

INSTITUTO BIOLÓGICO

PÓS-GRADUAÇÃO

Avaliação da citotoxicidade e interferência da *Ateleia glazioviana* na interação do Herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1) com oócitos bovinos maturados *in vitro*

DANIELLE LABADESSA PAVÃO

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade Animal, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio

Orientador: Dra. Magali D'Angelo

São Paulo

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Núcleo de Informação e Documentação - Biblioteca
Instituto Biológico
Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo

Pavão, Danielle Labadessa

Avaliação da citotoxicidade e interferência da *Ateleia glazioviana* na interação do herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1) com oócitos bovinos maturados *in vitro*. / Danielle Labadessa Pavão. – São Paulo, 2009.

Dissertação (Mestrado) Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.
Área de concentração: Sanidade Animal, Segurança Alimentar e o Ambiente.

Linha de pesquisa: Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal.

Orientador: Magali D'Angelo

Versão do título para o inglês: Assesment of cytotoxicity and interference of *Ateleia glazioviana* in bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) interaction with *in vitro* maturated bovine oocytes.

1. *Ateleia glazioviana* 2. Herpesvirus bovino tipo 1(BoHV-1) 3. Oócitos bovinos 4. Maturação *in vitro* 5. Citotoxicidade I.D'Angelo, Magali II. Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação III. Título



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO
Pós-Graduação
Av. Cons. Rodrigues Alves 1252
CEP 04014-002 - São Paulo – SP
pg@biologico.sp.gov.br



FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do candidato: Danielle Labadessa Pavão

Título: Avaliação da citotoxicidade e interferência da *Ateleia glazioviana* na interação do Herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1) com oócitos bovinos maturados *in vitro*

Orientador(a): Profa. Dra. Magali D'Angelo

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade Animal, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio

Aprovada em:

Banca Examinadora

Assinatura:

Prof. Dra.: **Magali D'Angelo**

Instituição: Instituto Biológico

Assinatura:

Prof. Dra.: **Rosa Maria Piatti**

Instituição: Instituto Biológico

Assinatura:

Prof. Dr.: **Nelcio Antonio Tonizza de Carvalho**

Instituição: Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios/ Registro -SP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Sérgio e Dulce, por mostrarem-me que a Educação não tem tempo e nem espaço, que se faz no fluir da vida, à minha irmã Ana Carolina, por ter sempre acreditado em meus sonhos, e à minha avó Dindinha, pelo seu apoio incondicional... Eternos exemplos de caráter, integridade, dignidade e amor.

AGRADECIMENTOS

Em especial à Dra. Magali D'Angelo, mais que orientadora, uma amiga, que me ensinou através da palavra e do exemplo que a busca do conhecimento deve ser contínua. Minha imensa gratidão pelo carinho, dedicação e disponibilidade irrestrita! Obrigada pela alegria de trabalharmos juntas!

Ao Instituto Biológico, e ao seu diretor Dr. Antonio Batista Filho, por ter fornecido as condições necessárias para a realização desse trabalho;

À Dra. Mitsue Haraguchi, pesquisadora do Laboratório de Química e Farmacologia de Produtos Naturais do Instituto Biológico, pelo auxílio prestado à execução desse trabalho;

À Dra. Edviges Maristela Pituco, pesquisadora do Laboratório de Virose de Bovídeos do Centro de Sanidade Animal do Instituto Biológico, por toda a colaboração durante o desenvolvimento desse trabalho;

Ao Dr. Ricardo Harakava, pesquisador do Laboratório de Bioquímica Fitopatológica, pelo apoio na elaboração da técnica do COMETA;

Aos pesquisadores Dr. Fábio Gregori e Dra. Vera Letticie, pesquisadores do Laboratório de Doenças de Suínos do Instituto Biológico, por todo o auxílio prestado à execução desse trabalho;

À VITROCELL/EMBRIOLIFE, principalmente ao Dr. Acassio e Cláudio, por acreditarem em nossa equipe e colaborarem com grande parte do material utilizado nesse trabalho;

Ao proprietário e funcionários do Frigorífico Mantiqueira, pelo carinho, atenção e imensa colaboração;

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

À Mari, Carol, Edu e Leandro, pela amizade, dedicação e por estarem sempre presentes. Com vocês aprendi a importância de se trabalhar em equipe!

Aos ex-estagiários Douglas e Luciano, pela colaboração e por estarem sempre prontos a ajudar;

Aos meus queridos amigos Lucius (jamais esquecerei!), Ju, Fefa's, Alines, Cynthia, Flan, Ferdiga e Clarice, pelas várias risadas e ótimos momentos de descontração;

À minha querida amiga Andrea, por todos os momentos que passamos juntas, por sempre estar disposta a me ajudar em qualquer situação, e principalmente pelo seu apoio que me conforta e me deixa mais forte para superar meus desafios... Mesmo longe, nunca deixou de estar perto!

À Christiane, amiga para todas as horas, pelas palavras amigas e conselhos que muito me ajudaram;

À minha irmã (Carol) e minhas amigas vizinhas (Lica, Má, Giu, Carol e Mi), por estarem sempre prontas a aconselhar, consolar e ajudar em todos os momentos;

À Fernanda, secretária da pós-graduação, por toda a gentileza e boa vontade em atender meus inúmeros pedidos;

À todos aqueles que sempre estiveram por perto, me apoiando e torcendo por mim;

E finalmente a Deus, por sempre me proteger, me iluminar e me guiar...

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| RESUMO | viii |
| ABSTRACT | x |
| LISTA DE FIGURAS | xii |
| LISTA DE TABELAS | xiii |
| LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS | xiv |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. OBJETIVOS | 3 |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA | 4 |
| 3.1. Histórico da Produção de embriões <i>in vitro</i> | 5 |
| 3.2. Aspectos gerais da maturação oocitária | 6 |
| 3.3. Risco de transmissão de doenças pelas técnicas de reprodução <i>in vitro</i> | 9 |
| 3.4. Aspectos gerais do Herpesvirus bovino tipo 1..... | 10 |
| 3.5. Aspectos gerais da <i>Ateleia glazioviana</i> | 14 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 16 |
| 4.1. Vírus..... | 16 |
| 4.2. Planta..... | 16 |
| 4.3. Colheita e maturação <i>in vitro</i> dos oócitos | 16 |
| 4.4. Reação em Cadeia pela Polimerase..... | 20 |
| 4.5. Exposição dos oócitos bovinos ao extrato e ao vírus durante o período de maturação <i>in vitro</i> | 20 |
| 4.6. Avaliação morfológica dos oócitos por microscopia óptica..... | 20 |
| 4.7. Avaliação da taxa de maturação dos oócitos | 21 |
| 4.8. Avaliação da ação clastogênica em oócitos | 21 |
| 4.8.1. Análise das lâminas..... | 22 |
| 4.9. Análise estatística..... | 23 |
| 5. RESULTADOS | 24 |
| 5.1. Avaliação morfológica dos oócitos por microscopia óptica | 24 |
| 5.2. Avaliação da taxa de maturação dos oócitos | 27 |
| 5.3. Avaliação da ação clastogênica em oócitos..... | 28 |
| 6. DISCUSSÃO | 31 |
| 7. CONCLUSÕES | 37 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 38 |

RESUMO

PAVÃO, D.L. **AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E INTERFERÊNCIA DA *Ateleia glazioviana* NA INTERAÇÃO DO HERPESVIRUS BOVINO TIPO 1 (BoHV-1) COM OÓCITOS BOVINOS MATURADOS IN VITRO.** 2009. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

A produção de embriões *in vitro* (PIV), além de uma importante biotécnica, constitui-se como uma ferramenta valiosa para estudos de interações de gametas e/ou embriões com patógenos e/ou xenobióticos e, com isso, torna-se cada vez mais um excelente modelo não somente para averiguações sobre aspectos sanitários, como também relacionados a processos tóxicos. Esse estudo teve como objetivo avaliar o efeito da citotoxicidade do extrato aquoso de *Ateleia glazioviana* e sua interferência sobre a interação com o Herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1) em oócitos bovinos durante o período de maturação *in vitro* (MIV). Oócitos bovinos foram obtidos de ovários de abatedouro e, divididos em grupo controle (G-C), infectado com BoHV-1 (G-H), expostos ao extrato de *A. glazioviana* (G-A) e, expostos simultaneamente ao vírus e ao extrato (G-HA). Oócitos pertencentes ao G-C apresentaram alta expansão das células do cumulus e ooplasma com aspecto uniforme; nos pertencentes ao G-H observamos expansão uniforme, porém, moderada das células do cumulus e retração do ooplasma; o grupo G-A apresentou expansão baixa e irregular com degeneração das células do cumulus e ooplasma retraído com aspecto granuloso; já oócitos pertencentes ao G-HA, apresentaram degeneração das células do cumulus, ooplasma retraído e granuloso. Foram observadas taxas de maturação de 81.3% no G-C, 31.0% no G-H, 5.7% no G-A e 1.4% para o G-HA. Quanto a análise da ação clastogênica, oócitos do grupo *in natura*, apresentaram 41.9% de cometas classe 0 (zero), 34.8% classe I, 12.4% classe II, 7.1% classe III e 3.8% classe IV. O G-C apresentou 6,1% de cometas classe 0, 47.8% classe I, 31.3% classe II, 11.0% classe III e 3.8% classe IV. Oócitos pertencentes ao G-A apresentaram 0.5% de cometas classe 0, 19.8% classe I, 28.1% classe II, 34.1% classe III e 17.5% classe IV. No G-H encontrou-se 4.4% de cometas classe 0, 61.2% classe I, 26.6% classe II, 4.8% classe III e 3.0% classe IV. Oócitos do G-HA apresentaram 3.9% de

cometas classe 0, 26.2% classe I, e quantidades semelhantes de cometas dos níveis II (23.8%), III (22.8%) e IV (23.3%). Esses resultados evidenciam a ação citotóxica da *A. glazioviana* em oócitos. A exposição simultânea de extrato e vírus exacerba o efeito do vírus, sugerindo então um aumento da interação do patógeno com a célula gamética.

Palavras-chave: *Ateleia glazioviana*, BoHV-1, oócitos bovinos, maturação *in vitro*, citotoxicidade

ABSTRACT

PAVÃO, D.L. **ASSESSMENT OF CYTOTOXICITY AND INTERFERENCE OF *Ateleia glazioviana* IN BOVINE HERPESVIRUS TYPE 1 (BoHV-1) INTERACTION WITH *IN VITRO* MATURATED BOVINE OOCYTES.** 2009. Dissertation (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

The *in vitro* embryo production (IVP) is an important biotechnology and a valuable tool for studies of gametes and/or embryos interactions with pathogens and/or xenobiotics. Because of that is considerate an excellent model not only for inquiries on health aspects, but also related to toxic processes. The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity effect of *A. glazioviana* aqueous extract and its interference of BoHV-1 interaction with bovine oocytes during the *in vitro* maturation period. Bovine oocytes were obtained from ovaries of slaughterhouse's animals and were divided into control group (G-C), infected with BoHV-1 (G-H), exposed to *A. glazioviana* extract (G-A), and simultaneously exposed to the virus and to the extract (G-HA). Oocyte belonging to G-C showed cumulus cells expansion and uniform ooplasm; the ones belonging to the G-H presented uniform, but moderate expansion from the cumulus cells and retraction of ooplasm; the G-A showed partial inhibition on cumulus cells growth, and ooplasm with granular and compacted aspect; indeed, oocytes exposed to the G-HA presented a degeneration of the cumulus cells, compacted and granular ooplasm. Were observed maturation rates of 81.3% in G-C, 31.0% in G-H, 5.7% in G-A, and 1.4% in the G-HA. As the analysis of the clastogênica action, the *in natura* group showed 41.9% class 0 comets, 34.8% class I, 12.4% class II, 7.1% class III and 3.8% class IV. The G-C had 6.1% class 0 comets, 47.8% class I, 31.3% class II, 11.0% Class III and Class IV 3.8%. Oocytes belonging to G-A showed 0.5% class 0 comets, 19.8% class I, 28,1% class II, 34.1% class III and 17.5% class IV. The G-H presented 4.4% class 0 comets, 61.2% class I, 26.6% class II, 4.8% class III and 30% class IV. Oocytes belonging to G-HA had 3.9% class 0 comets, 26.2% class I, and similar quantities of class II (23.8%), III (22.8%) and IV (23.3%). These results demonstrate the cytotoxic activity of *A. glazioviana* in oocytes. The simultaneous

exposure to extract and virus exacerbates the effect of the virus, then suggesting an increase in interaction of pathogen with gametic cells.

Key words: *Ateleia glazioviana*, BoHV-1, bovine oocytes, *in vitro* maturation, cytotoxicity

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 1 | Colheita de ovários no abatedouro | 18 |
| Figura 2 | Punção dos folículos ovarianos | 18 |
| Figura 3 | Tubos cônicos com líquido folicular (A) e pellet contendo os oócitos | 19 |
| Figura 4 | Oócito imaturo. Visualização em estereomicroscópio (aumento 100X) | 19 |
| Figura 5 | Categoria de dano (0 a 4) de acordo com a fluorescência, tamanho da cauda e diâmetro da cabeça do COMETA | 23 |
| Figura 6 | Microscopia de luz de oócitos controle após o período de maturação <i>in vitro</i> . A: expansão das células do cumulus (aumento 200X); B: aspecto uniforme do ooplasma e coloração castanha (aumento 200X) | 25 |
| Figura 7 | Microscopia de luz de oócitos expostos ao BoHV-1 após o período de maturação <i>in vitro</i> . A: expansão moderada das células do cumulus e aspecto arredondado (aumento 200X) ; B: retração do ooplasma (aumento 200X) | 25 |
| Figura 8 | Microscopia de luz de oócitos expostos ao extrato de <i>A. glazioviana</i> após o período de maturação <i>in vitro</i> . A e B: inibição parcial de crescimento das células do cumulus, apresentando aspecto arredondado (aumento 200X); C: retração do ooplasma com aspecto granuloso, coloração castanho escuro (aumento 200X) | 26 |
| Figura 9 | Microscopia de luz de oócitos expostos simultaneamente ao extrato de <i>A. glazioviana</i> e ao BoHV-1 após o período de maturação <i>in vitro</i> . A e B: inibição parcial ou total de crescimento das células do cumulus, apresentando aspecto grumoso e arredondado (aumento 200X); C: retração do ooplasma com aspecto granuloso, coloração castanho escuro (aumento 200X) | 26 |
| Figura 10 | As 5 classes de cometas observadas sob microscópio de fluorescência (aumento 200X) | 29 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------------|---|----|
| Tabela 1 | Percentual de oócitos que apresentaram corpúsculo polar para os grupos avaliados. São Paulo-SP, 2008. | 27 |
| Tabela 2 | Percentual de cometas analisados de acordo com o grau de desintegração do núcleo dos oócitos nos diferentes grupos. São Paulo-SP, 2008. | 30 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------|--|
| BoHV-1 | Herpesvirus bovino tipo 1 |
| BOEC | Células epiteliais de oviduto bovino |
| BVD | Diarréia viral bovina |
| CIV | Cultivo <i>in vitro</i> |
| CO₂ | Dióxido de carbono |
| COCs | Complexos oócitos cumulus |
| CP | Corpúsculo polar |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| ELISA | Ensaio imunoenzimático |
| FF | Fluido folicular |
| FIV | Fecundação <i>in vitro</i> |
| FSH | Hormônio folículo estimulante |
| IA | Inseminação Artificial |
| IBR | Rinotraqueíte infecciosa bovina |
| IETS | Sociedade Internacional de Transferência de Embriões |
| IPB | Balanopostite pustular infecciosa |
| IPV | Vulvovaginite pustular infecciosa |
| kpb | Kilo pares de bases |
| LH | Hormônio luteinizante |
| MDBK | Linhagem Madin Darby de células de rim bovino |
| MEM | Meio mínimo essencial (Eagle) |
| MIV | Maturação <i>in vitro</i> |
| N₂ | Nitrogênio |
| OPU | <i>Ovum Pick Up</i> |
| PBS | Salina tamponada fosfatada |
| PCR | Reação em cadeia pela polimerase |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| PIV | Produção de embriões <i>in vitro</i> |
| SFB | Soro fetal bovino |
| SN | Soro neutralização |
| TCID | Dose infectante 50% em cultura de tecido |
| TCM 199 | Meio de cultivo celular 199 |
| TE | Transferência de embriões |
| V | Volt |
| ZP | Zona Pelúcida |

| | |
|-----------|-------------------------------|
| mÅ | Mili amperes |
| mM | Milimolar (10^{-3} molar) |
| nm | Nanômetro (10^{-9} metro) |
| µg | Micrograma (10^{-6} grama) |
| µl | Microlitro (10^{-6} litro) |
| µM | Micromolar (10^{-6} molar) |

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

1. INTRODUÇÃO

Durante os últimos anos, a pecuária de corte no Brasil sofreu um enorme ganho de volume e produtividade. A aplicação de técnicas modernas de produção, incluindo as biotecnologias ligadas à reprodução animal, contribuiu para que o país fosse classificado como o segundo maior detentor do rebanho comercial de bovinos do mundo, o maior exportador de carne mundial bovina (LUCHIARI FILHO, 2006), e ainda, em condição de destaque dentro do contexto internacional relativo à produção *in vitro* de embriões bovinos. (THIBIER, 2002; FIGUEIREDO; GONÇALVES, VISINTIN, 2008).

Do ponto de vista econômico, o desempenho reprodutivo é um dos principais focos da pecuária (NEVES et al., 1999).

Especificamente em bovinos, devido ao interesse crescente em se obter uma maior exploração do potencial genético de fêmeas para incremento da produção animal, diversas biotécnicas animais, tais como a Inseminação Artificial (IA), a Transferência de Embriões (TE) e a Produção de Embriões *In Vitro* (PIV), têm sido desenvolvidas e aprimoradas (RENESTO, 2004).

Com o aumento da comercialização de embriões, houve a preocupação com o aspecto sanitário dos mesmos. Vários métodos de prevenção são utilizados para se obter embriões livres de patógenos específicos, iniciando com testes para as enfermidades dos animais doadores e receptores até o tratamento do embrião após a colheita. No entanto, as biotécnicas representam um desafio para o controle da transmissão de doenças, pois produzem novos ambientes, manipulação excessiva do material, maior chance de contaminação e disseminação de patógenos (STRINGFELLOW; GIVENS; WALDROP, 2004).

A técnica de PIV, além de ser utilizada nos diferentes segmentos da reprodução animal, também tem sido empregada na pesquisa fundamental como instrumento para estudar fenômenos fisiológicos relacionados aos gametas femininos e masculinos, permitindo assim, um maior entendimento dos fenômenos de crescimento, maturação e fecundação de oócitos, de capacitação espermática, bem como do desenvolvimento embrionário precoce e de seus mecanismos de regulação (CALADO et al., 2001).

A utilização de ovários bovinos colhidos em abatedouros, procedentes de animais com estado sanitário desconhecido, é uma prática estabelecida e ainda utilizada para a produção de embriões *in vitro* (FERREIRA et al., 2005).

O Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) é considerado um agente patogênico aos embriões e, tem sido detectado em alguns produtos biológicos utilizados para a produção *in vitro* de embriões bovinos (VANROOSE, KRUIF, VAN SOOM, 2000). A necessidade de

melhores esclarecimentos sobre a interação vírus-oócito durante a MIV, tem levantado questões concernentes ao potencial de risco de transmissão desse agente infeccioso pelo gameta feminino.

Dessa forma, torna-se relevante a avaliação da infectividade e o efeito do BoHV-1 sobre oócitos bovinos, durante o período de MIV. Acredita-se, que a compreensão sobre a patogenia do BoHV-1 diretamente relacionada ao gameta feminino, possa auxiliar no controle sanitário, contribuir para o aumento da eficiência de técnicas reprodutivas, e abrir portas para o comércio exterior.

Além da ocorrência de doenças de esfera reprodutiva, a estacionalidade da oferta de pastagem é outro fator que pode comprometer o desempenho produtivo e reprodutivo do rebanho. O manejo impróprio das pastagens possibilita a invasão e o crescimento de espécies vegetais tóxicas, principalmente em épocas de seca, período onde a oferta de pastagem é menor, como por exemplo, a *Ateleia glazioviana* (timbó), capaz de acumular seus metabólitos secundários no organismo dos animais que as ingerem, apresentar efeito tóxico, mutagênico e/ou carcinogênico (VALLE; ANDREOTTI; THIAGO, 2000).

Uma vez que a mortalidade embrionária e a mortalidade fetal têm um grande impacto na rentabilidade de qualquer sistema de produção animal, torna-se necessário o aprimoramento contínuo de métodos de controle sanitário do rebanho e das biotécnicas ligadas à reprodução.

Atualmente, sabe-se que a PIV, além de uma importante biotécnica, constitui-se como uma ferramenta valiosa para estudos de interações de gametas e/ou embriões com patógenos e/ou xenobióticos e, com isso, torna-se cada vez mais um excelente modelo não somente para averiguações sobre aspectos sanitários, como também relacionados a processos tóxicos.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito citotóxico do extrato aquoso de *Ateleia glazioviana*, e sua interferência sobre a interação do BoHV-1 com oócitos bovinos durante o período de maturação *in vitro*. Os parâmetros utilizados para esse ensaio foram:

- Análise morfológica dos oócitos por microscopia óptica;
- Análise fisiológica dos oócitos pela avaliação da taxa de maturação;
- Análise da ação clastogênica do BoHV-1 e da *A. glazioviana* em oócitos pelo teste do cometa.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Diversas biotécnicas ligadas à reprodução animal têm sido desenvolvidas e aprimoradas no sentido de aumentar a eficiência reprodutiva e, conseqüentemente, maximizar a produção de animais geneticamente superiores, visando o aproveitamento deste material genético para obtenção do maior número de descendentes em um curto período de tempo (RENESTO, 2004).

Dentre as principais biotécnicas adotadas no Brasil, destacam-se a Inseminação Artificial (IA), utilizada para o melhoramento genético das espécies, devido a poucos machos selecionados produzirem espermatozóides para a inseminação de centenas de fêmeas por ano (AX et al., 2000); a Transferência de Embriões (TE), originada em 1951, que foi inicialmente um procedimento cirúrgico, e posteriormente adaptado para uma técnica não invasiva, que permite que cada doadora multiplique em mais de três vezes o número de descendentes de sua vida reprodutiva (BOLS et al., 1997); e a Produção de Embriões *In Vitro* (PIV), considerada a terceira geração de biotecnologia aplicada ao Melhoramento Genético após a IA e a TE (BOLS et al., 1997; SENEDA et al., 2002).

A PIV foi inicialmente desenvolvida apenas como uma ferramenta de pesquisa, porém, no início da década de 90, com a incorporação da técnica de punção folicular *in vivo* (OPU - *Ovum Pick Up*) tornou-se possível a recuperação de oócitos diretamente de animais vivos, e a aplicação comercial da tecnologia avançou notavelmente (PIETERSE et al., 1991). Passou a ser utilizada para acelerar a produção de animais geneticamente superiores e impedir, pela OPU, o descarte precoce de fêmeas portadoras de alterações adquiridas que impedem que a reprodução ocorra de forma natural (GONÇALVES et al., 2007).

A PIV envolve as etapas de colheita, seleção e maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV), e cultivo (CIV) de zigotos e estruturas embrionárias. Por fim, os embriões formados são transferidos para os animais receptores (GONÇALVES et al., 2002).

A eficácia do sistema de PIV depende principalmente da qualidade da MIV, da FIV e do CIV. Contudo, em virtude da inconsistência dos resultados referentes às taxas e qualidade das mórulas e blastocistos, a PIV ainda é limitada. O número de oócitos maturados que alcança o estágio de blastocisto não ultrapassa 30 a 40% da produção total de embriões, e os embriões que conseguem se desenvolver *in vitro* apresentam qualidade inferior àqueles produzidos *in vivo* (RIZOS et al., 2002).

3.1. Histórico da Produção de embriões *in vitro*

O primeiro processo de fecundação observado *in vitro* ocorreu há mais de um século. A fecundação de um óvulo de estrela do mar e a posterior formação da primeira célula do embrião foi objeto das primeiras pesquisas, devido ao fato da fecundação ocorrer externamente ao sistema reprodutor da fêmea. Os primeiros estudos de reprodução em organismos superiores com a finalidade de manipular os embriões surgiram ainda no final do século XIX (GONÇALVES et al., 2002).

Os coelhos, por terem um tamanho de óvulo relativamente grande, foram os primeiros animais a serem alvos de estudos em embriologia de mamíferos. Suas características biológicas favoráveis facilitavam a manipulação dos oócitos e a ovulação induzida pelo acasalamento (HOGAN; CONSTANTINI; LACY, 1986 apud GALLUPO, 2005).

Dentre os primeiros trabalhos experimentais realizados, destacam-se a descrição dos estágios embrionários pré-implantacionais, descritos por Van Beneden em 1875, a transferência de embriões para o oviduto, descritos por Heape em 1890, e a realização de um filme sobre as divagens de uma mórula em cultura, realizado em 1929, por Lewis e Gregory (HOGAN; CONSTANTINI; LACY, 1986 apud GALLUPO, 2005). No entanto, as limitações relativas à composição dos meios de cultura utilizados, eram dificuldades que consistiam barreiras técnicas a serem rompidas.

Apenas no início do século XX, paralelamente com o desenvolvimento da química, houve a produção de meios de melhor qualidade e progressos significativos em relação à colheita e cultivo de embriões (PASSOS et al., 2002). Finalmente, na década de 50, Wesley Whitten desenvolveu uma nova formulação para os meios de cultura utilizados na colheita e cultivo dos embriões. Essa nova formulação incluiu uma solução de Krebs-Ringer bicarbonato, suplementada com albumina sérica bovina, o qual foi capaz de ampliar significativamente o número de embriões implantados com sucesso, uma vez que o meio promoveu as clivagens de embriões murinos de uma célula até o estágio de blastocisto. A partir desse momento, Ralph Brinster, juntamente com Whitten, iniciaram estudos para determinar quais eram as necessidades nutricionais de embriões em cultura, e assim desenvolveram a técnica da cultura de microgotas, utilizada mundialmente em diversos laboratórios, tanto na área animal, quanto humana (HOGAN; CONSTANTINI; LACY, 1986 apud GALLUPO, 2005).

Apesar de muito simples, as novas condições de cultura permitiram a expansão do desenvolvimento das técnicas de PIV. Em 1959, houve um marco na história da FIV com o

relato do nascimento do primeiro mamífero, um coelho, gerado a partir dessa técnica (CHANG, 1959). A partir daí, até o final dos anos 70, muitos outros relatos de FIV seguida de nascimentos de filhotes saudáveis foram registrados (IRITANI; NIWA, 1977).

A técnica de FIV ficou mundialmente conhecida em 1978, outro marco na história da FIV no mundo, quando Stewptoe e Edwards anunciaram o nascimento de Louise Brown, o primeiro “bebê de proveta” (STEWPTOE; EDWARDS, 1978).

No que concerne aos animais de produção, somente por volta da década de 70 é que surgiram os primeiros relatos sobre a MIV e FIV de oócitos bovinos (GONÇALVES et al., 2002). Em 1982, nasceu o primeiro bezerro produzido por FIV, saudável e pesando 45kg. Após alguns meses de observação, o animal não apresentou alterações em seu desenvolvimento e comportamento (BRACKETT et al., 1982).

Contudo, o uso comercial da FIV só ocorreu com o desenvolvimento de procedimentos que possibilitassem a recuperação dos oócitos de doadoras vivas, como o caso da OPU. Apesar das perspectivas bastante promissoras, a FIV permaneceu quase que por duas décadas restrita a trabalhos realizados em universidades ou institutos de pesquisa. A baixa eficiência relativa da técnica, responsável por taxas de gestação entre 20 a 40% em relação às ocorridas em montas naturais, abortos, entre outras conseqüências, somado ao elevado custo de implantação de laboratórios constituíram limitações significativas e inibiram sua adoção pela iniciativa privada. Devido a não obtenção do resultado esperado com o emprego da técnica, houve a retração do uso comercial da FIV no mundo na década de 90 (VIANA, 2005).

No entanto, entre os anos de 1999 e 2000, ocorreu uma grande mudança em relação ao cenário de FIV. Uma vez verificado que a PIV de bovinos poderia ser totalmente viabilizada sob condições artificiais, esta recebeu grande impulso e passou a ser utilizada em diversos países, inclusive de forma destacada no Brasil, onde os laboratórios comerciais passam a ter sucesso e a se multiplicar. A quantidade de embriões produzidos, antes, em 1998 inexpressiva, salta para mais de 60.000 em 2003 (VIANA, 2005).

3.2. Aspectos gerais da maturação oocitária

Para a obtenção de melhores resultados com a técnica, muitos estudos têm sido realizados visando avaliar individualmente as etapas da PIV, procurando ajustar todas as variáveis envolvidas no processo.

Muitos fatores biológicos agem de forma conjunta para preparar o oócito imaturo para um desenvolvimento bem sucedido e um embrião competente depois da fecundação. A

compreensão exata das necessidades metabólicas do oócito em sistemas de cultivo de MIV é fundamental para que seja estabelecida a condição ideal para que o maior número possível de oócitos maturados adquira a competência de desenvolvimento e torne-se hábil para sustentar o desenvolvimento inicial do embrião (BARRETO, 2007).

Nos mamíferos, a oogênese inicia-se durante o desenvolvimento fetal. Em bovinos, a meiose origina-se por volta dos 80 dias de gestação. No entanto, o ciclo celular é bloqueado na prófase da meiose I, e permanece assim até a puberdade. Pouco antes da ovulação, os oócitos começam a ser estimulados a retomar a meiose em resposta à onda pré-ovulatória do hormônio luteinizante (LH) e o ciclo celular progride até o estágio de metáfase II (MII), quando bloqueia novamente. Este ciclo só se reinicia e completa-se, após a ovulação, quando houver a fecundação pelo espermatozóide que provoca sua ativação. Uma vez ativado, o oócito completa a meiose e inicia os ciclos mitóticos do desenvolvimento embrionário (SIRARD, 2001).

O processo que ocorre quando o oócito reinicia a meiose a partir da prófase I até concluir a fase de metáfase II é chamado de maturação oocitária. Durante a maturação, os oócitos sofrem várias alterações nucleares, citoplasmáticas e moleculares (MINGOTI, 2007).

A maturação nuclear consiste na modificação de configuração da cromatina, característica da progressão do ciclo celular, inclui o desaparecimento do nucléolo, condensação da cromatina, extrusão do primeiro corpúsculo polar (CP) e formação do segundo fuso meiótico. Nessa fase o oócito atinge a metáfase II, e então considera-se que a maturação nuclear está completa (MINGOTI, 2007).

A maturação citoplasmática envolve uma série de alterações bioquímicas e estruturais, incluindo redistribuição das organelas intracelulares, modificações do citoesqueleto. Nessa fase, o papel dos grânulos corticais é fundamental no bloqueio à poliespermia, uma vez que o exsudato desses grânulos secretórios é capaz de alterar a função e promover o endurecimento da zona pelúcida (MINGOTI, 2007).

Já a maturação molecular, está relacionada à maturação citoplasmática e nuclear, e apesar de incluir eventos ainda não muito bem conhecidos, sabe-se que ela tem uma importante função durante o período de crescimento do oócito (SIRARD, 2001).

Somente após a conclusão dos processos de maturação nuclear e citoplasmática é que o oócito torna-se equipado com toda a maquinaria celular necessária para permitir a fecundação e o desenvolvimento embrionário inicial (MINGOTI, 2005).

A maturação *in vitro* de oócitos é uma importante tecnologia reprodutiva que pode gerar oócitos maduros capazes de sustentar o desenvolvimento embrionário (ROBERT et al., 2001).

Oócitos maturados *in vitro* têm limitações, principalmente relacionadas ao potencial de desenvolvimento de embriões, quando comparados com oócitos maturados *in vivo*

(RIZOS et al., 2002). Apesar dessa limitação, a MIV é uma tecnologia que abrange uma população muito variada de oócitos coletados de folículos em diferentes estágios de desenvolvimento, sendo a eficiência da técnica limitada pela qualidade e competência de desenvolvimento do oócito, baseada principalmente em sua capacidade de ser fertilizado e desenvolver um embrião (GILCHRIST; THOMPSON, 2007).

Existem muitos fatores que influenciam o processo de MIV. O desafio fundamental é compreender o que constitui a competência de desenvolvimento do oócito, incluindo o papel que o ambiente folicular ovariano desempenha na sua evolução para o pleno potencial de desenvolvimento (LONERGAN, 2008).

Atualmente, sabe-se que as células somáticas do folículo ovariano, principalmente as células do cumulus, desempenham um papel chave na aquisição de competência do oócito *in vivo* (GILCHRIST et al., 2004). No entanto, pouco se conhece sobre a natureza, diversidade de compostos que transitam entre as células do cumulus e o oócito, via junções gap comunicantes durante a fase final de desenvolvimento folicular e, funcionamento desse processo (GILCHRIST; THOMPSON, 2007).

Ao longo das duas últimas décadas, melhorias significativas nos meios de cultivo embrionário foram feitas baseadas em maiores concentrações de substratos metabólicos dos fluidos do trato reprodutor, bem como sobre as necessidades metabólicas dos embriões (MONNIAUX et al., 1997).

Um dos métodos mais utilizados para aumentar a eficiência da MIV é a suplementação do meio de cultura com fontes protéicas de origem animal, tais como a adição de soro fetal bovino (SFB) ao meio de cultivo. O efeito benéfico da suplementação do meio com soro inclui o suprimento de nutrientes, vitaminas, fatores de crescimento, hormônios e componentes antioxidantes para a maturação do oócito e desenvolvimento do embrião. No entanto, as atividades biológicas dos soros variam de lote para lote e são potenciais fontes de infecção de vírus e micoplasmas (GARDNER; LANE; SPITZER, 1994; VAN LANGENDONCKT et al., 1997).

A suplementação do MIV com fluido folicular (FF) bovino também tem sido uma prática muito utilizada. O FF aumenta a qualidade dos oócitos, pode ser utilizado em substituição ao SFB, e favorece a aquisição da competência de desenvolvimento do oócito (ROMERO-ARREDONDO; SEIDEL, 1994).

A capacitação do oócito tem sido positivamente associada com o tamanho do folículo do qual foi recuperado. Assim, sua competência pode ser examinada em relação ao diâmetro do folículo. Acredita-se que folículos maiores, entre 3 e 8mm de diâmetro, contêm oócitos mais competentes do que folículos menores, entre 1 e 2mm. Dessa forma, a dimensão do folículo pode atuar como indicador da competência do oócito (PAVLOK; LUCAS-HAHN; NIEMANN, 1992).

3.3. Risco de transmissão de doenças pelas técnicas de reprodução *in vitro*

A partir do momento que a TE se tornou comercial, muitas questões relacionadas ao risco de transmissão de patógenos, principalmente aqueles associados à reprodução, foram levantadas (VANROOSE et al., 2000). No que diz respeito à sanidade dos embriões de PIV, pouco têm sido publicado e não se sabe ao certo qual a interação de diferentes patógenos com os gametas e/ou embriões *in vitro*.

Atualmente, para que ocorra a transmissão de doenças infecciosas, seja por embriões produzidos *in vivo* ou por embriões produzidos *in vitro*, o patógeno deve estar presente dentro do embrião (infecção embrionária verdadeira), em associação ou aderido à zona pelúcida, considerada um dos principais pontos de resistência aos patógenos, ou presente nos fluidos no qual os embriões são recolhidos, manipulados, criopreservados ou transferidos (WRATHALL; SUTMÖLLER, 1998).

São consideradas fontes comuns de contaminação, os gametas e seus fluidos associados, células somáticas utilizadas na maturação e/ou manutenção dos embriões, materiais de origem animal utilizados para suplementação dos meios de cultura (ex: soro fetal bovino, albumina sérica bovina), contaminação do profissional, de instrumentos ou equipamentos, meios de lavagem e o próprio transporte de embriões. Sobretudo, o agente deve estar presente ao menos na concentração mínima requerida para a infecção de uma receptora suscetível (GALUPPO, 2005).

A zona pelúcida (ZP) é uma matriz extracelular única, originada quase que exclusivamente de células foliculares, que envolve o oócito, e também o embrião em sua fase inicial. Confere especificidade na fertilização, bloqueio a poliespermia e proteção durante os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário. A maioria dos patógenos é incapaz de penetrar a zona pelúcida intacta e infectar as células dos embriões, portanto, ela tem sido considerada uma barreira efetiva aos patógenos, de forma, recomenda-se apenas o uso de embriões com a ZP íntegra, sendo esta uma característica crítica na determinação do estado de sanidade dos embriões (STRINGFELLOW; GIVENS, 2000).

A natureza da aderência e de como a zona pelúcida atrai e carrega o agente infeccioso ainda é desconhecida. Sabe-se que apesar da maioria dos agentes patogênicos não atravessar a zona pelúcida intacta, alguns deles, principalmente vírus, podem aderir-se sobre essa estrutura. Dessa forma, pode haver a infecção do embrião, no momento de sua eclosão, e a infecção da receptora, quando o embrião juntamente com o patógeno aderido for transferido (RUFINO et al., 2006).

A pesquisa específica sobre a interação de patógenos com embriões tem se limitado principalmente a agentes virais, dentre eles o BoHV-1, causador da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR). Esse agente está entre os agentes infecciosos mais importantes devido aos transtornos reprodutivos ocasionados em bovinos. A IBR é uma doença infecciosa economicamente importante, de grande transmissibilidade e difícil controle, que está amplamente disseminada nos rebanhos bovinos de corte e de leite tanto do Brasil como em outros países (RICHTZENHAIN *et al.*, 1999; MÉDIC; ALFIERI; ALFIERI, 2000; FLORES *et al.*, 2005).

3.4. Aspectos gerais do Herpesvírus bovino tipo-1

O Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), é membro da família Herpesviridae, subfamília Alphaherpesvirinae, gênero *Varicellovirus* (FAUQUET *et al.*, 2005). A partícula viral tem entre 70 a 110nm de diâmetro e é constituída por um capsídeo icosaédrico, envelope glicoprotéico e genoma DNA linear de fita dupla de aproximadamente 137-139 kpb, e caracteriza-se pelo ciclo replicativo rápido, entre 24-48 horas (ENGELS; STECK; WYLER, 1981; FIELDS; KNIPE, 1992).

O BoHV-1 é considerado um dos mais importantes patógenos de bovinos, e está associado a sérias manifestações clínicas tanto em rebanhos de corte quanto de leite, sendo responsável por grandes prejuízos econômicos aos países que exploram a bovinocultura como atividade econômica. Encontra-se amplamente disseminado em rebanhos de praticamente todo o mundo, com exceção de alguns poucos países da Europa, como Dinamarca e Suíça, devido à implementação de um rígido programa de erradicação da infecção (KIRKBRIDE, 1985; ACKERMANN; WEBER; WYLER, 1990).

No Brasil, a IBR foi registrada primeiramente em 1962, sendo o BoHV-1 isolado pela primeira vez em 1978 a partir de pústulas vaginais de vacas, ambos, no estado da Bahia (GALVÃO *et al.*, 1963; ALICE, 1978).

A infecção determinada pelo BoHV-1 afeta principalmente os tratos respiratório e genital dos bovinos e pode ser subdividida em duas entidades clínicas denominadas Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) e Vulvovaginite/Balanopostite Postular Infecciosa (IPV/IPB) (GIBBS; RWEYEMAMU, 1977). Entretanto, a IBR e IPV/IPB não são as únicas formas de manifestação clínica das infecções pelo vírus, pois este pode causar outros sérios problemas como conjuntivites, enterites, encefalites e distúrbios reprodutivos como endometriose, mortalidade embrionária precoce e/ou tardia, animais com repetições de cios

a intervalos regulares/irregulares, mortalidade fetal com aborto, natimortos, mortalidade neonatal e infertilidade devido à infecção uterina (MURRAY, 1990; KAHRIS, 2001).

Estudos utilizando enzimas de restrição possibilitaram a divisão do BoHV-1 em três subtipos, sendo o BoHV-1.1 (*IBR-like*) relacionado com problemas respiratórios, reprodutivos e casos de conjutivite, e o BoHV-1.2_A e BoHV-1-2_B (*IPV-like*) mais freqüentes em infecções relacionadas com o trato genital, sendo o subtipo 2_B menos virulento, o qual parece não causar aborto (MILLER; VAN DER MAATEN; WHETSTONE, 1991).

A forma respiratória possui taxa de mortalidade baixa, e é caracterizada principalmente por febre, depressão, perda de peso, queda brusca na produção de leite, rinite, dispnéia, corrimento nasal seroso, lesões erosivas na mucosa nasal, podendo ocasionalmente haver broncopneumonia devido a infecções bacterianas secundárias (D'ANGELO, 1998).

Em fêmeas, a forma genital manifesta-se clinicamente pelo aparecimento de pequenas vesículas que evoluem para pústulas e erosões localizadas na vulva e vagina. O epitélio vulvar apresenta-se edemaciado, hiperêmico e com secreção que pode tornar-se mucopurulenta se houver contaminação bacteriana secundária. Lesões similares são encontradas no prepúcio e pênis dos machos, pequenos nódulos avermelhados na mucosa do prepúcio e do pênis evoluem para pústulas. O pênis torna-se avermelhado e dolorido, podendo o animal apresentar micção freqüente e incapacidade para monta (GIBBS; RWEYEMAMU, 1977; WYLER; ENGELS; SCHWYZER, 1989; WEIBLEN, 1992).

A transmissão do BoHV-1 pode ser direta por intermédio de aerossóis contaminados ou secreções nasais de animais infectados, e indireta por meio da ingestão de alimentos e água contaminados, pelo uso de ordenha mecânica e vaginas artificiais contaminadas. (ENGELS; ACKERMANN, 1996). Pode também ocorrer pelo sêmen, que é um veículo potencial na transmissão, normalmente contaminado durante a ejaculação, quando o líquido seminal passa sobre as mucosas contaminadas, e ainda pela transferência de embrião, onde é preciso que o agente infeccioso esteja presente no embrião, associado à zona pelúcida ou presente nos líquidos os quais o embrião é transferido (D'ANGELO, 1998).

A infecção viral em células embrionárias é uma possibilidade importante que não deve ser desconsiderada. O patógeno pode estar associado ao oócito, no momento da fecundação, ou ser carregado para o seu interior por meio da fusão com o espermatozóide, podendo a infecção ocorrer antes ou durante a fecundação (WRATHALL; SUTMÖLLER, 1998).

O mecanismo de maior importância do BoHV-1 na população bovina é a capacidade do vírus permanecer em estado de latência, alojando-se em gânglios periféricos, como os gânglios sacrais e trigêmio (SHEFFY; DAVIES, 1972 apud ROCHA; GOUVEIA; LEITE, 1999) sem se replicar, e persistindo por toda a vida do animal. Dessa forma, os animais uma

vez infectados tornam-se portadores vitalícios, podendo voltar a eliminar o vírus durante episódios de reativação viral, e atuar como fonte de infecção para os animais susceptíveis (ENGELS; ACKERMANN, 1996). Ainda não se sabe exatamente como o mecanismo de indução da latência viral atua, porém sabe-se que durante a reativação da infecção, gerada por fatores que causem depressão do sistema imunológico do hospedeiro, como estresse ou tratamentos com corticóides, o BoHV-1 é transportado via nervosa, a partir dos gânglios periféricos, retornando ao foco primário da infecção. Neste local ocorre replicação e eliminação viral. Já durante o período de latência, proteínas virais não são sintetizadas, e devido a não apresentação de antígenos do BoHV-1 ao sistema imunológico, pode-se ocorrer decréscimo no título de anticorpos neutralizantes (ACKERMANN; PETERHANS; WYLER, 1982).

Devido à diversidade dos sinais clínicos, bem como a presença dos mesmos sinais em outras doenças infecciosas e parasitárias, a elaboração de um diagnóstico conclusivo da infecção causada pelo BoHV-1 é praticamente impossível. Quando trata-se de distúrbios reprodutivos, a manifestação clínica mais evidente da infecção é o aborto, e deve ser diferenciado de outras causas infecciosas como a brucelose, leptospirose, campylobacteriose, neosporose, tricomonose, infecções ocasionadas por micoplasmas e pelo vírus da diarreia viral bovina (BVD). Também devem ser incluídas no diagnóstico diferencial causas não infecciosas relacionadas ao manejo (estresse térmico), desordens genéticas e/ou nutricionais, plantas tóxicas, micotoxinas (zearalenona), entre outras causas (LARSON, 1996). Mesmo em casos de vulvovaginite, onde as lesões são características, o diagnóstico é apenas presuntivo, sendo necessário realizar o diagnóstico diferencial das infecções ocasionadas por *Mycoplasma bovis* e *Ureaplasma diversum*, responsáveis por vulvovaginite granular (RUHNKE, 1984).

Atualmente, várias técnicas têm sido empregadas para o diagnóstico das doenças que comprometem a eficiência da reprodução de bovinos. O diagnóstico mais eficiente da infecção pelo BoHV-1 é o laboratorial, podendo este ser etiológico ou sorológico. As técnicas sorológicas mais utilizadas na detecção de anticorpos específicos incluem a soroneutralização (SN) e os ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Estes testes devem ser sensíveis o suficiente para evitar resultados falso-negativos, principalmente quando os títulos de anticorpos específicos para o vírus são baixos. No entanto, elas podem ser inviabilizadas em rebanhos que adotam a vacinação profilática uma vez que estas metodologias são incapazes de diferenciar os títulos provenientes da exposição ao vírus vacinal daqueles oriundos da exposição natural ao vírus de campo. Assim, o diagnóstico da infecção somente é conclusivo mediante metodologias que possibilitem o diagnóstico etiológico. Para isto podem ser utilizadas técnicas que identifiquem a partícula viral, como o isolamento do vírus em cultivo celular e a microscopia eletrônica; os antígenos virais, por

meio de técnicas como imunofluorescência, imunoperoxidase e ELISA diretos; o genoma viral, por técnicas moleculares como a hibridização e a reação em cadeia pela polimerase (PCR) (WYLER; ENGELS; SCHWYZER, 1989).

Recentes avanços em métodos de biologia molecular têm gerado novas oportunidades para a realização do diagnóstico de uma gama de microrganismos de forma sensível, específica e rápida. A reação em cadeia da polimerase (PCR), técnica que possibilita a amplificação de segmentos do genoma a partir de diferentes tipos de material biológico, como fragmentos de tecido, sêmen, secreções, tem sido a técnica mais utilizada. Uma vez que a análise é feita por meio da identificação do genoma, a técnica possibilita a utilização de partículas virais não viáveis. Dessa forma, mesmo os vírus que apresentam estado de latência, como o BoHV-1, ou que tenham sido inativados, podem ser detectados pela PCR (TAKIUCHI et al., 2003; TAKIUCHI et al., 2005).

A PCR é uma técnica que vem sendo mundialmente utilizada não apenas para o diagnóstico de doenças, mas também para a realização de análises moleculares de microrganismos patogênicos, devido sua especificidade, sensibilidade e rapidez de resultados que podem ser obtidos em até 24 horas. Além disso, ainda permite a detecção de baixa concentração viral em embriões, fluidos uterinos e líquidos de lavagem, nem sempre detectados por outros métodos de diagnóstico, tornando-se dessa forma uma ferramenta indispensável para a avaliação da sanidade dos embriões produzidos por biotécnicas da reprodução (GIVENS et al., 2001).

Além dos impactos econômicos gerados pela introdução do BoHV-1 em rebanhos bovinos, tais como o comprometimento no crescimento de animais, redução na produção leiteira, morte embrionária e fetal, eficiência reprodutiva de fêmeas e touros reduzida, tratamento dos animais com sinais clínicos, entre outros, há ainda as restrições ao comércio internacional de animais vivos e seus produtos como sêmen, embriões e produtos de biotecnologia, descritas no Código de Saúde de Animais Terrestres (OIE, 2004).

Com o advento de técnicas bem sucedidas de produção *in vitro* e criopreservação de embriões e oócitos bovinos, aumentou-se não só o comércio interno e externo destes produtos, como também a preocupação com questões concernentes aos riscos de transmissão de enfermidades infecciosas (BIELANSKI et al., 1997).

Durante os últimos anos foi demonstrado que o BoHV-1 pode estar presente no material utilizado no sistema de produção *in vitro* (VANROOSE et al., 1999), no líquido folicular, associado às células epiteliais de oviduto (BIELANSKI et al., 1993), e nos espermatozoides de touros infectados (ROCHA et al., 1998). Portanto, o risco de transmissão dessa enfermidade por meio de transmissão *in vitro* de embriões deve ser considerado, uma vez que o vírus pode estar presente em animais aparentemente saudáveis.

3.5. Aspectos gerais da *Ateleia glazioviana*

A presença de determinadas plantas tóxicas no meio ambiente e o conseqüente acúmulo de seus metabólitos secundários nos organismos dos animais que as ingerem representa uma importante causa de problemas relacionados ao estado sanitário do rebanho bovino (D'ANGELO; RODRIGUES, 1996).

Desde 1986, grandes perdas econômicas têm sido relatadas por criadores de bovinos na região de Santa Catarina e Rio Grande do Sul em virtude do alto índice de abortos, verificado em vacas nos diferentes períodos gestacionais (STOLF et al., 1994). As evidências epidemiológicas apontam como causa a ingestão de *Ateleia glazioviana*, planta conhecida no Brasil por causar, em bovinos, sinais nervosos como cegueira, incoordenação e letargia, abortos e fibrose cardíaca (TOKARNIA et al., 2000).

A *Ateleia glazioviana* é uma árvore da família Fabaceae e subfamília Leguminosae Papilionoideae, de porte médio, que atinge 10 a 20 cm de altura e 30-60 cm de diâmetro no estado adulto. É popularmente conhecida como “timbó”, “cinamomo bravo”, “maria-preta” ou “amargo”. A floração ocorre de novembro a janeiro. O fruto pode ser encontrado de março a maio e consiste de uma vagem achatada com 4,5 cm de comprimento e 1,5 a 2 cm de largura. A vagem contém geralmente dois, no máximo, três sementes, estas são reniformes, pequenas e marrons. Ocorre em grande quantidade principalmente no noroeste do Rio Grande do Sul e oeste de Santa Catarina (GAVA et al., 2001).

A intoxicação por *A. glazioviana* foi inicialmente descrita em bovinos, e está associada ao nascimento de animais fracos, que morrem no período neonatal, abortos que atingem vacas em qualquer período gestacional, cujas taxas podem variar entre 10 e 40%, podendo em alguns surtos chegar a 100%, lesões encefálicas responsáveis por sinais clínicos de distúrbios nervosos que incluem cegueira, letargia, incoordenação e enfraquecimento e lesões cardíacas como insuficiência cardíaca aguda (morte súbita), mais incomum, pois possivelmente ocorre quando os animais com muita fome são colocados onde há grande quantidade de plantas jovens ou quando árvores adultas são cortadas e ficam no chão ao alcance dos animais (GAVA et al., 2001), e crônica (insuficiência cardíaca congestiva), cuja morbidade varia de 10 a 60% e a letalidade é próxima de 100% (GAVA; BARROS, 2001).

Os animais ingerem a planta quando há escassez de alimentos, principalmente em conseqüência de períodos de seca, ou superlotação, e após transportes. A ingestão pelos bovinos de quantidades diárias a partir de 10g/kg promove o aparecimento de sinais clínicos após ser alcançada a ingestão de 40g/kg. Os mesmos sinais são observados quando a

planta é ingerida em quantidades maiores, porém em uma única dose. Se a ingestão da planta continuar, os sinais clínicos se agravam, e a partir da ingestão de 70g/kg, ocorre a morte do animal. Quando a ingestão da planta é interrompida, se consumidas em doses diárias de 2,5 a 7,5g/kg, os sinais desaparecem e pode não ocorrer lesões significativas (GAVA et al., 2001).

Os abortos ocorrem em diferentes fases de gestação, principalmente no final do verão e no outono, geralmente entre os meses de novembro a maio, quando as vacas prenhes ingerem as folhas das plantas em crescimento, e no período de queda das folhas. A confirmação do aborto e/ou nascimento de bezerros fracos ocorre através da ingestão de doses iguais ou superiores a 22g/kg (STOLF et al., 1994).

Apesar de sua ampla ocorrência no Brasil, poucos são os trabalhos sobre a fitoquímica da *A. glazioviana*. Dos extratos das folhas da planta foram isolados como principais componentes isoflavonas, rutina, flavonóides, taninos, triterpenos e aminoácidos (ORTEGA; SCHENKEL, 1986).

A *A. glazioviana* além de ser uma espécie tóxica para bovinos, também é conhecida por ser uma planta ictiotóxica. Sabe-se que a capacidade de causar morte ou imobilização de peixes deve-se há presença das isoflavonas (ORTEGA; SCHENKEL, 1987). No entanto, o efeito abortivo do extrato aquoso de *A. glazioviana* ainda não foi correlacionado com os principais constituintes da planta (MARONA et al., 1992).

A utilização de medidas profiláticas, tais como eliminar as mudas novas que nascem ao redor das matas constituídas por *A. glazioviana*, cercar as árvores de *A. glazioviana*, impedir o contato dos bovinos com a planta, bem como a aplicação de técnicas agronômicas (formas e época de lavração, fertilizações, rotação de cultivos) e técnicas de manejo de pastagens, devem ser utilizadas para minimizar as perdas econômicas causadas pela morte dos animais (GAVA et al., 2001; HARAGUCHI, 2003).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Vírus

Foi utilizado o Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), amostra Los Angeles, 10² passagem em células MDBK, com título de 10^{5.5}TCID₅₀/mL (Dose Infectante em Cultura de Tecidos), mantida em meio Eagle MEM (Embriocare/Cultilab) sem soro à -80°C. A amostra foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Vírus de Bovídeos do Centro de Sanidade Animal do Instituto Biológico de São Paulo.

4.2. Planta

A espécie de *Ateleia glazioviana* foi coletada em Pelotas-RS, identificada e depositada no herbário da Universidade Federal de Pelotas cuja exsicata corresponde Pel N°23.124.

As folhas foram secas e moídas. O pó das folhas secas (250g) de *Ateleia glazioviana* foi misturado com água destilada (500mL) em temperatura ambiente por uma hora e filtrado em papel de filtro pregueado para obter extrato aquoso. O resíduo vegetal foi extraído novamente com 200mL de água destilada empregando o mesmo procedimento. Foi realizada a terceira extração da mesma forma. Os extratos aquosos foram reunidos e concentrados parcialmente através do evaporador rotativo sob pressão reduzida à temperatura de 55°C até obter 160mL. A concentração do extrato aquoso foi de 0,24g/mL, e este nos foi cedido pelo Laboratório de Química de Farmacologia de Produtos Naturais.

4.3. Colheita e maturação *in vitro* dos oócitos

Os oócitos foram coletados de ovários obtidos de vacas e novilhas provenientes do abatedouro Mantiqueira, localizado em São José dos Campos, na região do Vale do Paraíba, onde foram realizadas 33 coletas para a elaboração deste trabalho.

Aproximadamente, entre 15 a 20 minutos após a morte do animal, no momento da evisceração, foram coletados ovários que apresentavam corpo lúteo, indicando,

provavelmente, o estado de metaestro (Figura 1). Os ovários foram então lavados duas vezes em Solução Dulbecco (Embriocare/Cultilab, Campinas, São Paulo, Brasil) com 2% de gentamicina e transportados em garrafa térmica para o laboratório à 35°C.

Os oócitos foram aspirados dos folículos ovarianos de aproximadamente 3,0 a 6,0mm com agulha 18G acoplada à seringa descartável de 10mL, contendo 0,5mL de solução de manutenção/ Holding Plus (Solução PBS balanceada, Embriocare/Cultilab, Campinas, São Paulo, Brasil) (Figura 2). Todo líquido folicular aspirado foi transferido para tubos cônicos de 15mL. Após 20 minutos, em repouso em estufa à 37°C, 5% CO₂, e 90% de umidade, o sedimento contendo os oócitos foi cuidadosamente retirado e estes foram lavados três vezes em solução Holding Plus (Figura 3).

No estereomicroscópio foram identificados e selecionados apenas oócitos com zona pelúcida intacta, ooplasma uniforme e envolto por no mínimo duas camadas de células do cúmulus (Figura 4).

Os oócitos selecionados foram removidos para placas de Petri com 35mm de diâmetro contendo gotas de 90µl de meio de maturação (MIV, composto por TCM 199, suplementado com 10% de SFB, 0,5µg/ml de hormônio folículo estimulante - FSH, 5µg/ml de hormônio luteinizante - LH, 1µg/ml de estradiol 17B e 100µg/ml de gentamicina) cobertas com óleo mineral estéril, e em seguida, mantidas em estufa à 37°C, 5% CO₂, e 90% de umidade por 24 horas, período necessário para que ocorra o processo de maturação dos oócitos. Em cada gota foram colocados aproximadamente 25 oócitos.



Figura 1: Colheita de ovários no abatedouro



Figura 2: Punção dos folículos ovarianos

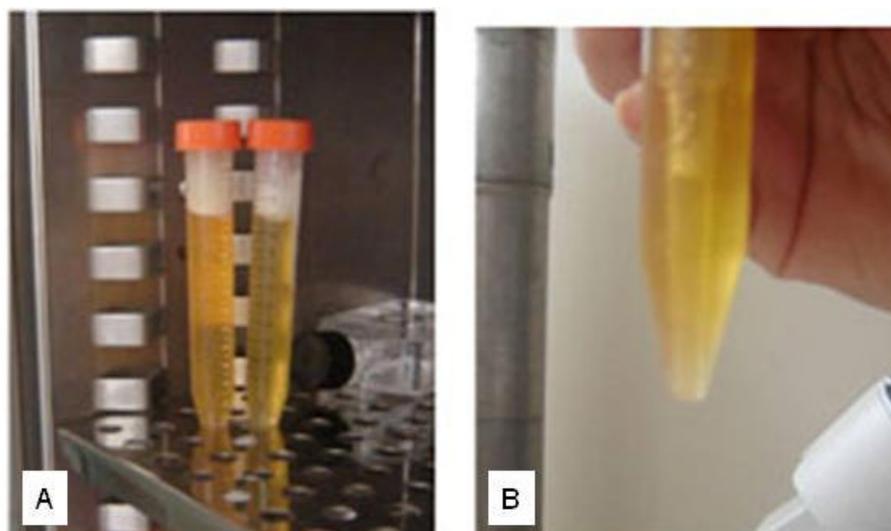


Figura 3: Tubos cônicos com líquido folicular (A) e pellet contendo os oócitos (B)

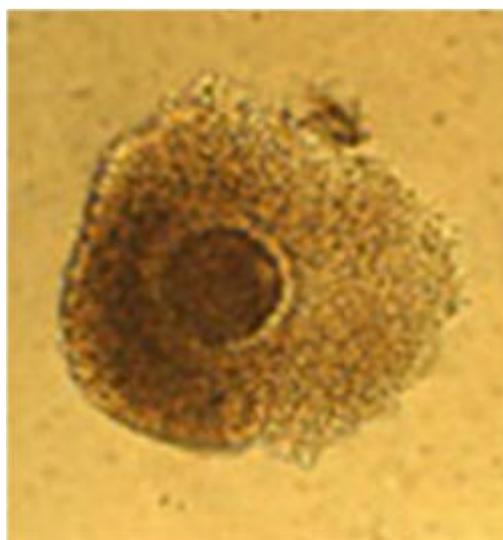


Figura 4: Oócito imaturo. Visualização em estereomicroscópio (aumento 100X)

4.4. Reação em Cadeia pela Polimerase

No início de cada experimento, amostras de fluido folicular e meio de maturação foram testados quanto à presença do BoHV-1 pela técnica de PCR. Os testes foram realizados no Laboratório de Víroses de Bovídeos do Centro de Sanidade Animal do Instituto Biológico de São Paulo segundo D'Angelo (1998). Apenas foram utilizados materiais cujas amostras obtiveram resultados negativos.

4.5. Exposição dos oócitos bovinos ao extrato e ao vírus durante o período de maturação *in vitro*

Os oócitos foram divididos em quatro grupos experimentais: G-C, grupo de oócitos controle; G-H, grupo de oócitos expostos ao Herpesvirus bovino tipo 1; G-A, grupo de oócitos expostos ao extrato de *A. glazioviana*; e G-HA, grupo de oócitos expostos simultaneamente ao vírus e extrato. Todos os grupos permaneceram em estufa com 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa a 37°C.

Foi feito um cálculo para ajuste das concentrações de vírus e extrato da planta nos diferentes grupos experimentais, sendo que G-C foi mantido com 90µl de MIV, G-H com 56,2µl de MIV e 33,8µl de vírus, G-A com 81,8µl de MIV e 8,2µl de extrato (0,24µg/µl), e G-HA com 52,9µl de MIV, 31,8µl de vírus e 5,3µl de extrato.

Ao término dessa exposição, foram utilizados três parâmetros de avaliação, baseados na morfologia, taxa de maturação e ação clastogênica (teste do COMETA).

Especificamente para o teste do COMETA foi analisado um grupo adicional, denominado *in natura*, composto por oócitos obtidos logo após a punção folicular dos ovários e, portanto, não exposto a nenhuma técnica *in vitro*, realizado para a identificação da ocorrência da taxa espontânea de dano no DNA em oócitos bovinos.

4.6. Avaliação morfológica dos oócitos por microscopia óptica

Após o período de MIV, cada grupo de oócitos foi submetido à avaliação direta por microscópio de luz invertido CARL ZEISS (JENA), no aumento final de 200X e fotografados. Foram observadas características do citoplasma, integridade da zona pelúcida e aspectos

das células do cumulus quanto à expansão e degeneração. Em bovinos, a expansão das células do cumulus é o parâmetro utilizado como indicador de maturação oocitária (ATHAYDE, 2007). A confirmação é feita quando os oócitos são desnudados, o que permite a observação do CP. A expansão foi classificada como ausente, baixa, moderada ou alta, e a degeneração caracterizada pela coloração e disposição das células do cumulus. Após a observação dos oócitos, estes foram utilizados logo após para avaliação da taxa de maturação.

4.7. Avaliação da taxa de maturação dos oócitos

Após os oócitos permanecerem 24 horas em meio MIV à 37°C em estufa de CO₂, a taxa de maturação oocitária foi mensurada pela proporção de oócitos com presença do CP (ZERIO, 2007).

Para melhor observação do CP, os oócitos foram retirados do meio MIV, lavados em solução de manutenção à 37°C, transferidos para tubos de 1mL com 500µl da mesma solução, e agitados no vortex por 1 minuto para a remoção das células do cumulus. Em seguida, foram colocados em placas de petri e levados ao microscópio óptico invertido, no aumento de 200X, para a visualização do CP. A taxa de maturação foi obtida com base na análise percentual de oócitos que apresentaram CP.

4.8. Avaliação da ação clastogênica em oócitos

Todos os grupos foram submetidos ao Ensaio do COMETA (single-cell gel electrophoresis), protocolo descrito por Singh et al. (1988), com algumas modificações.

Os oócitos foram tratados em uma 1ª solução de lise (Proteinase K a 10 mg/mL, Dodecil Sulfato de Sódio a 10%, TNE – 500mM NaCl, 50 mM Tris HCl pH 8,0, 125 mM EDTA pH 8,0 – , e água destilada) por 1 hora à 56° C para a ruptura da zona pelúcida. Após esse período, foram adicionados a cada tubo de microcentrífuga de 1,5mL (contendo os oócitos submetidos à ação da 1ª solução de lise) 100µl de agarose “low melting” SIGMA (0,5% em tampão PBS livre de Ca²⁺ e Mg²⁺, a 37°C) e colocada essa mistura em lâminas histológicas inteiramente foscas já anteriormente cobertas com 300µl de agarose “normal melting” SIGMA (0,7% em tampão PBS livre de Ca²⁺ e Mg²⁺, a 65°C). Estas foram cobertas por lamínula, permanecendo por 5 minutos a 4°C para a solidificação do gel. Em seguida,

foram retiradas as lamínulas e os oócitos tratados com uma 2ª solução de lise (2,5 M de NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM de Tris, 1% de sarcosinato de sódio pH 10, 1% de Triton X 100, 10% DMSO) por 2 horas a 4°C para a remoção de proteínas. Após essa lise, as lâminas foram colocadas lado a lado em uma cuba de acrílico, cobertas com tampão de eletroforese, pH > 12 (1 mM de EDTA pH 10, 300 mM de NaOH), mantidas em repouso por 30 minutos, para que ocorresse a expressão de danos ao DNA e, posteriormente, submetidas à corrida eletroforética, utilizando 25V a 300mA (PHARMACIA) por 30 minutos a 4°C. As lâminas foram então neutralizadas três vezes, por 5 minutos cada, com tampão Tris (0,4 M; pH 7,5), coradas com 50µl de brometo de etídio (20µg/ml - SIGMA), cobertas com lamínulas e mantidas em uma câmara úmida protegida da luz. Todas as etapas após a 2ª lise foram conduzidas sem iluminação artificial, para impedir qualquer indução de dano adicional ao DNA.

4.8.1. Análise das lâminas

As lâminas foram examinadas em um microscópio de fluorescência (CARL ZEISS), com aumento de 200x, equipado com filtro de excitação de 515-560 nm e um filtro de barreira de 590nm. A avaliação da alteração nuclear foi realizada pela categoria de dano: análise baseada no aspecto visual dos cometas, agrupando-os em 5 classes (0, I, II, III, IV) pré-definidas de acordo com os critérios estabelecidos por Visvardis et al. (1997), levando-se em consideração a quantidade de DNA na cauda do cometa, intensidade de fluorescência, comprimento da cauda e diâmetro da cabeça (Figura 5). Cometas com cabeças brilhantes e sem caudas aparentes foram classificados como sendo classe 0 (células sem migração de DNA), cometas com cabeças muito pequenas e com caudas longas e difusas foram classificados como sendo classe IV (células muito danificadas). Cometas com características intermediárias foram divididos e classificados como sendo das classes I, II e III.

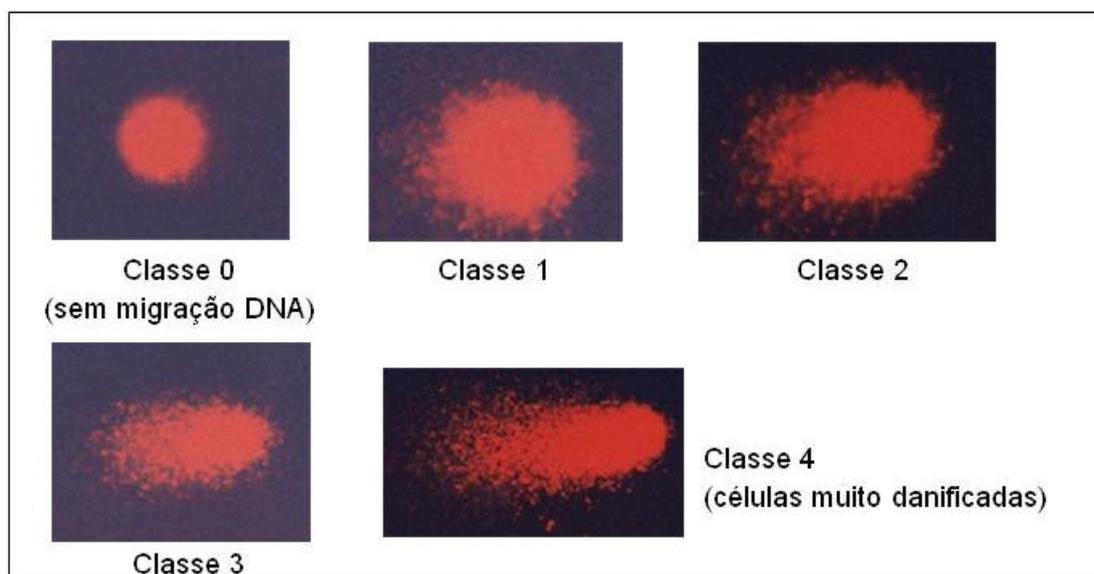


Figura 5: Categoria de dano (0 a 4) de acordo com a fluorescência, tamanho da cauda e diâmetro da cabeça do COMETA.

Nota: classificação dos núcleos segundo Sing et al. (1988).

4.9. Análise estatística

Para a análise dos dados sobre taxa de maturação e ação clastogênica dos oócitos, foi utilizado o teste t de Student ($p < 0,01$), no qual foi avaliada a média de oócitos maturados e a média de classes de cometas encontradas nos diferentes grupos testados.

5. RESULTADOS

Para as análises de morfologia e taxa de maturação dos oócitos, foram identificados e selecionados, em estereomicroscópio, 862 oócitos com zona pelúcida intacta, ooplasma uniforme e envolto por no mínimo duas camadas de células do *cumulus*, sendo 214 oócitos controle, 210 oócitos expostos ao BoHV-1, 228 oócitos expostos ao extrato de *A. glazioviana* e 210 oócitos expostos ao vírus e extrato.

A avaliação morfológica foi realizada antes da retirada das células do cumulus dos oócitos, para visualização de seu aspecto geral, e após a sua retirada, para melhor visualização do ooplasma. Já a avaliação da taxa de maturação, ocorreu logo em seguida, com os oócitos já desnudos.

Para a avaliação da ação clastogênica, foram selecionados 1073 oócitos, sendo 210 pertencentes ao grupo *in natura*, 211 ao G-C, 229 ao G-H, 217 ao G-A e 206 ao G-HA. O teste do COMETA foi realizado com oócitos previamente desnudos.

No presente estudo, todas as reações de PCR realizadas nas amostras de líquido folicular e meio de MIV apresentaram resultados negativos quanto à presença do vírus nas mesmas.

5.1. Avaliação morfológica dos oócitos por microscopia óptica

Na avaliação morfológica, após o período de maturação (24 horas), oócitos pertencentes ao G-C apresentaram expansão uniforme das células do cúmulus, classificada como moderada à alta, formando uma massa densa ao redor dos oócitos dificultando até mesmo a visualização do ooplasma, que apresentou coloração castanha e aspecto uniforme (Figura 6). Oócitos pertencentes ao G-H também apresentaram expansão uniforme, porém moderada das células do cumulus, com aparência arredondada, e ooplasma contraído com coloração castanha (Figura 7). Já em oócitos do G-A, notou-se pouca expansão das células do cumulus, classificada como moderada e irregular, com inibição parcial de crescimento, ooplasma retraído e com aspecto granuloso (Figura 8). Oócitos do G-HA, apresentaram inibição parcial ou total de crescimento das células do cumulus, com pouca ou nenhuma expansão, células esparsas, com aspecto arredondado, e ooplasma retraído e granuloso (Figura 9). Ooplasmas de oócitos pertencentes aos dois últimos grupos apresentaram coloração mais escura quando comparados ao grupo controle.

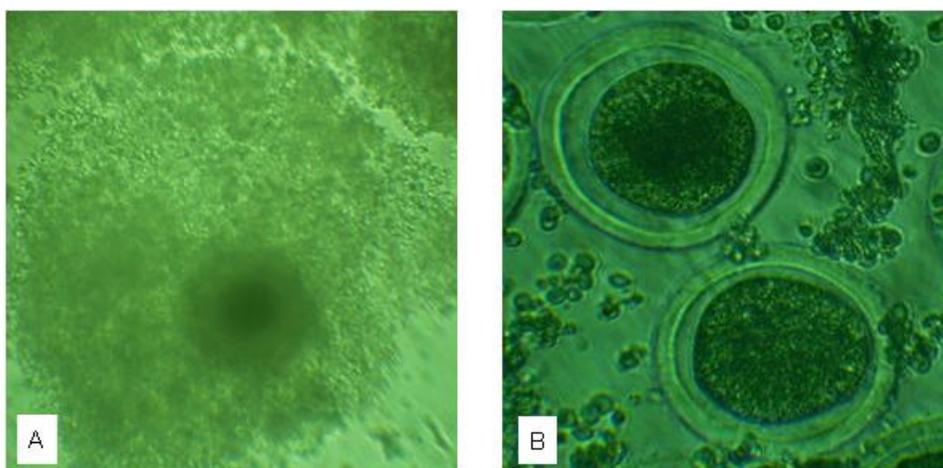


Figura 6: Microscopia de luz de oócitos controle após o período de maturação *in vitro*. A: expansão das células do cumulus (aumento 100X); B: aspecto uniforme do ooplasma e coloração castanha (aumento 200X)

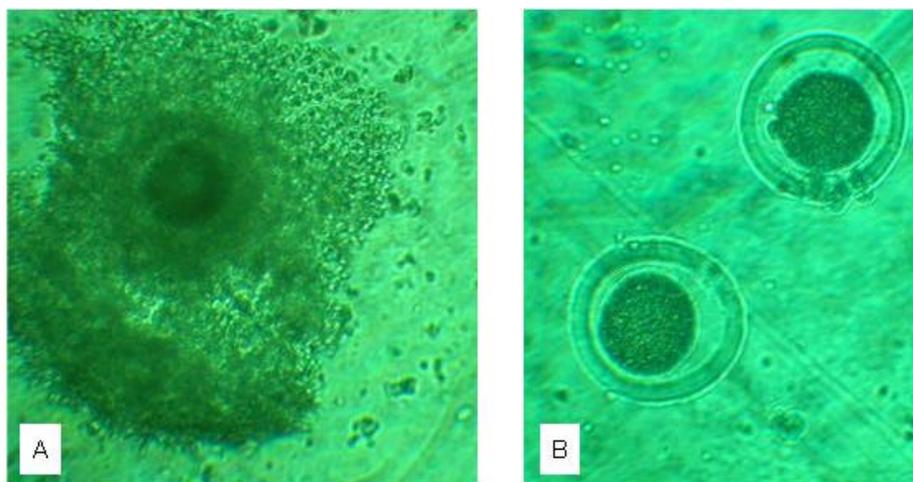


Figura 7: Microscopia de luz de oócitos expostos ao BoHV-1 após o período de maturação *in vitro*. A: expansão moderada das células do cumulus e aspecto arredondado (aumento 200X); B: retração do ooplasma (aumento 200X)

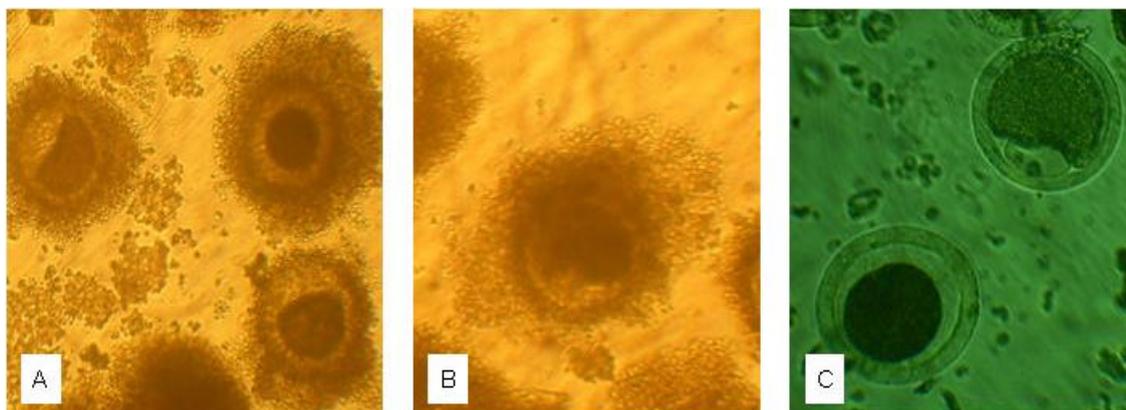


Figura 8: Microscopia de luz de oócitos expostos ao extrato de *A. glazioviana* após o período de maturação *in vitro*. A e B: inibição parcial de crescimento das células do cumulus, apresentando aspecto arredondado (aumento 200X); C: retração do ooplasma com aspecto granuloso, coloração castanho escuro (aumento 200X)

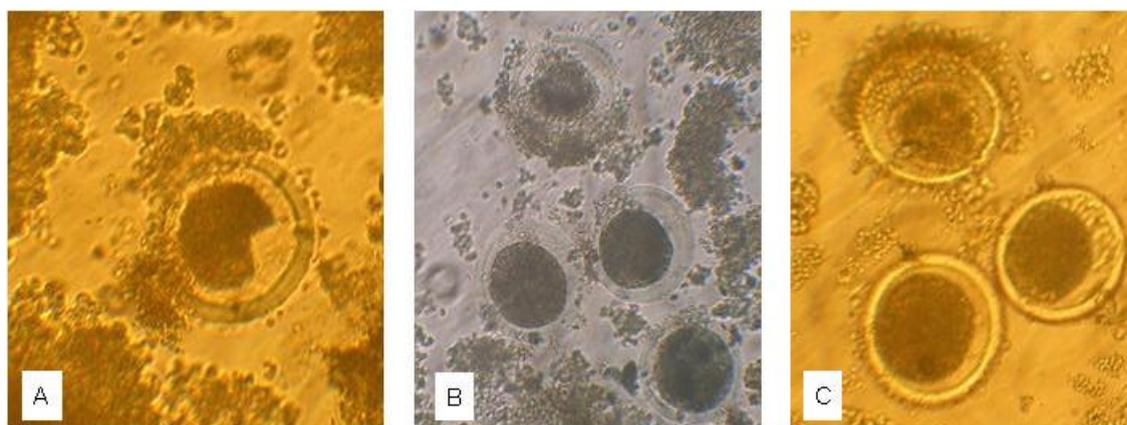


Figura 9: Microscopia de luz de oócitos expostos simultaneamente ao extrato de *A. glazioviana* e ao BoHV-1 após o período de maturação *in vitro*. A e B: inibição parcial ou total de crescimento das células do cumulus, apresentando aspecto grumoso e arredondado (aumento 200X); C: retração do ooplasma com aspecto granuloso, coloração castanho escuro (aumento 200X)

5.2. Avaliação da taxa de maturação dos oócitos

A avaliação da taxa de maturação dos oócitos, baseada na porcentagem de oócitos que apresentaram CP, indicativo de maturação, demonstrou que, no grupo controle (G-C: 214) 174 oócitos apresentaram o CP e foram considerados maturados (81.3%). No grupo infectado com BoHV-1 (G-H: 210), 66 oócitos foram considerados maturados (31.0%). Dos oócitos expostos à *A. glazioviana* (G-A: 228), apenas 13 apresentaram CP (5.7%). Por fim, no grupo exposto simultaneamente ao vírus e extrato (G-HA: 210), somente 3 oócitos foram considerados maturados (1.4%) (Tabela 1).

De acordo com o *t* de Student, verificou-se que a média de maturação dos oócitos pertencentes ao G-H, G-A e G-HA foi menor que no G-C, podendo-se inferir com elevado nível de significância ($p < 0,01$) que a exposição dos oócitos ao vírus e/ou extrato causou uma diminuição significativa da taxa de maturação dos oócitos.

Tabela 1: Percentual de oócitos que apresentaram corpúsculo polar para os grupos avaliados. São Paulo-SP, 2008.

| GRUPOS | % ÓOCITOS COM CORPÚSCULO POLAR |
|------------------|--------------------------------|
| CONTROLE | 81.3 (174/210) |
| BoHV-1 | 31.0 (66/210) |
| EXTRATO | 5.7 (13/228) |
| EXTRATO + BoHV-1 | 1.4 (03/210) |

5.3. Avaliação da ação clastogênica em oócitos

A análise da ação clastogênica nos cinco grupos de oócitos avaliados, baseada no comprimento da cauda do cometa, possibilitou a identificação de todas as classes de cometas (0 a IV) em todos os grupos estudados (Figura 10).

Em oócitos do grupo *in natura*, foram encontrados 41.9% de cometas classe 0, ou seja, sem migração do DNA e portanto sem dano, e em menor quantidade, cometas classe I (34.8%), II (12.4%), III (7.1%) e IV (3.8%). Oócitos do G-C apresentaram 6.1% de cometas classe 0, 47.8% de cometas classe I, 31.3% de cometas classe II, 11.0% de cometas classe III e 3.8% de cometas classe IV. Em oócitos pertencentes ao G-H encontrou-se 4.4% de cometas classe 0, 61.2% de cometas classe I, e em menor quantidade cometas classe II (26.6%), III (4.8%) e IV (3.0%). O G-A apresentou apenas 0.5% de cometas classe 0, quantidades crescentes de cometas classe I (19.8%), II (28.1%) e III (34.1%) e, por fim, 17.5% de cometas classe IV. Oócitos do G-HA apresentaram 3.9% de cometas classe 0, 26.2% de cometas classe I, e quantidades semelhantes de cometas dos níveis II (23.8%), III (22.8%) e IV (23.3%). Para este último grupo, houve um aumento significativo de cometas classe IV (Tabela 2).

Através do teste *t* de Student ($p < 0,01$), verificou-se que houve diferença estatística em relação à média de cometas classe 0 para o grupo *in natura*, cometas classe I para o G-H, cometas classe II para G-C e G-H, cometas classe III para o G-C e G-HA, e de cometas classe IV para o G-HA.

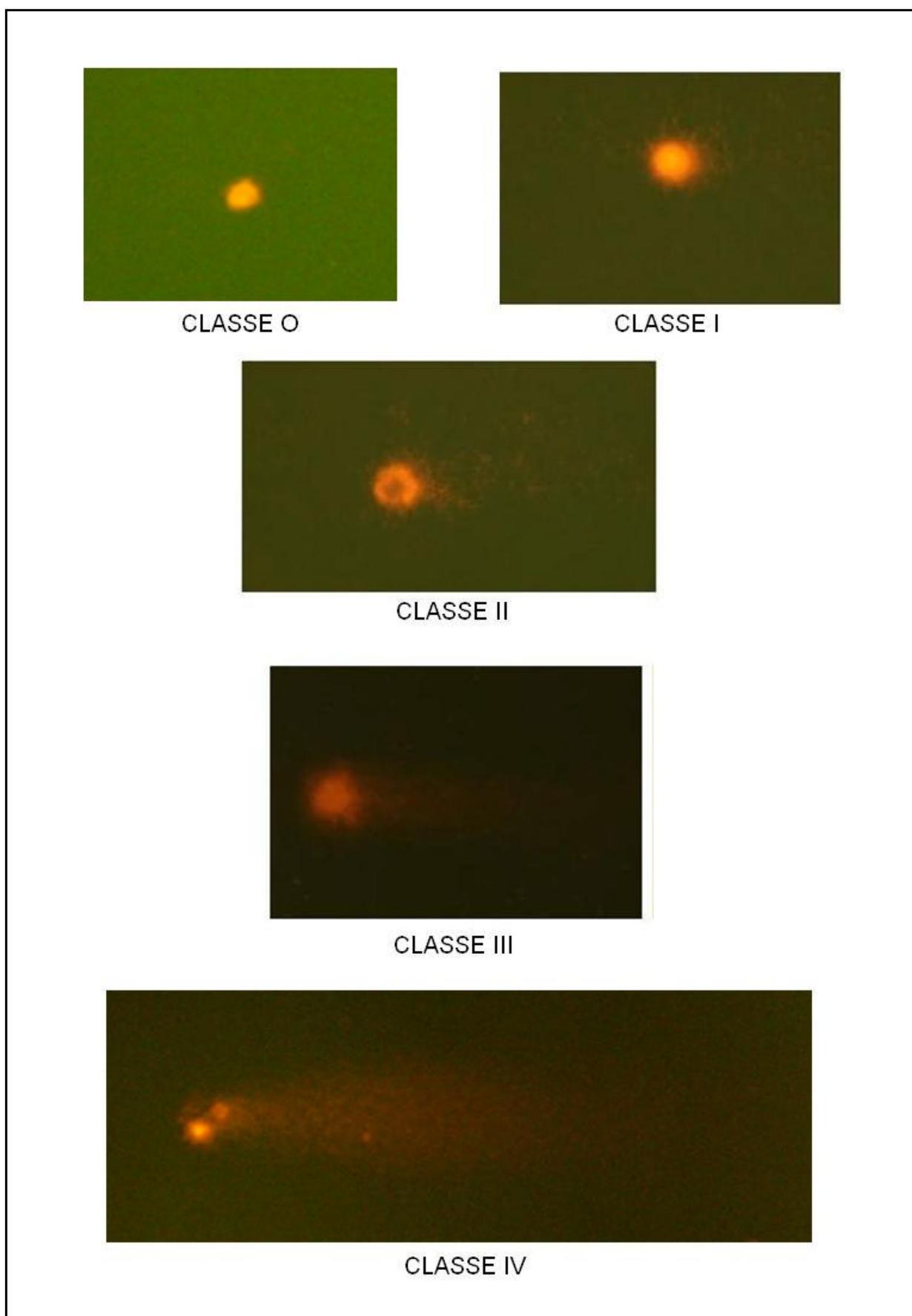


Figura 10: As 5 classes de cometas observadas sob microscópio de fluorescência (aumento 200X)

Tabela 2: Percentual de cometas analisados de acordo com o grau de desintegração do núcleo dos oócitos nos diferentes grupos. São Paulo-SP, 2008.

| GRUPOS | CLASSE 0 | CLASSE 1 | CLASSE 2 | CLASSE 3 | CLASSE 4 |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| IN NATURA | 41.9% | 34.8% | 12.4% | 7.1% | 3.8% |
| CONTROLE | 6.1% | 47.8% | 31.3% | 11.0% | 3.8% |
| BoHV-1 | 4.4% | 61.2% | 26.6% | 4.8% | 3.0% |
| ATELEIA | 0.5% | 19.8% | 28.1% | 34.1% | 17.5% |
| EXTRATO+ BoHV-1 | 3.9% | 26.2% | 23.8% | 22.8% | 23.3% |

6. DISCUSSÃO

A necessidade de um conhecimento mais profundo a respeito das inter-relações de oócitos bovinos com *A. glazioviana* e/ou com BoHV-1 durante o processo de MIV, conduziu-nos a essa pesquisa com o intuito de estudar o efeito citotóxico do extrato da planta e, sua possível interferência na associação desses gametas com o BoHV-1, em relação à alterações na morfologia, efeitos na taxa de maturação e danos no DNA de oócitos experimentalmente infectados.

Existem evidências de que oócitos e ovidutos colhidos em abatedouros comerciais para a produção de embriões *in vitro* possam estar contaminados por patógenos (D'ANGELO, 1998; FERREIRA, 2003). Em relação ao BoHV-1, sabe-se que animais aparentemente saudáveis podem conter o vírus em seus ovários, ovidutos e oócitos (GUERIN et al., 1990). O oócito pode ser infectado antes da ovulação por meio do contato do vírus com o tecido ovariano ou o líquido folicular, e após a ovulação, pelo vírus associado ao sêmen (BIELANSKY et al., 1993).

O período de maturação envolve várias mudanças celulares, que capacitam o gameta à fecundação. É sabido que a qualidade do oócito, sua competência em se desenvolver como embrião e as mudanças citoplasmáticas e nucleares são adquiridas durante o período de maturação (ATHAYDE, 2007).

Em oócitos bovinos, a expansão das células do cumulus é um evento importante durante esse período e, é usada como parâmetro de avaliação da MIV. Essas células, nos oócitos imaturos, se encontram compactadas. Com o processo de maturação, se inicia a secreção de ácido hialurônico que é depositado entre elas, separando-as, causando assim uma expansão dessas células. Essa expansão aumenta gradativamente e resulta em diminuição das ligações metabólicas existentes entre os complexos oócitos cumulus (COCs) (DODE; RUMPF, 2002). Durante o crescimento e maturação oocitária, as células do cumulus assumem o importante papel de suprimento de substrato nutritivo e passagem de componentes químicos reguladores da maturação para o oócito (GONÇALVES et al., 2002), o que sustentaria até o estágio de metáfase II (maturado) no cultivo *in vitro*.

A avaliação morfológica das células do cumulus é muito importante por ser a primeira ferramenta utilizada para a seleção dos oócitos que serão utilizados na fertilização *in vitro*. Dentre os principais parâmetros para avaliação morfológica de oócitos produzidos tanto *in vivo* como *in vitro*, destaca-se a aparência e diâmetro do ooplasma, o diâmetro do oócito, a espessura da zona pelúcida e o tamanho do espaço perivitelínico. No entanto, o uso da morfologia como critério de avaliação de aspecto sanitário é subjetivo e pode gerar

diferentes opiniões entre os avaliadores, visto que não há um guia padronizado para avaliação de oócitos, nem para embriões PIV (KIDSON et al., 2003).

É necessário, portanto, que se tenha um parâmetro para auxiliar os profissionais que atuam na área, transferindo esses embriões PIV, para que, quando se depararem com oócitos ou embriões com alterações morfológicas, tenham maior segurança em sua classificação e, possam assim, estar contribuindo para o controle de disseminação de doenças (ATHAYDE, 2007).

Nesse estudo, com o auxílio da microscopia invertida, pode-se observar a expansão das células do cumulus no grupo controle, notificando a maturação oocitária. No grupo infectado experimentalmente com BoHV-1, os oócitos apresentaram aspecto semelhante ao grupo controle em relação à expansão das células do cumulus, diferindo apenas por apresentar aspecto ligeiramente arredondado. No entanto, após a retirada das células do cumulus, para melhor visualização do oócito, notou-se retração intensa do ooplasma.

Dados obtidos por D'Angelo (1998), mostraram que, tanto oócitos bovinos maturados *in vitro* com BoHV-1 quanto os maturados na ausência do vírus, apresentam morfologia indistinguível. Esse dado torna-se extremamente relevante, uma vez que, quase sempre, a análise de oócitos para a produção de embriões *in vitro* baseia-se somente em observações de oócitos envoltos por camadas de células do cumulus, podendo desta forma, contribuir para a utilização de gametas contaminados e disseminação do vírus no decorrer da manipulação *in vitro*.

Em infecções experimentais de oócitos imaturos pelo BoHV-1, a contaminação parece estar restritamente relacionada à interação do vírus com as células do cumulus, antes do início das etapas de maturação e fecundação *in vitro*. Dessa forma, acredita-se que a aderência do vírus à zona pelúcida (ZP) pode ocorrer na MIV, à partir das células do cumulus contaminadas. Além disso, também foi demonstrado que o vírus pode estar aderido aos oócitos e/ou associado às células do cumulus durante o período de maturação (GUERIN et al., 1990).

Estudos realizados por Ferreira (2003), avaliaram os efeitos morfológicos do BoHV-1 em oócitos bovinos, onde em cortes semi-finos, pode-se observar que o ooplasma dos oócitos infectados apresentaram intensa vacuolização; pela microscopia eletrônica de transmissão, observou-se a existência de filamentos na região da ZP, que se interiorizam e formam comunicações com a membrana vitelina dos oócitos, importantes na passagem de nutrientes e componentes químicos reguladores da maturação dessas células. Após a maturação dos oócitos, notou-se que muitos desses filamentos retraem-se ou desintegram-se, e os canais da ZP se fecham. Com esse estudo, sugere-se que o BoHV-1 possa utilizar tais filamentos para facilitar seu trajeto na ZP.

Sabe-se que, durante o período de maturação ocorrem alterações estruturais e bioquímicas na ZP para habilitar o oócito a ser fecundado (HAFEZ, 2004). Essas alterações aumentam o risco na transmissão de doenças pelos embriões produzidos artificialmente, podendo permitir adsorção viral e infecção dos embriões. Todos esses fatores contribuem para que a MIV seja uma etapa crítica no processo de PIV (GUERIN et al., 1997; VANROOSE et al., 2000).

Oócitos pertencentes ao grupo exposto à *A. glazioviana* apresentaram expansão baixa e irregular com degeneração das células do cumulus, ooplasma retraído, com aspecto granuloso e ligeiramente mais escuro quando comparados a oócitos do grupo controle. Já no grupo exposto concomitantemente ao patógeno e ao extrato, os efeitos foram semelhantes aos ocasionados no grupo exposto apenas com o extrato, porém, mais exacerbados, exibindo oócitos quase que totalmente desnudos.

Resultados obtidos por D'Angelo et al. (2007), onde avaliou-se as possíveis alterações no desenvolvimento de oócitos bovinos expostos experimentalmente à *A. glazioviana*, apresentaram também expansão irregular com degeneração e inibição parcial das células do cumulus e, ooplasma com coloração mais escura e aspecto granuloso. Efeito semelhante, porém intensificado, foi obtido com o aumento da concentração do extrato utilizado, exibindo oócitos quase que totalmente desnudos. Apesar das taxas de maturação não terem sido determinadas, o estudo demonstrou que o extrato apresentou efeito citotóxico tanto em relação à morfologia quanto em sua maturação, já que foram detectadas alterações na expansão das células do cumulus.

Outro estudo, realizado com células epiteliais de oviduto bovino (BOEC), avaliou a sensibilidade dessas células ao extrato de *A. glazioviana*. Os autores observaram efeito citotóxico, diretamente proporcional ao aumento da concentração do extrato, caracterizado pelo rompimento das células, com formação de filamentos celulares, confirmando sua sensibilidade (D'ANGELO et al., 2005).

Em bovinos, a importância da expansão das células do cumulus reflete uma condição de maturação oocitária, podendo ser confirmada quando os oócitos são desnudados, para a observação da formação do CP. No grupo controle, 81.3% dos oócitos maturaram e nos grupos expostos ao BoHV-1, *A. glazioviana* e a ambos, somente 31.0%, 5.7% e 1.4%, respectivamente, liberaram o primeiro CP. Oócitos pertencentes ao grupo infectado com BoHV-1, apesar de quase não diferir morfologicamente do grupo controle, apresentaram taxa de maturação significativa, sendo 2,6 vezes menor quando comparados ao grupo controle, o que evidencia a interação do vírus com os oócitos e a consequente alteração em seu desenvolvimento. Para o grupo exposto à *A. glazioviana*, o percentual de oócitos que apresentou CP representou queda da taxa de maturação de cerca de 14 vezes quando comparadas ao grupo controle e, 5 vezes em relação aos oócitos infectados com

vírus. Já oócitos infectados com o vírus e expostos simultaneamente ao extrato, apresentaram efeito sobre a taxa de oócitos maturados cerca de 58 vezes menor quando comparados ao grupo controle, 22 vezes menor em relação ao grupo infectado com vírus e, 4 vezes ainda menor do que o grupo exposto apenas com *A. glazioviana*. Esses dados sugerem uma ação sinérgica da *A. glazioviana* no efeito do vírus sobre os oócitos, causando uma maior interação entre os mesmos.

Quanto à avaliação da ação clastogênica em oócitos, nosso estudo demonstrou que 41.9% dos oócitos pertencentes ao grupo *In natura* apresentaram DNA íntegro, sem a presença de quebras; 34.8% dos oócitos avaliados apresentaram ação clastogênica classe I, onde os danos no DNA são de baixa intensidade. Para esse grupo, verificou-se que, quanto maior o número de núcleos apresentando cometa, menor é o número de núcleos pertencentes a cada classe, sendo a classe IV responsável por apenas 3.8% de cometas.

Para o grupo controle, 6.1% dos oócitos não apresentaram dano no DNA. Comparando-os com o grupo *in natura*, esses resultados demonstram que a quantidade de oócitos classe 0 pertencente ao grupo controle foi 6,8 vezes menor. Essa queda na porcentagem de oócitos íntegros em relação aos dois grupos mostra que o próprio sistema *in vitro*, incluindo alterações do ambiente e a própria manipulação das células gaméticas poderia propiciar quebras na molécula de DNA dos oócitos.

Resultados semelhantes foram obtidos por Belotti et al. (2008) em estudos de ação clastogênica da *Escherichia coli* em células epiteliais de oviduto bovino. Nesse trabalho, o dano no DNA representado pelo teste do COMETA foi independente da exposição ou não ao patógeno, sendo consideravelmente relevante o número de cometas encontrado nos grupos *in natura* e controle, devido às ações impostas pelo meio ambiente e processos de manipulação.

Apesar dos cometas de classe I a IV observados no grupo controle apresentarem o mesmo padrão decrescente do grupo *in natura*, o número de cometas observados no grupo controle para essas classes foi superior ao encontrado no grupo *in natura*.

Vale ressaltar que, a utilização de oócitos obtidos de ovários oriundos de abatedouros, e provavelmente de vacas senescentes, desnutridas, sofrendo situações estressantes ou até com problemas reprodutivos, poderia justificar a quantidade de células danificadas em oócitos *in natura*.

Oócitos infectados com BoHV-1 tiveram taxa elevada de cometas pertencentes à classe I (61.2%), seguida por cometas de classe II (26.6%). Esses dados indicam que, de alguma forma, o vírus é capaz de induzir quebras na molécula de DNA dos oócitos provocando ação clastogênica de média intensidade. Comparando os dados das duas classes de cometas que mais se destacam nesse grupo com oócitos controle, nota-se que em ambos os grupos, cometas de classes I e II, representados por danos de baixa e média

intensidade, somam mais de 75% do total de oócitos danificados. Esses resultados dão suporte aos dados encontrados por Melo et al. (2004), onde trabalhando com a mesma estirpe viral e com o teste do COMETA, puderam constatar que nem sempre, alterações morfológicas em oócitos PIV são decorrentes de infecções com patógenos.

A exposição dos oócitos ao extrato de *A. glazioviana*, demonstrou que apenas 0.5% dos oócitos avaliados, ou seja, apenas 1 dos 217, não apresentou dano no DNA. Oócitos tratados com o extrato da planta tiveram uma frequência maior de cometas de classe III (34.1%), seguido por cometas classe II (28.1%). O número de cometas classe II desse grupo foi semelhante à quantidade de cometas da mesma classe encontrada no grupo infectado com vírus (26.6% para classe II), no entanto, a quantidade de cometas classe III observada no grupo de oócitos expostos à *Ateleia glazioviana* apresentou um aumento de cerca de 7 vezes frente ao grupo infectado com vírus, e 3 vezes maior que o grupo controle. Em relação ao número de cometas de classe IV, representada por oócitos extremamente danificados, esse mesmo grupo, obteve uma porcentagem de oócitos de quase 6 vezes maior quando comparado ao grupo infectado com vírus. Possivelmente, a citotoxicidade da *A. glazioviana* leva à uma ação genotóxica mais acentuada que a ocasionada pelo BoHV-1

Já em relação ao grupo de oócitos expostos simultaneamente ao vírus e extrato da planta, nota-se que as frequências de classes que determinam ação clastogênica (I - IV) apresentam distribuição homogênea. Esses resultados, quando comparados com os dados obtidos com os grupos expostos separadamente ao vírus e extrato de planta, ressaltam a quantidade de cometas classe IV observados quando há ação concomitante de ambos. Há um aumento significativo de cometas extremamente danificados para esse grupo, representado pela maior porcentagem de cometas classe IV em relação a todos os outros grupos avaliados. A ação tóxica da *A. glazioviana* poderia exercer um maior dano à zona pelúcida de oócitos, permitindo então, a entrada de uma concentração maior de partículas virais, o que talvez explicaria o aumento de cometas de classe III e IV. Dessa forma, o extrato estaria favorecendo a ação de virulência do BoHV-1.

A técnica de produção de embriões bovinos *in vitro*, em si, já é limitante ao causar uma ação clastogênica e, portanto, considerada uma desvantagem. Atualmente, apenas 30 a 40% dos oócitos alcançam o estágio de blastocisto. Isso não se deve somente à ação de patógenos, mas a própria técnica. Sabe-se que aproximadamente 70% de casos de falhas no desenvolvimento embrionário são atribuídas às alterações celulares de ordem genética (PIRES et al., 2005).

Os dados obtidos com o teste do COMETA tornam-se relevantes quando se leva em consideração que, além da preocupação com o aspecto sanitário de biotécnicas, a ação clastogênica exercida por patógenos, pelo meio ambiente, e/ou pelo próprio sistema *in vitro*,

pode trazer sérias conseqüências como alterações na fecundação e inviabilização de embriões produzidos *in vitro* (PIRES et al., 2005).

Células *in vitro*, apresentam uma maior freqüência de falhas nos mecanismos de reparo de DNA, portanto, são mais susceptíveis às mutações (BELLOTI et al., 2008). Entretanto, modelos experimentais *in vitro* que se utilizam de células somáticas ou gaméticas, mimetizam com maior eficácia situações *in vivo*. Podemos sugerir então que, possivelmente, alterações que comprometem o desenvolvimento embrionário em PIV, nem sempre estão associadas a patógenos e/ou xenobióticos.

A fim de se avaliar experimentalmente o efeito da interação do vírus e extrato com oócitos bovinos provenientes de abatedouro, a realização das reações de PCR no material coletado excluiu a possibilidade de uso de oócitos já contaminados pelo BoHV-1, permitindo a obtenção de resultados mais fidedignos. No entanto, a ausência de amostras positivas para a detecção do BoHV-1 não exclui a possibilidade de animais provenientes de abatedouro estarem livres da infecção pelo vírus.

A análise geral dos resultados obtidos no presente trabalho carece de uma ponderação fundamental quanto à possibilidade de extrapolar observações feitas em sistemas *in vitro* para sistemas *in vivo*.

Entre outros fatores, a presença do sistema imune, a organização tecidual e os mecanismos de excreção de substâncias, tornam o sistema *in vivo* extremamente complexo, exigindo cautela para extrapolar observações feitas *in vitro*.

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados, pode-se concluir que:

- A *A. glazioviana* provocou alterações morfológicas representativas em oócitos, evidenciando sua citotoxicidade.
- Tanto o BoHV-1 quanto a *A. glazioviana* inibiram a taxa de maturação oocitária, no entanto, a inibição ocasionada pelo extrato foi 5,4 vezes maior que a gerada pelo vírus.
- Oócitos expostos simultaneamente ao BoHV-1 e ao extrato de *A. glazioviana*, apresentaram taxa de maturação cerca de 58 vezes menor que o grupo controle, 22 vezes menor que o grupo infectado com o vírus, e 4 vezes menor que o grupo exposto ao extrato. Verificou-se ainda, efeitos exacerbados de alterações morfológicas quando comparados aos demais grupos tratados.
- A presença de cometas foi independente da exposição ou não ao vírus e/ou extrato de planta em todos os grupos, porém, houve uma variação na quantidade e classe de cometas. A maior porcentagem de cometas classe IV foi observada no grupo exposto simultaneamente ao vírus e extrato.
- A exacerbção dos efeitos do vírus em oócitos, nos parâmetros testados, pode ser decorrente de uma ação sinérgica do extrato da planta em relação ao BoHV-1.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMANN, M.; PETERHANS, E.; WYLER, R. DNA of bovine herpesvirus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. **American Journal of Veterinary Research.**, v.43, p.36-40, 1982.

ACKERMANN, M.; WEBER, H.P.; WYLER, R. Aspects of infectious bovine rhinotracheitis eradication programmes in a fattening cattle farm. **Preventive Veterinary Medicine**, v.9, n.2, p.121-130, 1990.

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

ATHAYDE, C.S. **Interação do Parvovírus suíno com oócitos suínos durante o período de maturação *in vitro***. 2007. 48f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, 2007.

AX, R.L.; DALLY, M.R.; DIDON, B.A.; LENZ, R.W.; LOVE, C.C.; VARNER, D.D.; HAFEZ, B.; BELLIN, E. Artificial insemination. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reproduction in Farm Animals**. Seventh edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. Chapter 26, 376-389.

BARRETO, L.S.S. **Avaliação dos efeitos da inibição da maturação nuclear e de antioxidantes sobre a maturação oocitária, fecundação e desenvolvimento embrionário bovino *in vitro***. 2007. 88f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2007.

BELLOTI, L.; PAVÃO, D.L.; DAMASCO, K.; NASSAR, A.F.C.; HARAKAVA, R.; D'ANGELO, M. Ação clastogênica da *Escherichia coli* produtora da toxina shiga (STEC) em células epiteliais de oviduto bovino (BOEC). In: **6° CICAM - Congresso de Iniciação Científica em Ciências Agrárias, Biológicas e Ambientais**, São Paulo, 2008.

BIELANSKI, A.; LOEWEN, K.S.; DEL CAMPO, M.R.; SIRARD, M.A.; WILLADSEN, S. Isolation of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in association with the *in vitro* production of bovine embryos. **Theriogenology**, v.40, p.531-38, 1993.

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, 1997.

BOLS, P. E. J.; YSEBAERT, M. T.; VAN SOOM, A.; KRUIF, A. Effects of needle tip bevel aspiration procedure on the morphology and developmental capacity bovine compact Cumulus oocyte complexes. **Theriogenology**, v. 47, p. 1221- 1236, 1997.

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

CALADO, A.M.; ROCHA, E.; COLAÇO, A.; SOUSA, M. Stereologic characterization of bovine (*Bos taurus*) cumulus-oocyte complexes aspirated from small follicles during the diestrous phase. **Biology of Reproduction**, v.65, p.1383-91, 2001.

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

D'ANGELO, M.; RODRIGUES, M.A. LA R. Amitraz effects on foot-and-mouth disease virus in mammalian cells *in vitro*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.33, p. 163-167, 1996.

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

D'ANGELO, M ; LOLLA, M. N. ; HARAGUCHI, M. ; GALUPPO, A. G. ; FONTENELLE, A. D. B. ; PICCOLOMINI, M. M. ; LATORRE, A. O. ; XAVIER, F. G.; MINERVINO, A. H. H.; GORNIK, S. L. Avaliação da sensibilidade da cultura primária de células epiteliais de oviduto bovino à Ateleia glazioviana. In: 18ª Reunião Anual do Instituto Biológico, 2005, São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, 2005, v.72, supl.2, p.19, 2005.

D'ANGELO, M.; PICCOLOMINI, M.M.; GOES, A.C.; DAMASCO, K.G.; PALAZZI, E.G.; PAVÃO, D.L.; FURLANETO, C.I.; HARAGUCHI, M. Estudos preliminares sobre a avaliação da cito toxicidade da Ateleia glazioviana em oócitos bovinos durante o período de maturação *in vitro*. In: VIII Jornada Paulista de Plantas Mediciniais, 2007, São Paulo. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v.5, n.3, p.147, 2007.

DODE, M.A.N.; RUMPF, R. Produção *in vitro* de embriões na espécie bovina. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.26, p.32-37, 2002.

ENGELS, M.; STECK, F.; WYLER, R. Comparison of the genomes of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis virus strain by restriction endonuclease analysis. **Archives of Virology**, v.67, p.169- 174, 1981.

ENGELS, M.; ACHERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Veterinary Microbiology**, v.53, n.1-2, p.3 -15, 1996.

FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. (Eds.). Virus Taxonomy, **VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. London: Elsevier/Academic Press. 2005.

FERREIRA, C.Y.M.R. **Infectividade de estirpes do Herpesvírus bovino tipo 1 em oócitos e culturas de células epiteliais de ovidutos bovinos**. 2003. 68f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal, 2003.

FERREIRA, C.Y.M.R.; PIATTI, R.M.; MIYASHIRO, S.; GALUPPO, A.G.; ZERIO, N.M.C.; SÂMARA, S.I.; D'ANGELO, M. Ocorrência do Herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1) no líquido folicular e células epiteliais de oviduto bovino. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.27, n.3, p.309-311, 2005.

FIELDS, B.N., KNIPE, D.M. **Virology**, New York: Raven Press, 1992, v.2, 2419p.

FIGUEIREDO, J.R.; GONÇALVES, P.B.D.; VISINTIN, J.A. Biotécnicas e reprodução animal: Princípios básicos, importância e desafios das biotécnicas aplicadas à reprodução animal. **Revista Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v.14, n.44, 2008.

FLORES, E.F.; WEINBLER, R.; VOGEL, F.G.F.; ROEHE, P.M.; ALFIERI, A.A.; PITUCO, E.M. A infecção pelo vírus da diarreia viral bovina no Brasil – histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, n.3, p.125-134, 2005.

GALLUPO, A.G. **Avaliação da sensibilidade de zigotos murinos à *Brucella abortus* para o estabelecimento de um modelo experimental em estudos de interações embriões/patógenos**. São Paulo, 2005. 74f. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo - Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2005.

GALVÃO, C.L.; DORIA, J.D.; ALICE, F.J. Anticorpos neutralizantes para o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos, em bovinos do Brasil. **Boletim do Instituto de Biologia da Bahia**, v.6, p.15-25, 1963.

GARDNER, D.K.; LANE, M.; SPITZER, A. Enhance rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. **Biology of Reproduction**, v.50, p.390-400, 1994.

GAVA A.; BARROS C.S.L. Field observations of *Ateleia glazioviana* poisoning in cattle in Southern Brazil. **Veterinary and Human Toxicology**, v.43, n.1, p. 37-41, 2001.

GAVA A.; BARROS C. S. L.; PILATI C.; BARROS S.S.; MORI A.M. Intoxicação por *Ateleia glazioviana* (Leg.Papilionoideae) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n.2, p.49-59, 2001.

GIBBS, E. P. J.; RWEYEMAMU, M. M. Bovine herpesvirus. Part. I. Bovine herpesvirus I. **Veterinary Bulletin**, v. 47, p. 317 - 343, 1977.

GILCHRIST, R.B.; RITTER, L.J.; ARMSTRONG, D.T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Animal Reproduction Science**, v.82/83, p.431-446, 2004.

GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. **Theriogenology**, v.67, p.6-15, 2007.

GIVENS, M.D.; GALIK, P.K.; RIDELL, K.P.; STRINGFELLOW, D.A. Validation of a reverse transcription nested polymerase chain reaction (RT-nPCR) to detect bovine virus diarrhea virus (BVDV) associated whit in vitro-derived bovine embryos and co-cultured cells. **Theriogenology**, v.56, p.787-799, 2001.

GONÇALVES, P.B.D.; VISINTIN, J.A.; OLIVEIRA, M.A.L.; MONTAGNER, M.M.; COSTA, L.F.S. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002. p.195-226.

GONÇALVES, P.B.D.; BARRETA, M.H.; SANDRI, L.R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A.Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.212-217, 2007.

GUERIN, B.; MARQUANT-LEGUIENNE, B.; ALLIETTA, M.; HARLAY, T.; THIBIER, M. Effects de la contamination par le BHV-1 sur la maturation et fecundation *in vitro* des ovocytes des bovines. In: **Recueil de Medecine Veterinaire**, v.66, p. 911-17, 1990.

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

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. Micromanipulação de gametas e embriões: fertilização *in vitro* e transferências de embriões (FIV/TE). In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. São Paulo: Manole, 2004. p.447-455.

HARAGUCHI, M. Plantas tóxicas de interesse na pecuária. **O Biológico**, v.65, n.1/2, p.37-39, 2003.

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

KAHRS, R.F. Infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis. In: KAHRS, R.F. (Ed.), **Viral Disease of Cattle**. Iowa State University Press, Ames, 2001. p. 159-170.

KIDSON, A.; SCHOEVERS, E.J.; LANGENDIJK, P.; VERHRIJDEN, J.H.M.; COLENBRANDES, B.; BEVERS, M.M. The effect of oviductal epithelial cell co-culture during *in vitro* maturation on sow oocyte morphology, fertilization and embryo development. **Theriogenology**, v.59, p.1889-1903, 2003.

KIRKBRIDE, C.A. Mananging and outbreak of liverstock abortion 2:diagnosis and control of bovine abortion. **Veterinary Medicine**, v.80, n.5, p.70-79, 1985.

LARSON B.L. Diagnosing the cause of bovine abortions and other perinatal deaths. **Veterinary Medical**, v.81, p.478-486, 1996.

LONERGAN, P. Produção *in vitro* de embriões bovinos – lidando com problemas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36, supl. 2, p.349-360,2008.

LUCHIARI FILHO, A. Produção de carne bovina no brasil: qualidade, quantidade ou ambas. In: **SIMBOI. Simpósio sobre Desafios e Novas Tecnologias na Bovinocultura de Corte**, 2006, Brasília, DF. Disponível em <http://www.upis.br/simboi/anais/>. Acesso em 13 fev 2008.

MARONA, H.R.N.; LANGELOH, A.; SCHENKEL, E.P. Atividade abortiva de *Ateleia glazioviana* (Leg. Papilionoideae) em ratas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.12, n.3, p.81-83, 1992.

MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F. 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.

MELO, G.M.; SOUZA, R.J.; ATHAYDE, C.S.; ROJAS, N.; SUZUKI, M.F.; D'ANGELO, M. Ação clastogênica do Herpesvirus bovino tipo 1 com oócitos bovinos maturados *in vitro*. In: XVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2004, Barra Bonita. **Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões**, v.32, p.126, 2004.

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.

MINGOTI, G.Z. Aspectos técnicos da produção *in vitro* de embriões bovinos. In: **Tópicos Avançados em Biotecnologia da Reprodução**, 2005, Jaboticabal, SP. Jaboticabal, SP: Funep, 2005. CD-ROM.

MINGOTI, G.Z. Aspectos técnicos da Produção *In Vitro* de Embriões bovinos: Importância da Maturação *In Vitro*. **Boletim técnico de divulgação digital**. 2007. Disponível em: www.bioembryo.com.br/v2/. Acesso em: 20 mai 2008.

MONNIAUX, D., MONGET, P., BESNARD, N., HUET, C., PISSELET, C. Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants. **Theriogenology**, v. 47, p.3-12, 1997.

MURRAY, R.D. A field investigation of the causes of abortion in dairy cattle. **Veterinary Record**, v.127, p. 543-547, 1990.

NEVES, J.P.; GONÇALVES, P.B.D.; OLIVEIRA, J.F.C. Fatores que afetam a eficiência reprodutiva na vaca. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, p.99-106, 1999.

OIE. WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. **Terrestrial Animal Health Code**. 13 Ed. 2004. Paris: OIE. Disponível em http://www.oie.int/eng/normes/mcode/en_chapter_2.3.5.htm. Acesso em: 30 set. 2006.

ORTEGA G.G.; SCHENKEL E.P. Isoflavonas de *Ateleia glazioviana* Baill (Leguminosae). **Cadernos de Farmacologia**, v.2, p.133-161, 1986.

ORTEGA, G.G.; SCHENKEL, E.P. Ichthyotoxic activities of *Ateleia glazioviana* Baill and *Thinouia coriacea*. **British Journal of Ethnopharmacology**, v.20, p.81-84, 1987.

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

PAVLOK, A.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.31, p.63-67, 1992.

PIETERSE, M.C., VOS, P.L.A.M., KRUIP, T.A.M., WURTH, Y.A., VAN BENEDEN, T.H., WILLEMSEE, H.A. AND TAVERNE, M.A.M. Transvaginal ultrasounded guided follicular aspiration of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.35, p.19-24, 1991.

PIRES, R.M.L.; ALVAREZ, R.H.; LIGORI, A.C.; COELHO, L.A.; MARTINEZ, A.C. Anomalias cromossômicas no início do desenvolvimento de embriões zebuínos produzidos *in vitro*. **B. Indústria. An im**, v.62, n.2, p.135-140, 2005.

RENESTO, A. **Associação das biotécnicas: aspiração folicular guiada por ultrasonografia e superovulação na produção *in vitro* e *in vivo* de embriões bovinos**. 2004. 59p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2004.

RICHTZENHAIN, L.J.; ALFIERI, A.A.; LEITE, R.C.; WEIBLEN, R.; MORO, E.; UMEHARA, O. Pesquisa de anticorpos séricos contra o herpesvírus bovino tipo 1 em fêmeas bovinas de propriedades com histórico de problemas reprodutivos, localizadas em 21 estados brasileiros. **Arquivos de Instituto Biológico**, v.66 (supl.) p.127, 1999.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, MP.; LONERGAN, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, p. 234–48, 2002.

ROBERT, C.; GAGNÉ, D.; BOUSQUET, D.; BARNES, F.L.; SIRARD, M. Differential display and suppressive subtractive hybridization used to identify granulose cell messenger RNA associated with bovine oocyte developmental competence. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 64, p. 1812-1820, 2001.

ROCHA, M.A.; BARBOSA, E.F.; GUIMARÃES, S.E.F.; DIAS NETO, E.; GOUVEIA, A.M.G. A high sensitivity-nested PCR assay for BHV-1 detection in sêmen of naturally infected bulls. **Veterinary Microbiology**, v.63, p.1-11, 1998.

ROCHA, M.A.; GOUVEIA, A.M.G.; LEITE, R.C. Herpesvírus bovino tipo 1 no sêmen. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n.2, p.373-380, 1999.

ROMERO-ARREDONDO, A.; SEIDEL, G.E. Effects of bovine follicular fluid on maturation of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 41, n.2, p.383-394, 1994.

RUFINO, F.A.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A. Impacto do Herpesvírus bovino 1 e do vírus da Diarréia Viral Bovina na transferência de embriões. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, n. 1, p. 78-84, 2006.

RUHNKE, H.L. Mycoplasmas associated with bovine genital tracts infections, In: Whitford, H. W.; Rosenbusch, R.F.; Lauerman, L.H. (eds). **Mycoplasmosis in Animals: Laboratory Diagnosis**. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1984, p.56-62.

SENEDA, M.M.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; ANDRADE, E.R. Aspectos técnicos e biológicos da obtenção de oócitos bovinos: revisão de literatura. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 101-110, 2002.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, n.175. p.184-191, 1988.

SIRARD, M.A.; Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theoriogenology**, v. 55, p.1241-1254, 2001.

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

STOLF, L.; GAVA, A.; VARASCHIN, M.S.; NEVES, D.S.; MONDADORI, A.J.; SCOLRARI, L.S. Aborto em bovinos causado pela ingestão de *Ateleia glazioviana* (Leg. Papilionoideae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.14, n.1, p.15-18, 1994.

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

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

TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Otimização da reação em cadeia pela polimerase (*semi-nested* PCR) para a detecção do herpesvírus bovino tipo 1 em fragmentos de órgãos fetais e em sêmen de bovinos naturalmente infectados. **Semina: Ciências Agrárias**, v.24, p.43-56, 2003.

TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Bovine herpesvirus type 1 abortions detected by a semi nested-PCR in Brazilian cattle herds. **Research in Veterinary Science**, v.79, n.1, p.85-88, 2005.

THIBIER, M. A contrasted year for the world activity of the animal transfer industry: a report from the IETS data retrieval committee. **International Embryo Transfer Society Newsletter**, v.20, n.4, p.13-19, 2002.

TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; VARGAS, P. V. **Plantas tóxicas do Brasil**. Rio de Janeiro: Helianthus, 2000. 320 p.

VALLE, E.R.; ANDREOTTI, A.R.; THIAGO, R.L.S. **Técnicas de manejo reprodutivo em bovinos de corte**. Campo Grande: Embrapa Gado de corte, 2000. 61p.

VAN LANGENDONCKT, A.; DONNAY, I.; SCHUURBIERS, N.; AUQUIER, P.; CAROLAN, C.; MASSIP, A. Effects of supplementation with fetal calf serum on development of bovine embryos in synthetic oviduct fluid medium. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.109, p.87-93, 1997.

VANROOSE, G.; NAUWYNCK, H.; VAN SOON, A.; VANOPDENBOSCH, E.; DE KRUF, 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.; KRUIF, A.; VAN SOOM, A. Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.131-143, 2000.

VIANA, J.H.M. Por que a fertilização *in vitro* faz tanto sucesso. **Boletim técnico de divulgação digital**. 2005. Disponível em:

http://www.portaldbo.com.br/genetica/imagens/pdfs/mat_1956.pdf. Acesso em: 18 fev 2007.

VISVARDIS, E.E.; TASSIOU, A.M.; PIPERAKIS, S.M. Study of DNA damage induction and repair capacity of fresh and cryopreserved lymphocytes, exposed to H₂O₂ and ⁶⁰Co-irradiation, with the alkaline comet assay. **Mutation Research**, v. 383, p. 71-80, 1997.

WEIBLEN, R. Doenças víricas que interferem na produção leiteira. In: CHARLES, T.P., FURLONG. **Doenças dos bovinos de leite adultos**, Coronel Pacheco: EMBRAPACNPGL, 1992, 174p.

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

WYLER, R.; ENGELS, M.; SCHWYZER, M. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV-1). In: WITTMANN, G. **Herpesviruses Diseases of Cattle, Horse and Pigs**. Hingham MA: Kluwer Academic Publishers, 1989. p.1-72.

ZERIO, N.M.C. **Interação do *Neospora caninum* com oócitos bovinos durante o período de maturação**. 2007. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, 2007.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)