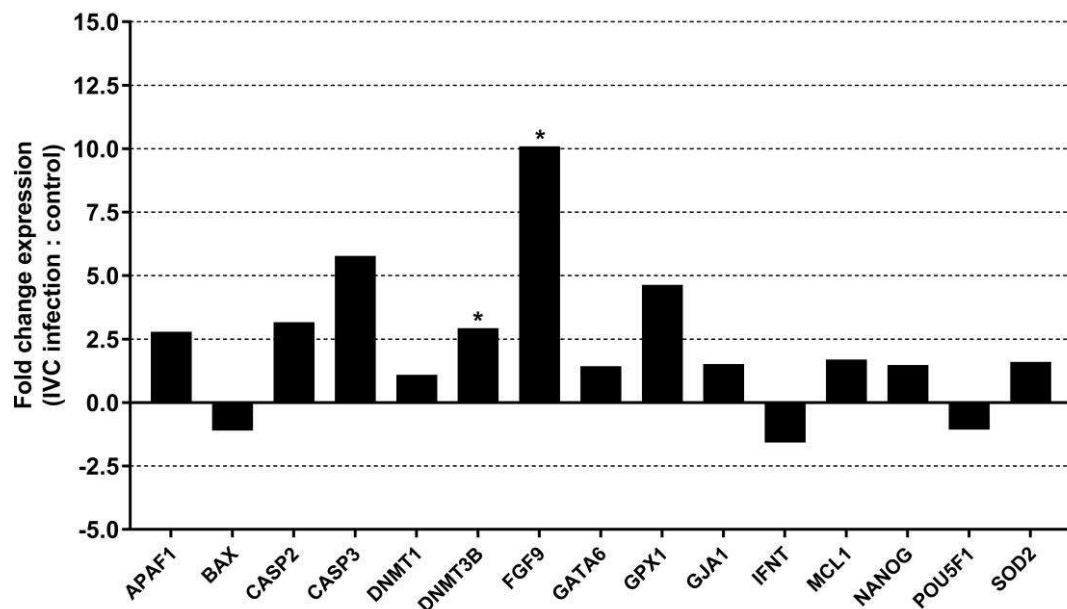


Figura 4 – Expressão gênica relativa em fold-change dos genes APAF1, BAX, CASP2, CASP3, DNMT1, DNMT3B, FGF9, GATA6, GPX1, GJA1, IFNT, MCL1, NANOG, POU5F1 e SOD2 de embriões bovinos de 7 dias de desenvolvimento de acordo com o grupo controle e de infecção artificial no CIV pelo BHV1. Valores positivos de fold-change significam maior expressão gênica daqueles oriundos do grupo de infecção no CIV em comparação com o grupo controle, enquanto valores negativos representam maior expressão gênica em embriões não infectados. *P < 0,05.

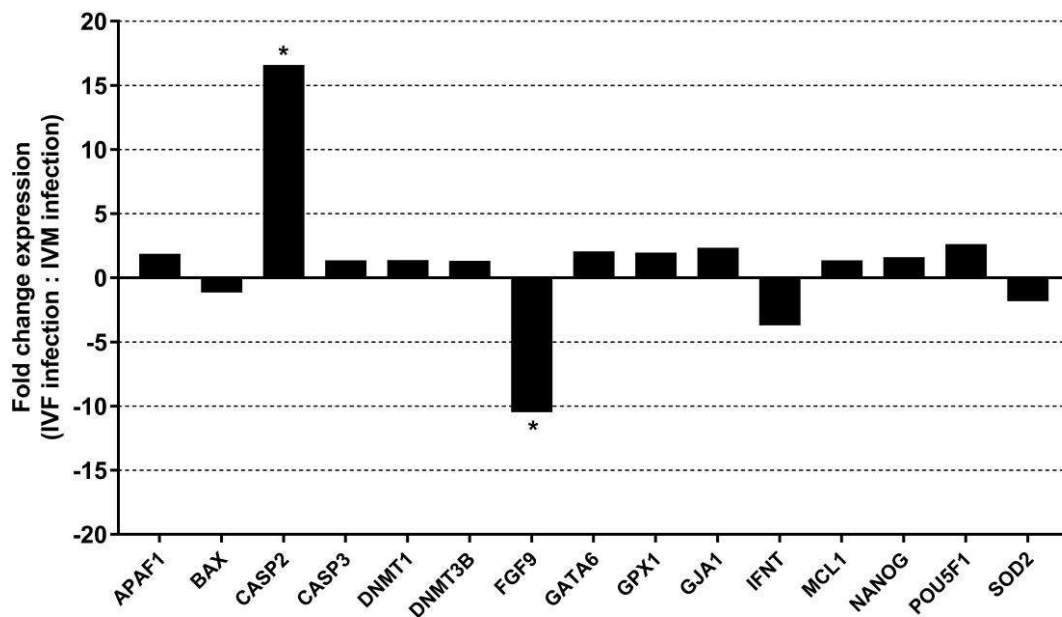


Figura 5 – Expressão gênica relativa em fold-change dos genes APAF1, BAX, CASP2, CASP3, DNMT1, DNMT3B, FGF9, GATA6, GPX1, GJA1, IFNT, MCL1, NANOG, POU5F1 e SOD2 de embriões bovinos de 7 dias de desenvolvimento de acordo com o grupo de infecção artificial na MIV e FIV pelo BHV1. Valores positivos de fold-change significam maior expressão gênica daqueles oriundos do grupo de infecção na FIV, enquanto valores negativos representam maior expressão gênica em embriões infectados na MIV. *P < 0,05.

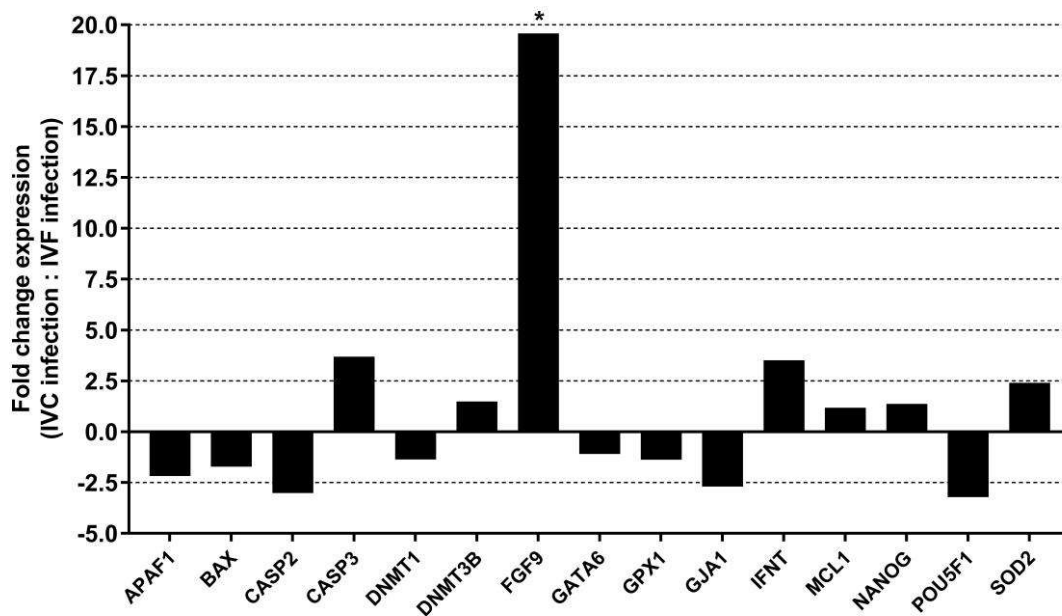


Figura 6 – Expressão gênica relativa em fold-change dos genes APAF1, BAX, CASP2, CASP3, DNMT1, DNMT3B, FGF9, GATA6, GPX1, GJA1, IFNT, MCL1, NANOG, POU5F1 e SOD2 de embriões bovinos de 7 dias de desenvolvimento de acordo com o grupo de infecção artificial na FIV e CIV pelo BHV1. Valores positivos de fold-change significam maior expressão gênica daqueles oriundos do grupo de infecção no CIV, enquanto valores negativos representam maior expressão gênica em embriões infectados na FIV. *P < 0,05.

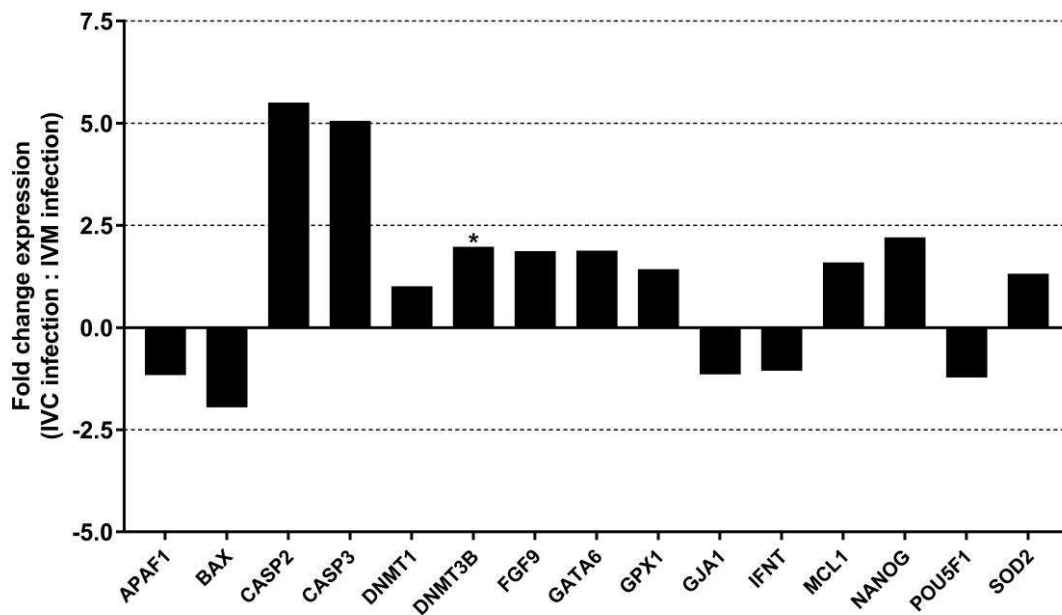


Figura 7 – Expressão gênica relativa em fold-change dos genes APAF1, BAX, CASP2, CASP3, DNMT1, DNMT3B, FGF9, GATA6, GPX1, GJA1, IFNT, MCL1, NANOG, POU5F1 e SOD2 de embriões bovinos de 7 dias de desenvolvimento de acordo com o grupo de infecção artificial no CIV e MIV pelo BHV1. Valores positivos de fold-change significam maior expressão gênica daqueles oriundos do grupo de infecção no CIV, enquanto valores negativos representam maior expressão gênica em embriões infectados

A infecção artificial pelo BHV1 ocasionou também efeitos ($P < 0,05$) no aumento da expressão dos genes APAF1 e CASP2, envolvidos no processo de apoptose celular, corroborando os achados de estudo com o BHV5 sobre a sua capacidade de modular o processo de morte celular programada em razão da sobrevivência das células e capacidade de replicação viral (SILVA-FRADE et al., 2014). Além disso, houve também efeito sobre os genes DNMT3B, GJA1 e FGF9, relacionados ao remodelamento gênico e desenvolvimento embrionário.

Para os ensaios de imunofluorescência, em nenhum dos embriões avaliados do grupo controle houve a identificação da partícula viral (Tabela 3). No entanto, naqueles grupos onde foram realizadas a infecção experimental, independentemente de qual fase foi realizada, 100% dos 45 embriões avaliados foi possível a identificação do BHV1 distribuído na zona pelúcida e no interior das células embrionárias (Figura 8).

Tabela 3 – Imunomarcação do BHV1 em embriões bovinos produzidos *in vitro* de acordo com a infecção viral experimental.

CLASSIFICAÇÃO	Embriões avaliados		Identificação do BHV1	
	N		N	%
Infecção artificial				
BHV1	45		45	100
Controle	12		-	-

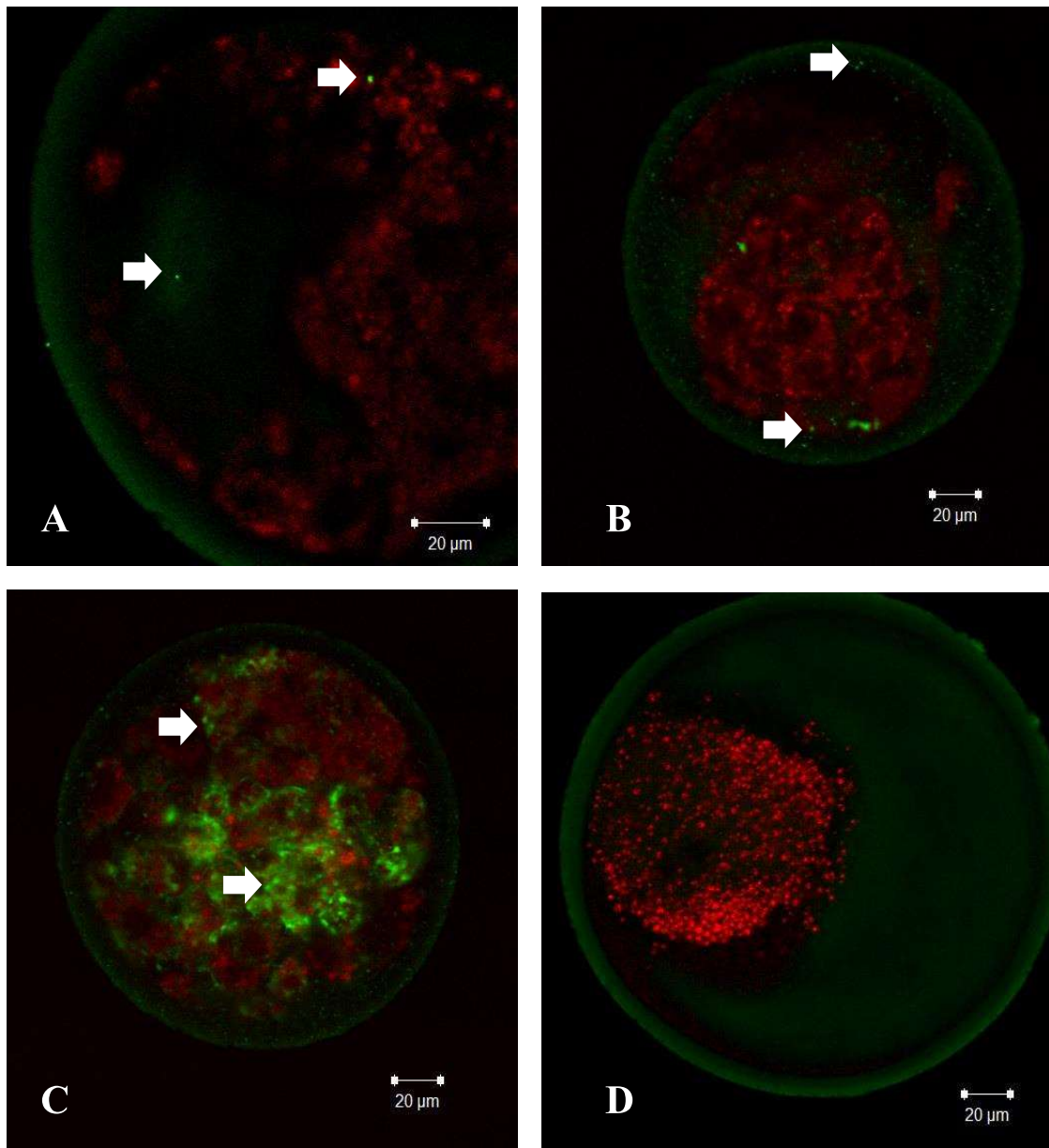


Figura 8 – Embriões bovinos infectados artificialmente pelo BHV1 durante as fases de MIV (A), FIV (B) e CIV (C). O blastocisto mostrado em D pertence ao grupo controle. As imagens A, B e C destacam a presença do BHV1 apontado pelas setas brancas, caracterizada pelos pontos de fluorescência verde presente nas células embrionárias e zona pelúcida.

7.4. CONCLUSÃO

Esse experimento revelou a ocorrência da infecção pelo BHV1 durante o cultivo *in vitro* representa o momento de maior susceptibilidade de embriões produzidos *in vitro* à ação viral. Esse cenário representaria a contaminação do embrião em ambiente tubárico ou uterino de uma fêmea infectadas. Embriões infectados artificialmente tiveram capacidade de expressão gênica alterada quanto a genes envolvidos em distintas vias de sinalização biológica relacionadas a apoptose, remodelamento gênico e desenvolvimento embrionário. Independentemente da fase na qual a infecção ocorre, o BHV1 tem efeito deletério na produção *in vitro* de embriões o que ratifica a importância do controle sanitário de doadoras e receptoras envolvidas nessa biotecnologia reprodutiva.

7.5. REFERÊNCIAS

- ALVES, S.V.P.; COSTA, E.P.; QUEIROZ-CASTRO, V.L.D.; MACHADO-NEVES, M.; GUIMARÃES, J.D.; GOMES, L.L.; AZEVEDO JUNIOR, M.A.; SILVA-JUNIOR, A. Bovine herpesvirus 1 can impact the bovine oocyte development during in vitro maturation. **Research in Veterinary Science**. v.123, p.135-140, 2019.
- BIELANSKI, A.; LUTZE-WALLACE, C.; SAPP, T.; JORDAN, L. The efficacy of trypsin for disinfection of in vitro fertilized bovine embryos exposed to bovine herpesvirus 1. **Animal Reproduction Science**, v.47, p.1-8, 1987.
- BIELANSKI, A.; DUBUC, C. In vitro fertilization and culture of ova from heifers infected with bovine herpesvirus-1 (BHV-1). **Theriogenology**, v.41, p.1211-17, 1994.
- BRUM, M. C. S.; WEIBLEN, R. Detecção, identificação e quantificação de vírus. In: FLORES, E.F. **Viologia Veterinária**, Ed. UFSM, cap.3, p.59-86. 2007.
- BOWEN, R.A.; ELDBEN, R.P.; SEIDEL, G.E. Infection of early bovine embryos with Bovine Herpes virus-1. **American Journal of Veterinary Research**, v.46, p.1095-97, 1985.
- EPIFANO O., DEAN J. Biology and structure of the zona pellucida: a target for immunocontraception. **Reproduction Fertility and Development**, v.6, p.319-330, 1994.
- FERREIRA, E.M.; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R.; MEIRELLES, F.V.; FERRIANI, R.A.; NAVARRO, P.A.A.S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical

modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v.71, p.836–848, 2009.

GILCHRIST, G.C.; TSCHERNER, A.; NALPATHAMKALAM, T.; MERICO, D.; LAMARRE, J. MicroRNA Expression during Bovine Oocyte Maturation and Fertilization. **International Journal of Molecular Sciences**, v.17, n.3, p. 396, 2016

GUERIN, B. ; LE GUIENNE, B. ; ALLIETTA, M. ; HARLAY, T. ; THIBIER, M. Effets de la contamination par le BHV-1 sur la maturation et fécondation in vitro des ovocytes des bovines. **Recueil de Médecine Veterinaire**, v.66, p.911-917, 1990.

HOUSE, J.A.; BAKER, J.A. Bovine herpesvirus IBR-IPV. The antibody virus neutralization reaction. **Cornell Vet.** v.61, p.320-335, 1971.

International Embryo Technology Society (IETS) – 2020 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. World embryo industry grows despite the Pandemic. **Embryo Technology Newsletter**, v. 39, n.4, 2021

LIVAK K.J., SCHMITTGEN T.D. Analysis of relative gene expression data using real- time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**. 2001; 25: 402–408

LOLICATO, F.; BROUWERS, J.F.; VAN DE LEST, C.H.A.; WUBBOLTS, R.; AARDEMA, H.; PRIORE, P.; ROELEN, B.A.J.; HELMS, B.; GADELLA, B.M. The Cumulus Cell Layer Protects the Bovine Maturing Oocyte Against Fatty Acid Induced Lipotoxicity. **Biology of Reproduction**, 92(1):16, p.1–16, 2014.

MACAULAY, A.D.; GILBERT, I.; SCANTLAND, S.; FOURNIER, E.; ASHKAR, F.; BASTIEN, A.; SHOJAEI SAADI, H.A.; GAGNE, D.; SIRARD, M.A.; KHANDJIAN, E.W.; RICHARD, F.J.; HYTTEL, P.; ROBERT, C. Cumulus cell transcripts transit to the bovine oocyte in preparation for maturation, **Biology of Reproduction**, 94(1):16, 2016.

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

MAHMOUDI, R.; SUBHANI, A.; PASBAKSH, P.; ABOLHASANI, F.; AMIRI, I.; SALEHNIA, M.; ETESAM, F. The Effects of cumulus cells on in vitro maturation of mouse germinal vesicle stage oocytes. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, v. 3, n.2, p.74-78. 2005.

OLIVEIRA, A.P. **Pesquisa do vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos em complexos cumulus-óócito e líquido folicular**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte ,2007.

PFAFFL MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**. 2001; 29: 2002–2007.

QUEIROZ-CASTRO, V.L.D.; COSTA, E.P.; ALVES, S.V.P.; SILVA-JUNIOR, A.; MACHADO-NEVES, M.; GUIMARÃES, J.D. Detection of bovine herpesvirus 1 in cumulus-oocyte complexes of cows. **Research in Veterinary Science**. v.120, p.54-56, 2018.

QUEIROZ-CASTRO V.L.D., DA COSTA E.P., ALVES S.V.P., MACHADO-NEVES M., GUIMARÃES J.D., GOMES L.L., DOMINGOS S.V., RIBEIRO C.G., CALDAS R.T., SILVA-JUNIOR A. (2019) Bovine herpesvirus 1 can cross the intact zona pellucida of bovine oocytes after artificial infection. **Plos One**, 14(7): e0218963.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 265p., 2002

SILVA-FRADE, C.; MARTINS JR, A.; BORSANELLI, A.C.; CARDOSO, T.C. Effects of bovine *Herpesvirus* Type 5 on development of in vitro-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v.71, p. 324-31, 2010

SILVA-FRADE C., GAMEIRO R., OKAMURA L.H., FLORES E.F., CARDOSO T.C. (2014) Programmed cell death-associated gene transcripts in bovine embryos exposed to bovine Herpesvirus type 5. **Molecular and Cellular Probes**, 28: 4.

STRINGFELLOW, D. A.; GIVENS, M. D. Manual of the International Embryo Transfer Society, 4 ed. **International Embryo Transfer Society**, Champaign, 2010.

THIBIER, M.; WRATHALL, T. **International Trade of Livestock Germplasm**. New York: Taylor & Francis. (Encyclopedia of Biotechnology in Agriculture and Food) 4p, 2012.

TONG, X.H.; XU, B.; ZHANG, Y.W.; LIU, Y.S.; MA, C.H. Research resources: Comparative microRNA profiles in human corona radiata cells and cumulus oophorus cells detected by next-generation small RNA sequencing. **PLoS ONE** 2014.

TSUBOI, T.; IMADA, T. Effect of bovine herpes virus- 1, bluetongue virus and akabane virus on the in vitro development of bovine embryos. **Veterinary Microbiology**, 51, 135-142, 1997.

UHDE, K.; VAN TOL, H.T.A.; STOUT, T.A.E.; ROELEN, B.A.J. MicroRNA Expression in Bovine Cumulus Cells in Relation to Oocyte Quality. **Non-Coding RNA**, 3, 12, 2017.

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

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

8. CONCLUSÕES GERAIS

Esse trabalho de pesquisa, dando continuidade aos trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa, trouxe importantes contribuições no estudo aprofundado acerca dos efeitos do BHV1 na produção *in vitro* de embriões. Esse experimento mostrou a ineficiência da zona pelúcida em prevenir a infecção de embriões bovinos viáveis produzidos *in vitro* tanto em condições de infecção natural quanto experimental. Além disso, esse estudo revelou de maneira inédita que animais infectados naturalmente com alto título de anticorpos e sem sintomatologia clínica podem ter seus embriões infectados pelo vírus, o que explica o baixo desempenho reprodutivo desses animais e sua importância na cadeia de transmissão viral. Isso reforça a importância do controle sanitário de todos os animais envolvidos nessa biotecnologia, uma vez que os riscos de transmissão de patógenos por meio da produção *in vitro* de embriões não pode ser negligenciada.

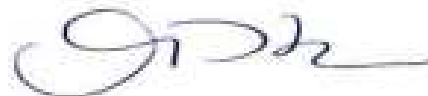
APÊNDICE I

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 38/2020, intitulado “Efeito do *bovine alphaherpesvirus 1* no desenvolvimento e expressão gênica de embriões bovinos produzidos *in vitro*”, coordenado pelo professor José Domingos Guimarães do Departamento de Veterinária, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 22/02/2021, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 38/2020, named “Effect of *bovine alphaherpesvirus 1* on the development and gene expression of bovine embryos produced *in vitro*”, is in agreement with the actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008, Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on February 22, 2021 valid for 12 months.



Prof. ^a Mariella Bontempo Duca de Freitas
Coordenadora

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV