

AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE ZIGOTOS MURINOS AO HERPESVÍRUS BOVINO-1: UM MODELO EXPERIMENTAL PARA ESTUDOS DE INTERAÇÕES EMBRIÃO-VÍRUS

M. D'Angelo, A.G. Galuppo*, R.M. Piatti, G.M. Melo, N.M.C. Zerio, R.J. Souza

Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Animal, Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: andrea_giannotti@hotmail.com

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar a sensibilidade de zigotos murinos ao herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), visando a obtenção de um modelo *in vitro* para estudos sobre a interação embrião-vírus e sobre o potencial risco de transmissão de víruses através da técnica de fertilização *in vitro* (FIV). Foram utilizados camundongos fêmeas (Balb C) entre 6-8 semanas de idade, superovuladas com os hormônios eCG e hCG, acasaladas com machos inteiros para colheita dos zigotos. Esses foram separados em 3 grupos, controle e exposto 24h a duas concentrações da suspensão viral (10 μ L e 30 μ L). Cada grupo foi dividido para análise da morfologia e para avaliação da presença de partículas virais empregando a reação em cadeia pela polimerase (PCR), após o procedimento de lavagens seqüenciais e tratamento com tripsina. De acordo com os resultados obtidos, os zigotos murinos poderão fornecer subsídios como modelo experimental para estudos sobre a biologia das interações embrião-vírus, uma vez que se apresentaram sensíveis ao BoHV-1.

PALAVRAS-CHAVE: BoHV-1, embrião, modelo experimental, PCR.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE SUSCEPTIBILITY MICE ZYGOTES TO BOVINE HERPESVIRUS 1: AN EXPERIMENTAL MODEL FOR EMBRYO-VIRUS INTERACTION STUDIES. The aim of this work was to evaluate mouse zygote susceptibility to BoHV-1, to obtain an *in vitro* model, to allow studies about embryo-virus interaction and the potential risk of the transmission of the virus through IVF techniques. Female mice (Balb C) aged 6-8 weeks were superovulated with the hormones eCG and hCG and mated for zygotes retrieval. The zygotes were divided in 3 groups: control and exposed to the virus for 24h (two different concentrations - 10 μ L and 30 μ L). Each group was divided for morphological evaluation and polymerase chain reaction (PCR) analysis was performed after sequential washing procedures with trypsin treatment. According to the results, mouse zygotes could be used as an experimental model for embryo-virus biology interaction studies.

KEY WORDS: BoHV-1, embryo, experimental model, PCR.

INTRODUÇÃO

Atualmente, a produção de embriões *in vitro* tem sido extensivamente utilizada em pesquisa e também para fins comerciais, uma vez que maximiza o potencial genético de uma mesma fêmea e oferece a possibilidade de acelerar a produção animal (KRUIP *et al.*, 2000). Entretanto, se não forem executadas corretamente, técnicas como a fertilização *in vitro* (FIV) e a criopreservação de sêmen e embriões podem facilitar a transmissão de diversas doenças infecciosas, como por exemplo, a Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), Diarréia Viral Bovina (BVD) e Brucelose (PHILPOTT, 1993). Portanto, assim como na produção *in vivo* de

embriões, nas técnicas artificiais de reprodução animal, o cuidado com a transmissão de doenças infecciosas também deve ser constante.

As fontes mais comuns de contaminação são o ambiente onde o material é manipulado, os gametas, tanto femininos quanto masculinos, o líquido folicular, o plasmaseminal, células somáticas e materiais de origem animal utilizados no preparo dos meios de cultura (STRINGFELLOW & GIVENS, 2000). Visando assegurar o controle da transmissão de patógenos através da produção e transferência de embriões *in vitro* foi desenvolvido o método das lavagens seqüenciais juntamente com o tratamento com tripsina (STRINGFELLOW, 1998). Entretanto, estudos demonstram que o herpesvírus bovino

*Bolsista CNPq-PIBIC.

tipo-1 (BoHV-1) e o vírus da estomatite vesicular têm a capacidade de se aderir à zona pelúcida. Dessa maneira, embriões infectados, mesmo após as lavagens, podem ainda apresentarem-se como vetores de transmissão (BIELANSKI *et al.*, 1996; VANROOSE *et al.*, 1996).

Considerando que o BoHV-1 está disseminado em bovinos de todas as regiões do Brasil (DEL FAVA *et al.*, 2003) e de outros países (STRINGFELLOW & GIVENS, 2000), interferindo diretamente nos índices reprodutivos dos plantéis infectados, seu controle é de extrema importância. Vários autores sugerem que o vírus pode ser encontrado em ovários, ovidutos e líquidos foliculares de animais aparentemente saudáveis (BIELANSKI & DUBUC, 1994; GUERIN *et al.*, 1989).

Sendo assim, a compreensão da natureza da interação patógeno-embrião é fundamental para a melhoria do controle das doenças e possíveis riscos de transmissão de vírus por técnicas de FIV. O objetivo desse trabalho foi avaliar a sensibilidade de zigotos murinos ao BoHV-1, visando a obtenção de um modelo *in vitro*, para estudos sobre a biologia da interação embrião-vírus e sobre o potencial risco de transmissão de viroses através da técnica de FIV.

MATERIAL E MÉTODOS

Vírus

Foi utilizado o herpesvírus bovino tipo-1 (BoHV-1), amostra Los Angeles, 9ª passagem em células MDBK, com título de $10^{7.5}$ TCID₅₀/mL, mantida em meio Eagle MEM sem soro fetal bovino a -80° C.

Coleta e infecção dos zigotos

Foram utilizados camundongos fêmeas (*Mus musculus*), púberes, nulíparas, da linhagem Balb C entre 6 a 8 semanas de idade. Estas foram superovuladas com 5U.I. de gonadotrofina coriônica equina (eCG) e após 46h com 5U.I. de gonadotrofina coriônica humana (hCG) via intraperitoneal. Foram então colocadas individualmente com machos inteiros para acasalamento. Dezoito horas após a aplicação do hCG foi realizada a colheita dos zigotos (embriões de 1 dia) com zona pelúcida íntegra. Os zigotos foram lavados por 30 segundos em solução de pronase a 0,5% para remoção das células do cúmulo. Em seguida foram lavados novamente por 3 vezes em solução salina tamponada estéril (PBS), acrescida de 1% de soro fetal bovino (SFB) para inativação da enzima. Os zigotos foram separados em: grupo controle (não exposto ao vírus), e exposto 24h à duas concentrações diferentes da suspensão viral (10 µL e 30 µL). Cada grupo foi dividido para análise da morfologia e para avaliação da presença de partículas virais pela reação

em cadeia pela polimerase (PCR). Os zigotos foram mantidos em meio TCM199 suplementado com 10% SFB, 0,2% de piruvato de sódio e bicarbonato em estufa 5% de CO₂, 90% de umidade à 37° C.

Análise da morfologia

Os zigotos foram analisados quanto à presença de alterações morfológicas nos blastômeros e zona pelúcida, após 24, 48, 72 e 96h de incubação com o BoHV-1. A observação foi feita com o auxílio de um microscópio óptico invertido (100x).

Lavagem seqüencial associada ao tratamento com tripsina

Os dois grupos foram submetidos, separadamente, à lavagem seqüencial associada ao tratamento com tripsina padronizado pela *International Embryo Transfer Society* (STRINGFELLOW, 1998). Esse método consiste em 5 lavagens dos embriões em PBS, duas lavagens com tripsina 0,25% em solução de citrato de sódio, por 90seg e mais 5 lavagens em meio TCM199 acrescido de 10% de SBF, 0,2% de piruvato de sódio, bicarbonato e 100 µg/mL de gentamicina. No total, os zigotos foram lavados em 12 gotas de 100 µL com troca de ponteira a cada passagem, sendo que o volume transportado de uma gota para outra não excedeu 10 µL.

Extração do DNA

Para a extração do DNA, 50µL da amostra contendo os zigotos foram homogeneizados com 400 µL de TE (10 mM Tris HCl; 1 mM EDTA pH 8,0) e centrifugados a 13.000 xg por 15min. O *pellet* foi ressuspenso em 300 µL de tampão de lise (195 µL de água milliQ, 60µL de TNE [500 mM NaCl, 50 mM Tris HCl, 125 mM EDTA pH 8,0], 30µL de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e 0,2 mg de proteinase K/mL) e incubado em banho-maria por 60min a 56° C. À suspensão foram acrescentados 150µL de fenol e, após agitação, a mistura foi centrifugada por 5min a 13.000 xg. Da fase aquosa foram colhidos 300 µL, aos quais foram adicionados 100µL de uma solução de fenol clorofórmio álcool isoamílico (25:24:1) e, após agitação, a mistura foi centrifugada a 13.000 xg por 5min. A seguir, 200 µL da fase aquosa foi precipitada com 40 µL de acetato de sódio 2 M e 480µL de etanol absoluto a -20° C por 12h. Seguindo de centrifugação a 13.000 xg por 10min, o DNA foi ressuspenso em 40 µL de TE e estocado a temperatura de -20° C.

Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

A reação da PCR foi realizada em um volume de 50 µL, contendo 10µL de DNA, 10 mM de Tris HCl pH

9,0; 1,5 mM de $MgCl_2$, 200 μM de cada nucleotídeo (dNTPs), 5% de glicerol, 2,5U da enzima *Taq* DNA polimerase e 50 pmol de cada um dos *primers sense* e *antisense* descritos por VILCEK *et al.*(1994), respectivamente *primer 1* (P1: 5' CAC GGA CCT GGT GGA CAA GGA G 3') e *primer 2* (P2: CTA CCG TCA CGT GCT GTG TAC G 3') que amplificam fragmento de 468 pares de bases (pb) do gene gB do BoHV-1. As amostras foram inicialmente desnaturadas a 95° C por 5min. A reação de amplificação foi feita com 35 ciclos repetidos de desnaturação (95° C por min), hibridização (57° C por 1min) e extensão (72° C por 1min30seg) e uma extensão final de 10min a 72° C. Como controle negativo foi utilizada a mistura dos reagentes e água milliQ.

Nested-PCR (nPCR)

Para o nPCR foram utilizados os *primers 3* (P3: 5' CCT CTG TGA ACT GCA TCG TGG A 3') e *4* (P4: 5' TAG CCC TCG ATC TGC TGG AAG C 3'), que amplificam o fragmento interno de 175 pb da gB do BoHV-1 (D'ANGELO, 1998).

Detecção dos produtos amplificados

A detecção do produto amplificado foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE (Tris; Ácido Bórico, EDTA 0,5 M pH 8,0). O gel foi corado com brometo de etídio (5 $\mu g/mL$), visualizado em transiluminador U.V. e fotografado em câmera digital (Kodak Digital Science DC-40 Camera).

RESULTADOS

Os zigotos pertencentes ao grupo controle não apresentaram alterações morfológicas, seguindo normalmente seu desenvolvimento (Fig. 1A). Os zigotos infectados apresentaram alterações morfológicas visíveis ao microscópio óptico invertido (100x) após 72h de infecção. Foi observado bloqueio de clivagem no estágio de 2 células, com citoplasma granuloso e aumento de espaço periplasmático indicando contração citoplasmática (Fig. 1B). Após 96h de infecção todos os zigotos apresentavam-se com aspecto degenerativo.

Os zigotos contaminados com as amostras quando submetidos a reação da PCR, baseada em uma sequência conservada do gene que codifica a gB do BoHV-1, não foram capazes de amplificar o fragmento de 468 pb. Quando estas amostras foram submetidas a nPCR foi detectado o gene da gB do BoHV-1 onde foi observado um fragmento de 175 pb que corresponde ao gene gB do BoHV-1 (Fig. 2).

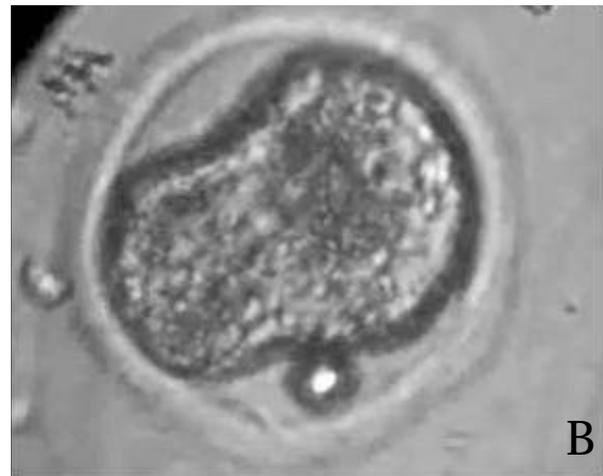
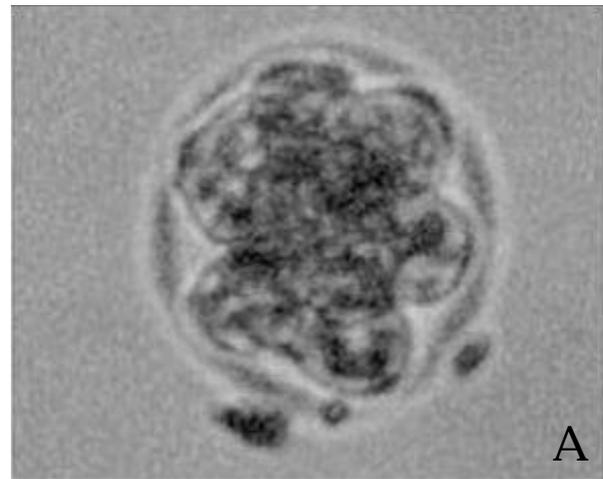


Fig. 1 - Embriões murinos do grupo controle (A) (100x) e após 72h de infecção com o BoHV-1 (B) (100x; 10x zoom).

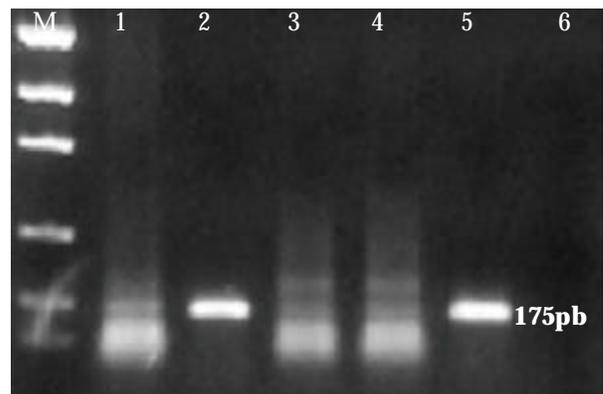


Fig. 2 - Detecção de BoHV-1 em zigotos murinos pela técnica da n-PCR. M-padrão de peso molecular (100-2000 bp). Coluna 1, zigoto controle. Coluna 2, zigoto exposto ao BoHV-1 e submetido à lavagem sequencial com tripsina. Coluna 3, última gota controle. Coluna 4, última gota experimental. Coluna 5, controle positivo do BoHV-1. Coluna 6, controle negativo.

DISCUSSÃO

Segundo BIELANSKI & DUBUC (1994), a análise quanto à presença do BoHV-1 em complexos oócitos-cumulus, líquido folicular e células da granulosa, do corpo lúteo e da tuba de animais portadores de infecção aguda apresentou-se positiva ao vírus. O BoHV-1 também foi isolado de embriões produzidos *in vitro* a partir de gametas provenientes de animais sabidamente infectados (BIELANSKI *et al.*, 1998). SINGH *et al.* (1983) demonstraram que esse vírus pode ser encontrado no líquido de lavagem de embriões provenientes de doadoras infectadas e que não é facilmente eliminado da zona pelúcida de blastocistos intactos com o uso das lavagens sem tripsina. Entretanto, nesse mesmo trabalho, quando o tratamento com tripsina foi incorporado, todas as partículas virais foram eliminadas ou inativadas. O mesmo resultado foi encontrado por STRINGFELLOW *et al.* (1990), que também relataram a eficiência das lavagens com tripsina para o BoHV-4.

Entretanto, esses dados são controversos, pois experimentos visando avaliar a eficiência do procedimento de lavagem de embriões e do tratamento com tripsina apresentaram resultados contrários. Foram realizados testes com oócitos e embriões infectados experimentalmente e submetidos aos procedimentos de lavagem com e sem tripsina. Os patógenos estudados foram o vírus da língua azul, BoHV-1, BVDV, vírus da febre aftosa e *Leptospira* sp. Ao final foi verificado que os tratamentos não foram eficientes em remover nenhum dos patógenos completamente (STRINGFELLOW & GIVENS, 2000). Portanto, considerando esses resultados, surge a questão sobre como funcionaria o processo de interação dos patógenos com os gametas e embriões, para que dessa forma possa se desenvolver um método mais eficiente para o controle da transmissão de doenças infecciosas. Convencionalmente, acredita-se que a infecção de embriões ocorra apenas após penetração do agente através de uma falha na zona pelúcida, ou após o *hatching*, entretanto no caso de patógenos de tamanho extremamente reduzido, como os vírus, ou ativamente invasivos, como algumas bactérias, a zona pelúcida, mesmo estando intacta, não é uma barreira intransponível (STRINGFELLOW & GIVENS, 2000).

Os resultados do presente trabalho mostraram que os zigotos murinos são susceptíveis ao BoHV-1, apresentando alterações morfológicas pós-infecção, como o bloqueio de clivagem, citoplasma granuloso e aumento de espaço periplasmático (Figs. 1A e 1B). As amostras submetidas ao n-PCR demonstraram que mesmo após as lavagens e o tratamento com tripsina, os zigotos infectados ainda permaneciam com partículas virais, aderidas à zona pelúcida ou no interior do embrião (Fig. 2). GALUPPO & D'ANGELO (1999) verificaram

que as lavagens seqüenciais não foram eficientes em remover partículas do BoHV-1 de embriões de camundongo experimentalmente infectados. Esses autores observaram a presença de efeito citopático, característico do BoHV-1, em células MDBK após inoculação dessas células com os embriões infectados após as lavagens, comprovando, portanto a presença de partículas com capacidade infectante. No caso do vírus estar presente no interior do embrião, as lavagens não teriam função, uma vez que ele estaria protegido no interior dos blastômeros. Em trabalho realizado por D'ANGELO (1998) foi verificada a presença de partículas semelhantes aos capsídeos virais, com auxílio de microscopia eletrônica de transmissão, no interior de oócitos experimentalmente infectados, após as lavagens e o tratamento com tripsina.

Mesmo considerando a capacidade de penetração do BoHV-1 nos blastômeros, não se deve descartar o uso das lavagens seqüenciais e do tratamento com tripsina, pois já está comprovado que o seu uso regular limita a possibilidade de transmissão de patógenos (STRINGFELLOW & GIVENS, 2000). Deve-se lembrar também que, de acordo com nossos resultados, os zigotos murinos poderão fornecer subsídios como modelo experimental para estudos sobre a biologia das interações embrião-vírus e o potencial risco de transmissão de doenças infecciosas através da técnica de FIV.

AGRADECIMENTOS

CNPq e CULTILAB/EMBRIOCARE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIELANSKI, A.; LUTZE-WALACE, C.; SAPP, T.; JORDAN, L. The efficacy of trypsin for disinfection of *in vitro* fertilized bovine embryos exposed to bovine herpesvirus 1. *Animal Reproduction Science*, v.47, p.1-8, 1996.
- BIELANSKI, A.; NORMANDO, S.; LUTZE-WALACE, C.; SAPP, T.; GARDIOLI, P.; LUINI, M. Treatment of oocytes and *in vitro* fertilized embryos with monoclonal antibodies and guinea pig complement for neutralization of contaminating bovine herpes-virus. *Reproduction Domestic Animals*, v.33, p.89-92, 1998.
- BIELANSKI, A. & DUBUC, C. *In vitro* fertilization and culture of OVA from heifers infected with bovine herpesvirus-1 (BOHV-1). *Theriogenology*, v.41, p.1211-1217, 1994.
- D'ANGELO, M. *Interação do herpesvirus bovino tipo 1 (BOHV-1) com oócitos bovinos maturados in vitro*. 51p. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo: 1998.
- DEL FAVA, C.; ARCARO, J.R.P.; POZZI, C.R.; ARCARO JUNIOR, I.; FAGUNDES, H.; PITUCO, E.M.; DE STEFANO, E.; OKUDA, L.H.; VASCONCELLOS, S.A. Manejo sanitário para o controle de doenças da reprodução em um sistema leiteiro de

- produção semi-intensivo. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, [on-line], v.70, n.1, p.25-33, 2003. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/V70_1/delfava.pdf>. Acesso: 6 jun. 2005.
- GALUPPO, A.G. & D'ANGELO, M. Sensibilidade de embriões murinos ao vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, v.27, n.1, p.236, 1999. Trabalho apresentado na REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, 14., 1999, Campos do Jordão. *Resumos*.
- GUERIN, B.; LE GUIENNE, B.; ST. CHAFFAUX, S.; HARLAY, T.; ALLIETTA, M.; THIBIER, M. Contamination des ovocytes et des embryos fécondes *in vitro* apres infection experimentale de vaches donneuses par le virus herpes bovin de type 1. *Recueil de Medicine Veterinaire*, v.165, n.10, p.827-833, 1989.
- KRUIP, T.A.M.; BEVERS, M.M.; KEMP, B. Environment of oocyte and embryo determines health of IVP offspring. *Theriogenology*, v.53, p.611-618, 2000.
- PHILPOTT, M. The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. *Brazilian Veterinary Journal*, v.149, p.339-369, 1993.
- SINGH, E.L.; HARE, W.C.D.; THOMAS, F.C.; BIELANSKI, A. Embryo transfer as a means of controlling transmission of virus infectious IV Non transmission of IBR/IPV virus from donors shedding virus. *Theriogenology*, v.20, p.169-176, 1983.
- STRINGFELLOW, D.A. Recomendações para o manuseio sanitário de embriões obtidos *in vivo*. In: STRINGFELLOW, D.A. & SEIDEL, S.M. (Eds.). *Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões*. 3.ed. Jaboticabal: SBTE, 1998. p. 83-96.
- STRINGFELLOW, D.A.; LARSEMAN, L.H.; NASTIK, B.; GALIK, P.K. Trypsin treatment of bovine embryos after *in vitro* exposure to infectious bovine rhinotracheitis virus or bovine herpesvirus-4. *Theriogenology*, v.34, p.427-434, 1990.
- STRINGFELLOW, D.A. & GIVENS, M.D. Infectious agents in bovine embryo production: hazards and solutions. *Theriogenology*, v.53, p.85-94, 2000.
- VANROOSE, G.; NAUWYNCK, H.; VAN SOON, A.; VANOPDENBOSCH, E.; KRUIF, A. DE Replication of bovine herpesvirus-1 in *in vitro*-produced bovine embryos at different stages of development. *Theriogenology*, v.45, p.235, 1996.
- VILCEK, S.; NETTLETON, P.F.; HERRING, J.A.; HERRING, A.J. Rapid detection of bovine herpesvirus-1 (BOHV-1) using the polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*, v.42, p.53-64, 1994.

Recebido em 7/6/05

Aceito em 30/6/05