

MATURAÇÃO NUCLEAR DE OVÓCITOS SUBMETIDOS A INFECÇÃO IN VITRO EM DIFERENTES TITULAÇÕES DO BOVINE HERPESVIRUS 1 (BoHV-1)

Rafael Cortes Pedron Gomes¹
Vanessa Lopes Dias Queiroz de Castro²
Breno Gomes dos Santos³
Dyones Henrique Monteiro Cruz⁴

rafaelcortespq@gmail.com

ÁREA DE CONHECIMENTO: Ciências Agrárias

PALAVRAS-CHAVE: *Bovine herpesvirus 1*, infecção de ovócitos, maturação ovocitária, reprodução

INTRODUÇÃO

O Brasil possui atualmente o maior rebanho comercial de bovinos do mundo, com um efetivo animal de 218,2 milhões de cabeças no ano de 2016, (IBGE, 2017). Esses expressivos números são respaldados pela crescente difusão do uso das biotécnicas reprodutivas como a Inseminação Artificial e a Transferência de Embriões (produzidos *in vivo* ou *in vitro*). As chamadas biotécnicas da reprodução animal possibilitaram a multiplicação da genética de animais de alto valor zootécnico por meio da inseminação artificial, da transferência de embriões e da fertilização *in vitro* (FIGUEIREDO *et al.*, 2007). A maturação nuclear ovocitária é um processo fundamental para que os ovócitos se tornem competentes e está inclusa em uma das etapas da fertilização *in vitro*. Desta forma, fatores que possam vir a interferir nas taxas de maturação são de extrema relevância, já que afetará diretamente os resultados obtidos. O uso das biotecnologias, no contexto geral, têm contribuído para a redução na transmissão de patógenos, no entanto, ressalta-se que não se deve desconsiderar os riscos de transmissão (THIBIER e WRATHALL, 2012). O *bovine herpesvirus 1* (BoHV-1) é um vírus cosmopolita, de grande importância econômica, fácil disseminação e difícil controle, estando amplamente disseminada nos rebanhos bovinos de corte e de leite, tanto no Brasil quanto na maioria dos países onde a pecuária bovina é uma importante atividade econômica (MÉDICI *et al.*, 2000; TAKIUCHI *et al.*, 2001). Tendo em vista a elevada frequência da infecção, esta doença causa perdas econômicas significativas à pecuária bovina, interferindo nos desempenhos produtivos e reprodutivos. Deste modo, a infecção provocada pelo BoHV-1 é motivo de preocupação de técnicos e principalmente de pecuaristas

¹ Acadêmico do curso de Medicina Veterinária – Faculdade Vértice – UNIVÉRTIX – Matipó.

² Professora da Faculdade Vértice-UNIVÉRTIX, Médica Veterinária e Doutora em Medicina Veterinária – Universidade Federal de Viçosa.

³ Acadêmico do curso de Medicina Veterinária – Faculdade Vértice – UNIVÉRTIX – Matipó.

⁴ Acadêmico do curso de Medicina Veterinária – Faculdade Vértice – UNIVÉRTIX – Matipó.

com relação ao seu impacto negativo na reprodução (HOUE, 1999; STRINGFELLOW e GIVENS, 2000; TAKIUCHI *et al.*, 2005).

A transmissão do BoHV-1 pode ocorrer por inalação de aerossóis contaminados ou por contato direto com secreções nasais de animais infectados. Ambas as formas de transmissão são consideradas importantes na disseminação do vírus em rebanhos criados sob condições confinadas (VAN DONKERSGOED e BABIUK, 1991). A transmissão indireta ocorre principalmente pela ingestão de água e alimentos contaminados e pelo uso, nas coletas de sêmen, de vaginas artificiais contaminadas (ENGELS e ACKERMANN, 1996). Outra forma de transmissão é a venérea, pela monta natural e/ou IA a que, nesta última, o sêmen desempenha papel fundamental na cadeia epidemiológica (PHILPOT, 1993). O sêmen pode se contaminar durante a ejaculação, quando o líquido seminal entra em contato com a mucosa contaminada ou ainda pela Transferência de Embriões, em que o patógeno pode estar associado à zona pelúcida ou estar presente nos líquidos, onde o embrião é transferido (D'ANGELO, 1998). Estudos recentes comprovaram que a presença do BoHV-1 afetou negativamente o processo de maturação nuclear de ovócitos infectados *in vitro* e provenientes de animais naturalmente infectados (ALVES *et al.*, 2018; MENDES *et al.*, 2018). Ademais, Queiroz-Castro *et al.* (2018, 2019) demonstram que as células do *cumulus* de vacas infectadas naturalmente e assintomáticas podem apresentar o BoHV-1. Desta forma, o objetivo deste presente estudo é avaliar a interferência do BoHV-1 na taxa de maturação ovocitária comparando ovócitos provenientes de vacas naturalmente infectadas e ovócitos oriundos de vacas soronegativas, os quais serão infectados com diferentes titulações do BoHV-1 *in vitro*.

METODOLOGIA

As amostras experimentais estão sendo coletadas em Matadouro-Frigorífico. Serão utilizadas amostras de sangue e ovários de fêmeas bovinas destinadas ao abate, provenientes de rebanhos sabidamente não vacinados contra o BoHV-1, a fim de evitar a interferência da vacinação nos resultados do teste sorológico. No laboratório de Reprodução Animal da faculdade Univértix, as amostras de sangue serão utilizadas para a realização da soroneutralização. Elas serão colocadas em banho-maria à 37 °C por 15 minutos e, em seguida, centrifugadas a 860 G por cinco minutos para facilitar a separação do soro que, logo após, será transferido para microtubos. As amostras de soro serão inativadas à 56°C por 30 minutos e congeladas para a realização da sorologia em microplacas. Os folículos ovarianos antrais presentes nos ovários de cada animal serão puncionados com agulhas descartáveis de 25 x 7G. O líquido aspirado será depositado em microtubos identificados para sedimentação dos complexos *cumulus* ovócitos (COCs). Após cinco minutos de sedimentação, o sobrenadante será descartado, no intuito de separar os complexos. Os COCs recuperados serão transferidos para placas de cultivo contendo PBS acrescido de 10% de SFB a 37 °C e avaliados em microscópio estereoscópio com aumento final de 50 x. Os ovócitos serão transferidos para outra placa de Petri contendo meio Talp-Hepes e então classificados morfológicamente, de acordo com Costa *et al.* (1997a). A avaliação será realizada individualmente para cada animal. Após a classificação, serão selecionados somente os ovócitos com a presença de *cumulus* compacto. Após os resultados da soroneutralização, os COCs oriundos de animais soropositivos serão avaliados quanto a sua capacidade de desenvolvimento por meio da taxa de maturação nuclear.

RESULTADOS

Como controle, os resultados de taxa de maturação serão comparados com aqueles encontrados em ovócitos oriundos de animais soronegativos. Já os COCs oriundos de fêmeas soronegativas serão incubados com o vírus. O grupo controle será formado por ovócitos que serão co-incubados com BoHV-1. Para a incubação, parte dos COCs serão transferidos para microgotas de 100µL de meio de maturação (COSTA, 1994), contendo 10 µL do vírus BoHV-1 no título de $10^{4.3}$ TCID₅₀/mL (SILVA-FRADE *et al.*, 2010) e a outra parte contendo 10 µL do BoHV-1 no título de 10^2 TCID₅₀/mL. As estruturas permanecerão incubadas com o vírus durante todo o período de maturação por 24 horas a 38,5°C em 5% de CO₂. Para a avaliação da taxa de maturação nuclear dos ovócitos, os COCs serão hipotonizados, fixados e corados com orceína a 2%, de acordo com Costa *et al.* (1997b). A leitura das lâminas será realizada em microscópio óptico, com aumento de 1.000x em imersão. A taxa de maturação nuclear será expressa como sendo a percentagem de ovócitos que apresentar configuração cromossômica em Metáfase II após o período de 24 horas de incubação a 38,5 °C em atmosfera controlada a 5% de CO₂. A variável qualitativa dicotômica (presença ou ausência do BoHV-1) será comparada em tabelas de contingência e analisada pelo teste de qui-quadrado, a 5% de probabilidade. Essa pesquisa encontrasse em andamento conforme o previsto. Essa pesquisa foi aprovada pelo Programa de Incentivo Básico à Iniciação Científica (PIBIC) da Faculdade Vértice- Univértix em parceria com a Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S. V. P; COSTA, E. P; QUEIROZ-CASTRO, V. L. D; MACHADO-NEVES, M; GUIMARÃES, J. D; GOMES, L. L, et al. Bovine herpesvirus 1 can impact the bovine oocyte development during in vitro maturation. **Res Vet Sci.**2019; 123:135–140.
- COSTA, E.P. **Aspectos morfológicos (citológicos e ultraestruturais) e desenvolvimento de ovócitos de bovinos “in vitro”**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1994. 155f. Tese (Doutorado em Ciência Animal, área Reprodução Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, 1994.
- COSTA, E.P.; VALE FILHO, V.R.; NOGUEIRA, J.C.; COSTA, A.H.A.; CAMARGOS, E.R.S.; FERREIRA, A.M.; BRUSCHI, J.H. Técnicas para desnudamento rápido de ovócitos de bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, p.425-432, 1997a.
- COSTA, E.P.; VALE FILHO, V.R.; NOGUEIRA, J.C.; FERREIRA, A.M; COSTA, A.H.A. Técnica para a avaliação do estágio de maturação “in vitro” de ovócitos bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, p.433-440, 1997b.
- D'ANGELO, M. **Interação do Herpesvirus Bovino tipo-1 (BHV-1) com oócitos bovinos maturados in vitro**. 52f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
- ENGELS, M., ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminants pestivirus infections. **Vet. Microbiol**, v.53, p.3-15, 1996.
- FIGUEIREDO, J.R.; CELESTINO, J.J.H.; RODRIGUES, A.P.R.; SILVA, J.R.V. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção

in vitro de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.31, p.143-152, 2007.

HOUE, H. Epidemiological features and economical importance of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections. **Veterinary Microbiology**, v.64, p.89-107, 1999.

MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1, decorrente de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. **Ciência Rural**, v.30, n.2, p.347-350, 2000.

MENDES, V. R. A.; COSTA, E. P.; QUEIROZ-CATRO, V. L. D.; SILVA JUNIOR, A. ; ALVES, S. V. P. ; GUIMARAES, J. D. ; GOMES, L. L. . Impairment on nuclear maturation rate in oocytes from cows naturally infected by bovine herpesvirus 1 (BoHV-1). **Pesquisa veterinária brasileira (online)**, v. 38, p. 2207-2212, 2018.

PHILPOT, M. The dangers of disease transmission by artificial insemination by Embryo Transfer. **Br. Vet. J.**, v.149, p.339-369, 1993.

QUEIROZ-CASTRO, V. L. D.; Costa, E. P.; ALVES, S. V. P.; SILVA JUNIOR, A.; MACHADO-NEVES, M.; GUIMARÃES, J. D. Detection of bovine herpesvírus 1 in cumulus-oocyte complexes of cows. **Res Vet Sci**. 2018; 120:54–56.

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

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

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

TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. F. et al 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. The animal embryo transfer industry in figures: a report from the IETS data retrieval committee. **IETS Newsletter**, p.12-19, 2004.

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

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