

## OCORRÊNCIA DO HERPESVIRUS BOVINO 1 (BoHV-1) NO LÍQUIDO FOLICULAR E CÉLULAS EPITELIAIS DE OVIDUTO BOVINO

**C.Y.M.R. Ferreira\*, R.M. Piatti, S. Miyashiro, A.G. Galuppo, N.M.C. Zerio, S.I. Sâmara\*, M. D'Angelo**

Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP, Brasil.

### RESUMO

O objetivo desse estudo foi verificar a ocorrência do herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) no líquido folicular de ovários e células epiteliais de oviduto bovino colhidos de abatedouro. Foi realizada a reação de polimerase em cadeia (nested PCR) das amostras resultantes de 12 colheitas, utilizando *primers* que amplificam o gene da glicoproteína B (gB) do BoHV-1. Uma amostra de líquido folicular apresentou reação positiva enquanto as amostras de células epiteliais de oviduto bovino apresentaram reações negativas. Este resultado é de grande relevância, pois o BoHV-1 constitui um risco para a produção *in vitro* de embriões, tendo como consequência a mortalidade embrionária que é uma importante causa de falha reprodutiva e tem profundo impacto na produção animal.

PALAVRAS-CHAVE: BoHV-1, líquido folicular, nested PCR.

### ABSTRACT

OCCURENCE OF BOVINE HERPESVIRUS 1 (BoHV-1) IN FOLICULAR FLUID AND EPITHELIAL CELLS OF BOVINE OVIDUCT. The objective of that study was to verify the incidence of the bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) in follicular fluid and bovine oviduct epithelial cells of slaughterhouse animals. There were 12 collections and a total of 138 ovaries, after extraction with the protein k enzyme, the samples were amplified, and internal fragment of the gene of the gB of BoHV-1 was used. A sample of follicular fluid presented a band of 175pb being shown positive to the test, while the samples of bovine oviduct epithelial cells, were all verified negatives. This discovery is of great relevance, because BoHV-1 constitutes a risk for the production of embryos *in vitro*. Leading to embryonic mortality, which has a deep impact in the animal production.

KEY WORDS: BoHV-1, follicular fluid, nested PCR.

### INTRODUÇÃO

O BoHV-1 é considerado um agente infeccioso para os embriões (VANROOSE *et al.*, 2000). Com advento de técnicas bem sucedidas de produção *in vitro* e criopreservação de embriões e oócitos, houve o crescimento do comércio interno e externo, assim, têm sido levantadas questões concernentes aos riscos de transmissão de enfermidades infecciosas pelo emprego destes produtos de biotecnologias (BIELANSKI *et al.*, 1997).

A utilização de ovários e de ovidutos bovinos colhidos em abatedouros procedentes de animais com estado sanitário desconhecido é uma prática já estabelecida para a produção de embriões *in vitro*. 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 fluído folicular, associado às células epiteliais de oviduto, nos oócitos (BIELANSKI *et al.*, 1993) e nos espermatozoides de touros infectados (ROCHA *et al.*, 1998). O risco de transmissão do BoHV-1 pela produção *in vitro* de embriões deve ser determinada, uma vez que este vírus pode estar presente em animais aparentemente saudáveis (FENNER, 1993).

O monitoramento de meios de maturação, fecundação, líquidos foliculares e células epiteliais de oviduto constitui um meio de promover o controle sanitário evitando assim a disseminação da enfermidade (GUERIN *et al.*, 1989). Neste contexto, o objetivo desse estudo foi verificar a ocorrência do Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) no líquido folicular de ovários e células epiteliais de oviduto bovino colhidos em abatedouro.

---

\*Bolsita FAPESP.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Colheita e preparo do material

#### Líquido folicular e células epiteliais de oviduto bovino

Foram realizadas 12 colheitas em abatedouro obtendo-se um total de 276 ovários e ovidutos. Estes foram transportados em solução salina tamponada (PBS) estéril, pH 7,2 acrescida de gentamicina (50µg/mL) à temperatura de 33° C. Inicialmente, os folículos foram aspirados e o líquido folicular transferido para tubos cônicos. Os ovidutos foram dissecados e colocados em placa de petri, onde cada um deles foi raspado com auxílio de duas lâminas de vidro estéreis para obtenção das células epiteliais. Dessas colheitas foram realizados *pools* de líquido folicular e de células epiteliais de oviduto bovino para verificação da presença do BoHV-1.

### Extração do DNA viral

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

### PCR

A reação da PCR foi realizada em um volume de 50 µL, contendo 10 µL de DNA, 10 mM de Tris HCl pH 9,0; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada nucleotídeo (dNTPs), 5% de glicerol, 2,5U da enzima *Taq* DNA polimerase e 50 pmol de cada um dos *primers sense* e *antisense* descritos por VILCEK (1994), respectivamente *primer 1* (P1: 5' CAC GGA CCT GGT GGA CAA GGA G 3') e *primer 2* (P2: CTA CCG TCA CGT GCT GTG TAC G 3') que amplificam fragmento de 468

pares de bases (pb) do gene da gB do BoHV-1. As amostras foram inicialmente desnaturadas a 95° C por 5min. A reação de amplificação foi feita com 35 ciclos repetidos de desnaturação (95° C por 1min), anelamento (57° C por 1min) e extensão (72° C por 1min30), e uma extensão final de 10min a 72° C. Como controle negativo foi utilizada a mistura dos reagentes e água milliQ.

### Nested-PCR (nPCR)

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

### Deteção dos produtos amplificados

A detecção do produto amplificado foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE 1X (54 g Tris base; 27,5 g Ácido Bórico e 20 mL EDTA 0,5 M pH 8,0). O gel foi corado com brometo de etídio (5 µg/mL em água), visualizado em transiluminador U.V. e fotografado em câmera digital (Kodak Digital Science DC-40 Câmera).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de líquido folicular e células epiteliais de oviduto bovino colhidas de vacas e novilhas de abatedouro, quando submetidas à reação da PCR, baseada em uma seqüência conservada do gene que codifica a gB, não foram capazes de amplificar o fragmento de 468 pb. Quando estas amostras foram submetidas a nPCR (Fig.1) foi detectado o gene da gB do BoHV-1 em uma colheita do *pool* de líquido folicular onde foi observado um fragmento de 175 pb.

BIELANSKI *et al.* (1993) estudaram a presença do BoHV-1 em líquido folicular e células epiteliais de oviduto bovino colhidos em abatedouro e verificaram 11,8% e 6,2% respectivamente de positividade em 85 amostras testadas pela técnica de isolamento viral, constatando que embriões positivos para o vírus eram correlacionados com líquidos foliculares também positivos. Com relação aos resultados do presente estudo, pode-se verificar a presença do BoHV-1 em 8,33% (1/12) das colheitas de líquido folicular e não foi constatada a presença do vírus em células epiteliais de oviduto bovino, empregando a técnica da nPCR.

Os resultados demonstram que nem sempre o líquido folicular está livre de patógenos e o risco potencial de sua presença pode ser remoto, mas deve ser considerado.

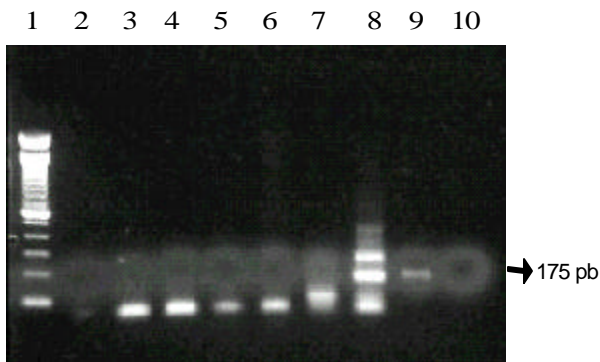


Fig. 1 - Detecção de produto amplificado de líquido folicular. 1- padrão molecular (100 bp), 2 ao 7 - amostras de líquido folicular negativas, 8- amostra de líquido folicular positiva, 9- controle positivo (BoHV-1), 10- controle negativo (água milliQ).

Para melhorar o certificado de sanidade dos embriões, é necessário testar os animais doadores e receptores. Testes sorológicos são geralmente conduzidos em colheitas pareadas (um no dia da colheita de embriões ou oócitos e outro poucas semanas após) para permitir um tempo adequado de incubação do vírus (STRINGFELLOW & GIVENS, 2000).

A nested-PCR mostrou-se um método sensível para a detecção de patógenos nos meios e produtos biológicos que são utilizados para a produção de embriões *in vitro*.

Os resultados deste trabalho tornam consistente a proposição do aspecto sanitário em relação ao comércio externo devendo-se, portanto, atentar as condutas e procedimentos sanitários recomendados pelo Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (STRINGFELLOW & SEIDEL, 1998).

#### REFERÊNCIAS

BIELANSKI, A.; LOEWEN, K.S.; DEL CAMPO, M.R.; SIRARD, M.A.; WILLADSEN, S. Isolation of bovine herpesvirus-1 (BoHV-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.
- D'ANGELO, M. *Interação do herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) com oócitos bovinos maturados in vitro*. 1998. 51p. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo: 1998.
- FENNER, F.J.; GIBBS, E.P.J.; MURPHY, F.A. Herpesviridae. In: *Veterinary virology*. New York: Academic Press, 1993. p. 335-68.
- GÜERIN, B.; LE GUIENNE, B.; CHAFFAUX, S.; HARLAY, T.; ALLIETTA, M.; THIBIER, M. Contamination des ovocytes et des embryons féconds "in vitro" après infection expérimentale de vaches donneuses par le virus herpes bovin de type 1 (BoHV-1). *Recueil de Médecine Vétérinaire*, v.165, p.827-833, 1989.
- ROCHA, M.A.; BARBOSA, E.F.; GUIMARÃES, S.E.F.; DIAS NETO, E.; GOUVEIA, A.M.G. A high sensitivity-nested PCR assay for BOHV-1 detection in semen of naturally infected bulls. *Veterinary Microbiology*, v.63, p.1-11, 1998.
- STRINGFELLOW, D.A. & SEIDEL, S.M. (Ed.). *Manual da sociedade internacional de transferência de embriões*. Jaboticabal: SBTE, 1998. 180p.
- STRINGFELLOW, D.A. & GIVENS, M.D. Epidemiologic concerns relative to *in vivo* and *in vitro* production of livestock embryos. *Animal Reproduction Science*, v.60-61, p.629-642, 2000.
- VANROOSE, G.; KRUIF, A.; VAN SOON, A. Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. *Animal Reproduction Science*, v.60-61, p.131-43, 2000.
- ANROOSE, G.; NAUWYNCK, H.; VAN SOON, A.; VAN OPDEN BOSCH, E.; KRUIF, A. Effect of bovine herpesvirus-1 or bovine viral diarrhoea virus on development of *in vitro*-produced bovine embryos. *Molecular Reproduction Development*, v.54, p.255-263, 1999.
- VILCEK, S. Detection of the bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) genome by PCR. *Journal Virological Methods*, v.41, p.245-248, 1994.

Recebido em 12/6/05

Aceito em 30/6/05