



## Produção *in vitro* de embriões bovinos com sêmen congelado após prévia infecção com *Herpesvirus* bovino tipo 5

*In vitro* production of bovine embryos with frozen semen previously infected with Bovine Herpesvirus type 5 before sperm freezing

Diego Gouvêa de Souza<sup>1</sup>, Camila Silva-Frade, Renata S. Calegari, André M. Crespilho, Daniela M. Paschoal, Mateus J. Sudano, Fernanda N. Marqui, Alicia Martins Jr., Tereza C. Cardoso

Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

<sup>1</sup>Correspondência: [diego.souza@uol.com.br](mailto:diego.souza@uol.com.br)

### Resumo

O *Herpesvirus* bovino tipo 5 (BoHV-5) tem sido recentemente descrito no sêmen contaminado. Apesar de ter sido identificado no sêmen bovino, sua influência na produção de embriões *in vitro* não foi ainda relatada. O presente estudo teve como objetivo verificar a susceptibilidade de oócitos bovinos maturados e fertilizados *in vitro*, com sêmen congelado, infectado experimentalmente com BoHV-5, antes da congelação, avaliando-se o desenvolvimento embrionário subsequente e o possível carreamento do vírus para o embrião via espermatozoide. Ejaculados de touro foram misturados e divididos em dois grupos: Grupo I, sêmen não exposto ao vírus e, Grupo II, sêmen exposto ao vírus. A presença do BoHV-5 foi investigada através de PCR e teste de hibridização *in situ* (ISH). Os dados foram analisados através de Teste-*t* de Student com  $P < 0,05$  considerado como significativo. O vírus foi detectado em embriões avaliados com 168 h pós-inseminação. Não houve diferença significativa entre os diferentes grupos de tratamento para as taxas de produção *in vitro* de embriões para os respectivos estágios de desenvolvimento. Assim, conclui-se que, o sêmen contaminado com o BoHV-5 pode infectar os oócitos durante a fertilização *in vitro*, com carreamento do vírus para os embriões, não afetando, porém, o seu desenvolvimento *in vitro*.

**Palavras-chave:** BoHV-5, preservação do sêmen, hibridização *in situ* fluorescente, desenvolvimento embrionário.

### Abstract

*Bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) has been recently described from contaminated semen. Despite having been identified in bovine semen, its transmission through use of infected fresh semen, just before freezing, on the in vitro embryo production has not yet been reported so far. Thus, this study was carried out to investigate the susceptibility of matured bovine oocytes to BoHV-5 infection after using frozen semen previously exposed to the virus, and their ability to develop for advanced blastocyst stages following in vitro fertilization (IVF). Ejaculates from bulls were mixed and divided into two groups, as follows: Group 1, semen not exposed to the virus, and Group 2, infected sperm. The presence of BoHV-5 was investigated by PCR and in situ hybridization assays. Results were analyzed through use of Student *t* - test with  $P < 0.05$  considered as significant. The virus was detected in blastocysts evaluated at 168 h post-insemination. There was no significant difference between groups for the in vitro embryo production at any developmental stage. Thus, it is concluded that semen infected with BoHV-5 can infect oocytes during IVF, with the virus transmission to embryos via sperm; however, embryonic development was not impaired, as evidenced by the subsequent blastocyst formation.*

**Keywords:** BoHV-5, semen preservation, fluorescent in situ hybridization, embryonic development.

### Introdução

O *Herpesvirus* bovino tipo 5 (BoHV-5) é um  $\alpha$ -herpesvírus neuro-virulento, geralmente associado à encefalite necrosante em bovinos (Del Médico Zayac et al., 2010). A infecção com BoHV-5 tem sido ocasionalmente descrita em diversos países, incluindo a Austrália (Kirkland et al., 2009), Estados Unidos e países europeus, no entanto, a doença foi descrita como sendo prevalente na América do Sul, especialmente no Brasil e Argentina (Perez et al., 2002; Esteves et al., 2007). O *Herpesvirus* bovino tipo 1 (BoHV-1) e BoHV-5 estão relacionados genética e antigenicamente com uma similaridade genômica média de 82,3%, sendo que a maioria das diferenças foram encontradas nos genes imediatos e relacionados com a latência (Delhon et al., 2003; Silvestro e Bratanich, 2016; Maidana et al., 2017). Ambos estabelecem latência nos neurônios sensoriais, onde seus genomas permanecem em latência no hospedeiro, aguardando a reativação de um novo ciclo lítico (Meyer et al., 2001; Perez et al., 2002; Rissi et al., 2007; Valera et al., 2008; Varela et al., 2010).

Ao contrário do BoHV-5, o BoHV-1 provoca problemas respiratórios e reprodutivos, os quais são economicamente importantes, tais como: vulvovaginite, endometrite, aborto e balanopostite (Wrathall et al., 2006; Muylkens et al., 2007; Favier et al., 2012; Maidana et al., 2017). Além disso, no touro, o vírus replica



inicialmente na mucosa do prepúcio, pênis e uretra, sendo o sêmen provavelmente contaminado pelo vírus durante a passagem pela mucosa infectada durante a ejaculação (Wrathall et al., 2006; Muylkens et al., 2007). A transmissão natural do BoHV-5, em sêmen contaminado, foi descrita na Austrália (Kirkland et al., 2009) e isolado em amostras de sêmen obtidas de touros saudáveis (Diallo et al., 2010). A presença de DNA viral para o BoHV-5 (100%) e BoHV-1 (44,7%) foi detectada em amostras de sêmen fresco e congelado de touros de centrais de inseminação, em dois estados brasileiros (Oliveira et al. 2011), bem como em várias amostras de touros saudáveis, no Chile (Rodríguez et al., 2012).

Apesar de inúmeros relatos de BoHV-5 em sêmen de touro, seu significado no sêmen é desconhecido (Wrathall et al., 2006; Kirkland et al., 2009; Diallo et al., 2010; Oliveira et al., 2011; Souza et al., 2011; Brenner et al., 2012). Assim, apesar de escassas informações a respeito do mesmo, em relação ao sistema reprodutivo, supõe-se que após a reativação e replicação, o vírus possa causar distúrbios reprodutivos, em bovinos.

Em contraste ao conhecimento e riscos reais da transmissão da doença, através do uso de sêmen contaminado na inseminação artificial (IA), há pouca evidência de que sua utilização, sob essa circunstância, para produção de embriões, possa oferecer risco à viabilidade dos mesmos (Wrathall et al., 2006). No entanto, a infecção experimental *in vitro* de gametas bovinos com BoHV-5, resultou em embriões infectados, sem que prejuízo no desenvolvimento embrionário tenha ocorrido (Silva-Frade et al., 2010).

Em relação ao sêmen usado para produzir embriões para comércio internacional, na maioria dos casos, este é selecionado a partir de lotes de sêmen processados em centrais de inseminação artificial credenciadas. Tais touros, normalmente, apresentam certificados negativos para doenças agudas e epidêmicas, como a febre aftosa e, também, para doenças crônicas como brucelose, tuberculose, leptospirose, campilobacteriose e tricomonose (Wrathall et al., 2006). Diversas centrais de inseminação também asseguram que seus touros são negativos para a leucose enzootica bovina, BoHV-1 e para a diarreia viral bovina (BVDV) (Wrathall et al., 2006).

Já o BOHV-1 pode ser encontrado no líquido folicular e em células epiteliais do oviduto bovino, podendo ser liberado no sêmen, após reativação viral, desencadeada por fatores estressantes (Van Wagendonk-De Leeuw et al., 2000; D'Angelo et al., 2009). Portanto, o sêmen confere risco potencial para a transmissão de BoHV-1, uma vez que o vírus pode ser transmitido por animais clinicamente sadios (Wrenzycky et al., 2007).

O presente estudo teve como objetivo investigar a susceptibilidade de oócitos bovinos maturados e fertilizados *in vitro*, com sêmen congelado, infectado experimentalmente com BoHV-5, antes da congelação, avaliando-se o desenvolvimento embrionário subsequente e o possível carreamento do vírus para o embrião.

## Material e Métodos

### *Preparação do vírus e da amostra de sêmen*

Estoque do BoHV-5, isolado de bovinos acometidos pela infecção na região de Araçatuba, São Paulo, Brasil, em 2007 (Ferrari et al., 2007) foi propagado em células “Madin Darby Bovine Kidney” (MDBK, ATCC CCL-2) e cultivado em “minimum essential medium” (MEM). A dose infectante da cultura de tecidos por 50  $\mu$ L (TCID<sub>50</sub>) do estoque do vírus foi determinada por vírus neutralização em células MDBK (Cardoso et al., 2007). Aliquotas do estoque viral (100  $\mu$ L), com 10<sup>3,3</sup> TCID<sub>50</sub>/50 $\mu$ L, foram mantidas em freezer a -86°C até o uso.

Ejaculados de três touros da raça Nelore, com fertilidade comprovada e livre de contaminação viral, foram obtidos através da vagina artificial, de acordo com os procedimentos rotineiros da central de inseminação artificial. As amostras de sêmen foram avaliadas quanto à motilidade, vigor, concentração e morfologia. A seguir, o “pool” de ejaculados foi dividido em duas alíquotas, de igual volume, sendo uma delas submetida ao processo de coincubação com o vírus. Apenas as amostras que apresentaram motilidade progressiva (MP)  $\geq$  60% e morfologia normal ( $\geq$  70%) foram utilizadas.

### *Coincubação vírus e sêmen e congelação das amostras seminais*

O BoHV-5, na titulação de 10<sup>3,3</sup> TCID<sub>50</sub>/50 $\mu$ L foi coincubado com o sêmen, durante 15 min à temperatura ambiente (25°C), ao abrigo da luz. Em seguida, o sêmen foi diluído em Tris-ácido cítrico-frutose (pH 6,8; pressão osmótica  $\sim$  300 mOsm/kg H<sub>2</sub>O) contendo gema de ovo (20%; v/v) e glicerol (7%; v/v), resultando na concentração final de 60 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL. A amostra foi envasada manualmente em palhetas de 0,5 mL e mantidas no refrigerador à temperatura constante de 4°C por 4 h. A curva de congelação foi realizada em vapor de nitrogênio líquido, utilizando uma caixa de isopor para o procedimento. As palhetas de sêmen foram mantidas a uma distância de 5 cm acima do nível do nitrogênio líquido por 20 min. Após este período de congelação, as palhetas foram imersas diretamente em nitrogênio líquido e armazenadas em botijão criobiológico.

Antes do processo de criopreservação, as amostras de sêmen fresco foram divididas em dois grupos: I (controle) e II (infectado). O grupo controle foi incubado com 100  $\mu$ L de MEM para cada 1 mL de ejaculado, enquanto que o grupo II foi incubado com 100  $\mu$ L do estoque de BoHV-5, na mesma diluição usada para o grupo controle (1:10).



### *Produção in vitro de embriões bovinos*

Os oócitos foram obtidos a partir de ovários de animais mestiços abatidos no frigorífico Brasfrigo, localizado em Birigui - SP. Os ovários foram transportados para o laboratório no dentro de 1 h *post mortem*, em solução fisiológica à temperatura de 31 a 33°C. Os complexos *cumulus*-oócitos (CCO) foram recuperados através de punção dos folículos com diâmetro de 2 a 6 mm.

A maturação dos oócitos foi realizada de acordo com Martins Júnior e Brackett (1998), com modificações. Oócitos contendo citoplasma homogêneo e pelo menos 3-4 camadas de células do *cumulus* foram lavados (três vezes) e selecionados em meio de maturação base (MM-b), constituído de meio 199 (Sigma Co., St. Louis, EUA), 2,2 mg/mL de bicarbonato de sódio, 50 µg/mL de piruvato de sódio, 50 µg/mL de sulfato de gentamicina e 10% de SFB.

Após a seleção, os oócitos foram transferidos para gotas de 100 µL, dispersas em placa de Petri (35x10mm), sob óleo mineral, contendo MM-b suplementado com 1 µg/mL de FSH (Folltropin-V<sup>®</sup>, Bioniche Inc, Canadá), 50 µg/mL de LH (Lutropin<sup>®</sup>, Bioniche Inc., Canadá). A incubação foi conduzida em estufa de cultura (Forma Scientific, EUA), em atmosfera úmida, a 5% CO<sub>2</sub>, em ar, a 38,7°C, por 24 h.

Após 24 h de maturação, os oócitos foram divididos em dois grupos, transferidos para gotas contendo meio de fertilização *in vitro* (FIV) e inseminadas com sêmen dos Grupos I e II.

Para a realização da FIV, uma dose de sêmen foi descongelada a 37°C por 30 s e centrifugada em gradiente Percoll (45% e 90%; Nutricell<sup>®</sup>, Campinas, Brasil) a 700 x g, durante 20 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido, os espermatozoides re-suspendidos em 3 mL de meio TALP e centrifugados (250 x g), por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o "pellet" diluído em 50 µL de meio FIV (TALP + PHE + heparina). Posteriormente, foi realizada a contagem espermática em câmara de Neubauer (5 µL da suspensão de espermatozoides em 95 µL de solução formol-salina), bem como avaliada a motilidade e o vigor (microscopia de óptica de luz). Grupos de 20 oócitos foram coincubados com espermatozoides (concentração final de 2,0 x 10<sup>6</sup>/mL x motilidade), em gotas de meio FIV, sob óleo mineral, em atmosfera úmida a 5% de CO<sub>2</sub>, em ar, a 38,7°C, por 20 h.

Ao término da etapa de inseminação, as células do *cumulus* foram removidas parcialmente, através de sucessivas pipetagens e os prováveis zigotos, em grupos de 20, transferidos para gotas (100 µL) de meio de cultura SOF-m (modificado). Decorridas 72 horas pós-inseminação (hpi), a clivagem foi verificada e 50% do meio de cultura foi substituído por meio fresco, sendo o procedimento repetido novamente às 120 hpi. A etapa de cultura foi realizada sob as mesmas condições descritas para MIV e FIV.

O desenvolvimento embrionário foi monitorado para verificar os oócitos maturados que fertilizaram e alcançaram os estágios de mórula/blastocisto (Mo/Bl) e blastocisto/blastocisto expandido (Bl/Bx) às 72, 144 e 168 hpi, respectivamente.

### *Deteção do vírus*

A presença do BoHV-5 e BoHV-1 foi avaliada em todos os reagentes, soro fetal bovino (SFB, Nutricell<sup>®</sup>), hormônio folículo estimulante (FSH, Pluset<sup>®</sup>, Calier, Espanha), hormônio luteinizante (LH, Lutropin-V<sup>®</sup>, Bioniche Inc., Canadá), sêmen, células (gametas e embriões) e células MDBK, através de PCR, visando o gene da glicoproteína-C. A presença viral em embriões produzidos *in vitro*, em estágio de blastocisto, foi determinada pela técnica de PCR e ISH.

### *Reação em cadeia da polimerase (PCR)*

Cinco "pool" de cada grupo contendo dez embriões foram submetidos à detecção viral pela técnica de PCR. O DNA dos embriões foi extraído com uso de Mini Kit PureLink<sup>™</sup> Viral RNA/DNA (Invitrogen<sup>™</sup>, cat # 12280-050), seguindo as recomendações do fabricante. A reação de PCR foi realizada utilizando o sistema GeneAmp<sup>®</sup> High Fidelity (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), resultando um volume final de 25 µL, composto por 10 µL da amostra de DNA, 2,5 µL de DMSO (dimetilsulfóxido), 10 pmol de cada primer, 10 mM de dNTPs, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 µL do tampão 10X GeneAmp<sup>®</sup> High Fidelity e 1,0 µL da enzima GeneAmp<sup>®</sup> High Fidelity. O conjunto de "primers" escolhido foi o B5, específico para o BoHV-5 (5'-CGG ACG AGA CGC CCT TGG-3' nt 322-339) e o consenso, denominado Bcon (5'-AGT GCA CGT ACA GCG GCT CG-3' nt 519-538), capaz de amplificar 159 bp do BoHV-5 (gene da gC).

Os produtos amplificados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1,2%, corados com brometo de etídio (0,5 mg/mL), em tampão TBE pH 8,4, e visualizados sob luz ultravioleta (white/ultraviolet transilluminator – UVP<sup>®</sup>). As imagens do gel foram captadas pela câmara digital Canon Imagem Quant 150 - Power Shot A640 (GE) e transportadas para o "software" ADOBE 8.0.

### Hibridização *in situ* (ISH)

A sonda de DNA foi preparada a partir dos produtos da PCR do gene da gC (Chowdhuri et al., 2000) do DNA viral (FERRARI et al., 2007). Produtos de 159 pares de base (pb) foram produzidos pela técnica de PCR pelos “primers” senso gI + (5´-GTG CTC TTC TCC ATC CCG-3´) e anti-senso gI-(5´-GCG GAG GAGGAG TCG TTG G-3´) (Invitrogen™, Brasil). Após a purificação do DNA, em gel de agarose, o produto da PCR foi ligado ao TA-vetor (pGEMTEasy, Promega, Madison, WI, EUA) com a ligação dos produtos introduzida em *E. coli*, através de choque térmico. Colônias positivas foram confirmadas pelo sequenciamento do DNA. A colônia positiva foi cultivada e o DNA do plasmídeo foi preparado utilizando um kit disponível comercialmente (Promega Mini-Prep, Promega, Madison, WI, E.U.A.). A sonda foi gerada pela reação de PCR, visando o gene da gC localizado no plasmídeo, como descrito anteriormente, com a biotina conjugada ao primer reverso (Invitrogen™).

Para a realização da técnica de ISH os embriões foram colocados em lâminas de vidro, pré-tratadas com poli-L-lisina pura (Sigma-Aldrich®) e fixados com 4% (w/v) de paraformaldeído (Sigma -Aldrich®), diluído em tampão fosfato salina (PBS), por 24 h a 4°C. Os embriões foram lavados (três vezes) antes da fixação em gotas contendo 500 µL de PBS. Antes de iniciar o procedimento de ISH, as lâminas foram tratadas com proteinase K (10 mg/mL, Invitrogen™), durante 10 min. à temperatura ambiente, seguida de lavagem em PBS. A sonda denaturada de 159-pb, ligada à biotina, foi diluída na proporção de 2 µL (2 ng/mL) para 98 µL de tampão pré-hibridação (formamida 50%, 5% soroalbumina bovina, 1% N-lauroilsarcosina e sulfato dodecil de sódio 0,02%). As lâminas com a sonda foram incubadas por 12 h a 37°C, em câmara úmida. Em seguida, foram lavadas em soluções de concentração decrescentes: 1 x SSC (solução salina - citrato de sódio) e 0,1 x SSC, por 10 min. a 42°C. O sistema de detecção consistiu de estreptavidina conjugada à Cy3 (Sigma-Aldrich®, cat # E4142), por 2 h a 37°C, por 20 min, à temperatura ambiente. As lâminas foram cobertas com lamínulas, usando glicerol em solução tamponada (pH 7,0) e, posteriormente, analisadas em microscópio de fluorescência (Axio Image A1, Zeiss), conectado a AxioCam MRc (Carl Zeiss Oberkochen, Alemanha), sendo as micrografias processadas no Axiovision software 4.8.1 (Carl Zeiss).

### Análise estatística

As variáveis estudadas foram: infecção pelo BoHV-5 (variável independente, categórica nominal) e produção *in vitro* de embriões bovino (variável dependente, numérica discreta). As taxas de fertilização e desenvolvimento embrionário foram analisadas utilizando o teste-*t* de Student.  $P < 0,05$  foi considerado como diferença estatística.

## Resultados

### Infecção experimental com BoHV-5

O gene da gC foi amplificado pela técnica de PCR em embriões oriundos da fertilização *in vitro* com sêmen co-incubado com BoHV-5, sendo possível a visualização dos produtos com 159 pb.

O DNA do BoHV-5 foi detectado pela hibridização *in situ*, conforme a marcação fluorescente positiva nos embriões infectados (Fig. 1A). A amplificação do gene e a marcação fluorescente nas células não foram detectadas em nenhuma estrutura do grupo controle (Fig. 1B).

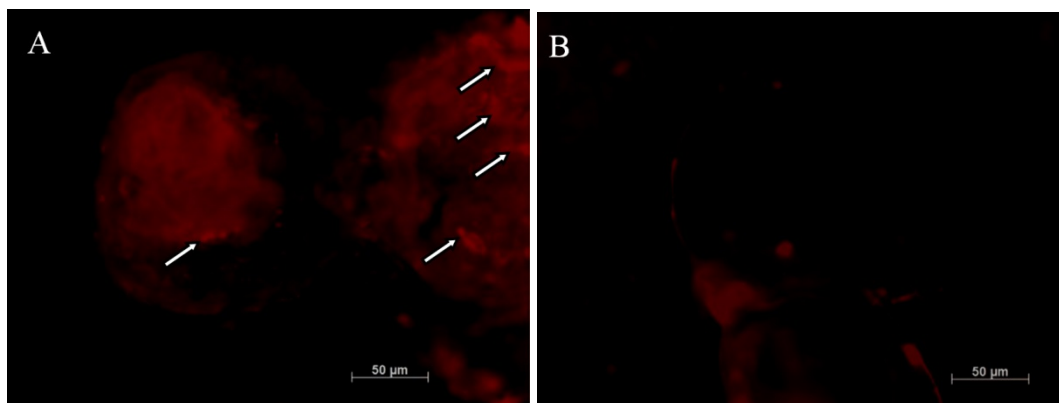


Figura 1. Embriões bovinos oriundos de (A) fertilização com espermatozoides infectados com BoHV-5 e (B) não infectados, às 168 hpi. Os sinais positivos obtidos através de ISH são representados pela marcação fluorescente (setas) (488nm) nos embriões.





### Desenvolvimento e produção *in vitro* de embriões

Não houve diferença estatística entre os diferentes grupos de tratamento para o desenvolvimento embrionário ( $P > 0,05$ ; Tab.1).

Tabela 1. Resultado (n/%) de desenvolvimento embrionário com sêmen congelado infectado previamente com BoHV-5.

Grupos	Número de oócitos	Desenvolvimento embrionário - n (%)		
		Fertilização	Mo/Bl/Bx*	Bl/Bx/Be*
Grupo I	88	76 (86,4)	39 (44,3)	30 (34,1)
Grupo II	93	75 (80,6)	37 (39,8)	29 (31,2)

\*mórula (Mo), blastocisto (Bl), blastocisto expandido (Bx) e blastocisto eclodido (Be); n° de replicatas = 6.

### Discussão

A criopreservação de sêmen é parte integrante dos programas de reprodução animal e sua aplicação em muitas circunstâncias, depende da qualidade espermática após o processo de congelação-descongelação. A utilização do sêmen criopreservado pode favorecer a disseminação de vírus envolvidos com doenças venéreas, como o BoHV-1 (Tanghe et al., 2005; Wrathall et al., 2006). Apesar de outros vírus terem sido isolados no sêmen bovino, o conhecimento sobre a presença e disseminação do BoHV-5 no sêmen comercial precisa ser investigada (Esteves et al., 2003; Gomes et al., 2003; Wrathall et al., 2006; Kirkland et al., 2009; Diallo et al., 2010; Oliveira et al., 2011).

De acordo com os resultados de ISH, oócitos fertilizados com espermatozoides infectados experimentalmente foram contaminados também, uma vez que os embriões apresentaram marcação fluorescente, confirmando a presença do DNA do BoHV-5. Silva-Frade et al. (2010) verificaram que a ISH de oócitos, espermatozoides e embriões expostos previamente ao BoHV-5, mostrou-se superior à técnica de PCR, a qual é sensível, mas não possibilita identificar com precisão as células positivas *in situ*.

Devido ao fato de ser o agente viral mais conhecido na esfera reprodutiva, o BoHV-1 tem sido foco dos recentes estudos sobre causas de alterações reprodutivas no rebanho bovino (Brock, 1998). Apesar da grande similaridade genômica com o BoHV-1, o BoHV-5 encontra-se restrito às enfermidades do sistema nervoso central. Assim, o BoHV-1 pode estar mais adaptado ao sistema reprodutivo do que o tipo 5, o que explicaria as diferenças observadas para o tipo 5 e os dados encontrados na literatura para o tipo 1. Segundo Tanghe et al. (2005) os resultados podem ser influenciados pelo título viral, uma vez que a ligação do espermatozoide à zona pelúcida (ZP), no caso do BoHV-1, diminui concomitante ao aumento do título viral.

Além da adsorção aos gametas, o BoHV-1 pode interferir de forma negativa na fertilização *in vitro*, possivelmente devido ao efeito sobre a penetração espermática ou interação com mecanismos intracelulares de fusão (Guerin et al., 1990). Na verdade, o BoHV-1 pode reduzir até em 60% a ligação do espermatozoide à zona pelúcida (Vanroose et al., 2000). Guerin et al. (1990) utilizando espermatozoides infectados com BoHV-1, para a produção *in vitro* de embrião, demonstraram uma redução significativa na taxa de fertilização (85% vs. 65%). Choi et al. (2008), afirmaram, em estudos com humanos, que modificações nas propriedades elétricas da membrana plasmática podem ser provocadas pelo HIV-1, através de alterações nos gradientes de cátions ou interações com as proteínas da membrana, que modulam os canais iônicos. Entretanto, no presente estudo, os espermatozoides coincubados com o BoHV-5 não comprometeram o desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Os espermatozoides prontamente servem como carreadores do gene viral, especialmente para os envelopados, como o *Herpesvirus*, durante a fertilização (Nussbaum et al., 1993). Tal fato foi confirmado com o BoHV-5, o qual foi transmitido verticalmente para os embriões através de espermatozoides infectados (Figura 1). A presença do BoHV-5 no sêmen, mostrou que o gradiente de Percoll, nas concentrações adotadas, não possibilitou a remoção do vírus. Esta técnica normalmente é utilizada para reduzir ou eliminar a carga viral no sêmen (Makarevich et al., 2007).

Contudo, os embriões produzidos a partir de espermatozoides infectados apresentaram desenvolvimento semelhante ao grupo controle, sendo obtidas porcentagens similares as 144 e 168 hpi, em conformidade com os relatos de Silva-Frade et al. (2010), após infecção experimental de gametas bovinos, no momento da fertilização *in vitro*. Espermatozoides expostos ao BoHV-1, durante a FIV, levaram ao comprometimento do desenvolvimento embrionário (Makarevich et al., 2007), além de reduzirem a taxa de clivagem e de formação de blastocistos (Vanroose et al., 1999).

Os resultados obtidos através da ISH confirmam que a ZP não é uma barreira eficaz para proteger oócitos da infecção pelo BoHV-5, cujo vírus foi carregado pelo espermatozoide no momento da fertilização. Brenner et al. (2012) após infecção experimental oócitos bovinos com BoHV-5 confirmaram a infecção sem interferir com a qualidade ou o número de embriões produzidos. A ZP é comumente conhecida pelo seu importante papel na proteção de oócitos e embriões, na etapa pré-implantacional, contra a infecção viral, no



entanto, mostrou-se ineficaz na proteção contra o BoHV-1 (Makarevich et al., 2007) e o BoHV-5 (Silva-Frade et al., 2010; Brenner et al., 2012), os quais transpuseram os grandes poros externos da ZP(180 a 200 nm) (Vanroose et al., 2000), sendo possível, neste caso, prevenir a infecção das células embrionárias através de sucessivas lavagens com tripsina (Makarevich et al., 2007).

Em conclusão, no presente estudo foi encontrada evidências de que os embriões bovinos são susceptíveis à infecção pelo BoHV-5, a partir do sêmen congelado, previamente contaminado, porém, a infecção dos espermatozoides não interferiu no desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto, como evidenciado pelo teste de ISH.

## Referências

- Brenner MPC, Silva-Frade C, Ferrarezi MC, Garcia AF, Flores EF, Cardoso TC.** Evaluation of developmental changes in bovine *in vitro* produced embryos following exposure to bovine Herpesvirus type 5. *Reprod Biol Endocrinol*, v.10, p.53, 2012.
- Brock KV.** Quality control for materials of animal origin used in embryo production and transfer. In: Stringfellow DA, Seidel SM, Manual of the International Embryo Transfer Society. IETS, Savoy, IL, p.151-163, 1998.
- Cardoso TC, Ferrari HF, Luvizotto MCR, Arns CW.** Bio-safety technology in production of Bovine Herpesvirus type 5 (BoHV-5) using an alternative serum-free medium. *Am J Biochem Biotechnol*, v.3, p.125-130, 2007.
- Choi B, Fermin CD, Comardelle AM, Haislip AM, Voss TG, Garry RF.** Alterations in intracellular potassium concentration by HIV-1 and SIV. *Virol J*, v.5, p.60, 2008.
- Chowdhury SI, Lee BJ, Onderci M, Weiss ML, Mosier D.** Neurovirulence of glycoprotein C (gC)-deleted bovine herpesvirus type-5 (BHV-5) and BHV-5 expressing BHV-1 gC in a rabbit seizure model. *J Neurovirol*, v.6, p.284-295, 2000.
- D'Angelo M, Visintin JA, Richtzenhain LJ, Gonçalves RF.** Evaluation of trypsin treatment on the inactivation of bovine herpesvirus type 1 *in vitro* produced pre-implantation embryos. *Reprod Domest Anim*, v.44, p.536-539, 2009.
- Del Médico Zayac MP, Ladelfa MF, Kotsia F, Muylkens B, Thiry E, Romera SA.** Biology of bovine herpesvirus 5. *Vet J*, v.184, p.138-145, 2010.
- Delhon G, Moraes MP, Lu Z, Afonso CL, Flores EF, Weiblen R, Kutish GF, Rock DL.** Genome of bovine herpesvirus 5. *J. Virol*, v.77, p.10339-10347, 2003.
- Diallo IS, Hewitson GR, Hoard J, Turner S, Corney BG, Rodwell BJ.** Isolation of bovine herpesvirus type 5 from the semen of a healthy bull in Australia. *Aust Vet J*, v.88, p.93-95, 2010.
- Esteves PA, Dellagostin OA, Pinto LS, Silva AP, Spilki FR, Ciacci-Zanella JR, Hübner SO, Puentes R, Maisonnave J, Franco AC, Rijsewijk FAM, Batista HBCR, Teixeira TF, Dezen D, Oliveira AP, David C, Arns CW, Roehle PM.** Phylogenetic comparison of the carboxy-terminal region of glycoprotein C (gC) of bovine herpesviruses (BoHV) 1.1, 1.2 and 5 from South America (SA). *Virus Res*, v.131, p.16-22, 2007.
- Esteves PA, Spilki FR, Franco AC, Silva TC, Oliveira EAS, Moojen AM, Esmeraldino AM, Roehle PM.** Bovine herpesvirus type 5 in the semen of a bull not exhibiting clinical signs. *Vet Rec*, v.152, p.658-659, 2003.
- Favier PA, Marin MS, Pérez SE.** Role of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) in diseases of cattle. Recent findings on BoHV-5 association with genital disease. *Open Vet J*, v.2, p.46-53, 2012.
- Ferrari HF, Luvizotto MCR, Rahal P, Cardoso TC.** Detection of bovine *Herpesvirus type 5* in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine brain by PCR: a useful adjunct to conventional tissue based diagnostic test of bovine encephalitis. *J Virol Methods*, v.146, p.335-340, 2007.
- Gomes LI, Rocha MA, Souza JG, Costa EA, Barbosa-Stanciolo EF.** Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) in bull semen: amplification and sequence analysis of the US4 gene. *Vet Res Commun*, v.27, p.495-504, 2003.
- Guerin B, Le Guenne B, Alleitte M, Harley T, Thibier M.** Effects de la contamination par le BHV-1 sur la maturation et fécondation *in vitro* des ovocytes des bovines. *Rec Med Vet*, v.166, p.911-917, 1990.
- Kirkland PD, Poynting AJ, Gu X, Davis RJ.** Infertility and venereal disease in cattle inseminated with semen containing bovine Herpesvirus type 5. *Vet Rec*, v.165, p.111-113, 2009.
- Maidana SS, Craig PO, Craig MI, Ludwige L, Mauroye A, Thirye E, Romera SA.** Evidence of natural interspecific recombinant viruses between bovine alphaherpesviruses 1 and 5. *Virus Res*, v.242, p.122-130, 2017.
- Makarevich AV, Pivko J, Kubovicova E, Chrenek P, Slezaková M, Louda F.** Development and viability of bovine preimplantation embryos after the *in vitro* infection with bovine herpesvirus-1 (BHV-1): immunocytochemical and ultrastructural studies. *Zygote*, v.15, p.307-315, 2007.
- Meyer G, Lemaire M, Ros C, Belak K, Gabriel A, Cassart D, Coignoul F, Belak S, Thiry E.** Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. *Arch Virol*, v.146, p.633-652, 2001.



- Muylkens B, Thiry J, Kirten P, Schynts F, Thiry E.** Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet Res*, v.38, p.181-209, 2007.
- Nussbaum O, Laster J, Loyter A.** Fusion of enveloped viruses with sperm cells: interaction of Sendai, Influenza and Semliki Forest viruses with bull spermatozoa. *Exp Cell Res*, v.206, p.11-15, 1993.
- Oliveira MT, Campos FS, Dias MM, Velho FA, Freneau GE, Brito WMED, Rijsewijk FAM, Franco AC, Roche PM.** Detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in semen from Brazilian bulls. *Theriogenology*, v.75, p.1139-1145, 2011.
- Perez SE, Bretschneider C, Leunda MR, Osorio FA, Flores EF, Odeón AC.** Primary infection, latency and reactivation of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in the bovine nervous system. *Vet Pathol*, v.39, p.437-444, 2002.
- Rissi DR, Rech RR, Flores EF, Kommers GD, Barros CSL.** Meningoencefalite por herpesvirus bovinos-5. *Pesquisa Vet Brasil*, v.27, p.251-260, 2007.
- Rodríguez M, Barrera M, Rodríguez EC, Martínez N, Parra NC, Toledo JR.** First report of bovine herpesvirus 5 in bull semen. *Arch Virol*, v.157, p.1775-1778, 2012.
- Silva-Frade C, Martins Jr A, Borsanelli AC, Cardoso TC.** Effects of bovine Herpesvirus type 5 on development of *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology*, v.73, p.324-331, 2010.
- Silvestro C, Bratanich A.** The latency related gene of bovine herpesvirus types 1 and 5 and its modulation of cellular processes. *Arch Virol*, v.161, p.3299-3308, 2016.
- Souza DG, Silva-Frade C, Martins Jr A, Cardoso TC.** Bull semen variables after experimental exposure with Bovine Herpesvirus type 5. *Anim Reprod Sci*, v.124, p.55-60, 2011.
- Tanghe S, Vanroose G, Van Soom A, Duchateau L, Ysebaert MT, Kerkhofs P, Thiry E, Van Drunen Little-Van Den Hurk S, Van Oostveldt P, Nauwynck H.** Inhibition of bovine sperm-zona binding by bovine herpesvirus-1. *Reproduction*, v.130, p.251-259, 2005.
- Varela AP, Holz C, Cibulski SP, Teixeira TE, Antunes AC, Franco AC, Roche LR, Oliveira MT, Campos FS, Dezen D, Cenci A, Brito WD, Roche P M.** Neutralizing antibodies to bovine herpesvirus types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) and its subtypes. *Vet Microbiol*, v.142, p.254-260, 2010.
- Valera AR, Pidone CL, Massone AR, Quiroga MA, Riganti JG, Corva SG, Galosi CM.** A simple method of infecting rabbits with Bovine herpesvirus 1 and 5. *J Virol Methods*, v.150, p.77-79, 2008.
- Vanroose G, Nauwynck H, Van Soom A, Vanopdesbosch E, DE Kruif A.** Effect of bovine herpesvirus-1 or bovine diarrhea viral on development of *in vitro*-produced bovine embryos. *Mol Reprod Dev*, v.54, p.255-263, 1999.
- Vanroose G, Nauwynck H, Van Soom A, Ysebaert MT, Charlier G, Oostveldt PV, De Kruif A.** Structural aspects of the zona pellucida of *in vitro*-produced bovine embryos: a scanning electron and confocal laser scanning microscopic study. *Biol Reprod*, v.62, p.463-469, 2000.
- Van Wagendonk-De Leeuw AM, Mullaart E, De Ross AP, Merton JS, Den Daas JH, Kemp B, De Ruigh L.** Effects of different reproduction techniques: AI, MOET, or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology*, v.53, p.575-597, 2000.
- Wrathall AE, Simmons HA, Van Soom A.** Evaluation of risks of viral transmission of recipients of bovine embryos arising from fertilization with virus-infected semen. *Theriogenology*, v.65, p.247-274, 2006.
- Wrenzycki C, Herrmann D, Niemann H.** Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology*, v.68, p.577-583, 2007.
-