

ESTUDO COMPARATIVO DA SENSIBILIDADE DE CULTURAS PRIMÁRIAS DE CÉLULAS EPITELIAIS DE OVIDUTO BOVINO E MURINO AO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 (BHV-1)

M. D'Angelo¹, A.G. Galuppo^{1,2}, R.F. Gonçalves³

¹Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, Instituto Biológico, Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: dangelo@biologico.br

RESUMO

A co-cultura de células epiteliais de oviduto bovino (BOEC) supre as necessidades de desenvolvimento dos embriões bovinos do estágio de mórula até blastocisto expandido no processo de fecundação *in vitro* (FIV). Este estudo avaliou a sensibilidade das células epiteliais de oviduto bovino e murino ao vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina. As culturas primárias de células epiteliais de oviduto bovino e murino foram infectadas com o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina ($10^{5.6}$ TCID 50/mL). O efeito citopático foi observado 48 horas após a infecção, e o vírus titulado em células MDBK. A avaliação preliminar mostrou que tanto as células de oviduto bovino quanto as de oviduto murino apresentaram efeito citopático característico do vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina, com título, respectivamente de $10^{6.5}$ TCID 50/mL e $10^{4.8}$ TCID 50/mL. Este estudo mostra que as células de oviduto murino são menos susceptíveis ao vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina, as quais podem apresentar vantagens no co-cultivo de embriões bovinos fecundados *in vitro*.

PALAVRAS-CHAVE: Rinotraqueíte infecciosa bovina, oviduto, cultura primária, BHV-1.

ABSTRACT

COMPARATIVE STUDY OF THE SENSITIVITY OF BOVINE AND MURINE OVIDUCT EPITHELIAL CELL PRIMARY CULTURE TO BOVINE INFECTIOUS RINOTRACHEITIS VIRUS (BHV-1). Bovine oviduct epithelia cell co-culture provides the development needs of bovine embryos in the in-vitro fecundation (IVF) process. This study evaluated bovine and murine oviduct epithelial cell sensitivity to bovine infectious rinotracheitis virus (BHV-1). Their cultures were infected with the bovine infectious rinotracheitis virus ($10^{5.6}$ TCID 50/mL). The cytopathic effect was observed 48 hours after the infection, and the virus was titred in MDBK cells. The evaluation showed that both cell types, bovine and murine, presented BHV-1 characteristic cytopathic effect. The titres found were $10^{6.5}$ TCID 50/mL for the bovine oviduct and $10^{4.8}$ TCID 50/mL for the murine oviduct. This study showed that murine oviduct cells are less susceptible to BHV-1 than the bovine ones. This could be advantageous in terms of the embryos co-culture system in IVF.

KEY WORDS: Infectious bovine rinotracheithys, oviduct, primary culture, BHV-1.

INTRODUÇÃO

As linhagens celulares permanentes têm como principais vantagens a ótima reprodutibilidade, a facilidade de manutenção e o controle de qualidade assegurado pelos fornecedores, principalmente, no que se refere à presença de contaminantes e endotoxinas. Porém, deve-se levar em consideração que, assim como ocorre em todos os tipos de cultivo *in*

vitro, a sua manipulação deve seguir critérios rigorosos que evitem a contaminação posterior no ambiente do laboratório. Uma das maiores desvantagens do uso de linhagens permanentes é o fato de que as células sofrem um processo de desdiferenciação que pode levar à perda de características funcionais importantes, como por exemplo, a de atividades enzimáticas (DALTON *et al.*, 1994; HERNANDEZ-LEDEZMA *et al.*, 1993; KAWASHIMA, 1994; OESH & DIENER, 1995).

²Bolsista do CNPq/PIBIC.

³Bolsista FAPESP.

Uma maneira de contornar-se esse problema é o uso de culturas primárias que, embora não sejam submetidas a um controle de qualidade semelhante ao das culturas permanentes, são de fácil obtenção e manipulação e dentro de certos limites de tempo permitem a fácil reprodutibilidade do experimento.

Sistemas de co-cultura com células epiteliais de oviduto bovino têm sido muito utilizadas para obtenção de um maior número de embriões, quando esses são provenientes de técnicas de fecundação *in vitro* (FIV) (HERNANDEZ-LEDEZMA *et al.*, 1993; MENCK, 1994; MINAMI, 1996; SPARKS *et al.*, 1992). Embora o sucesso dessas técnicas tenha sido constatado em uma grande variedade de espécies, sugerindo que os efeitos embriotróficos benéficos das células do oviduto sejam espécie-específicos (GOTO *et al.*, 1993; KAWASHIMA *et al.*, 1994; MINAMI, 1996), existem relatos que não verificaram diferença significativa no desenvolvimento de embriões *in vitro* quando co-cultivados em monocamadas de células provenientes de espécies diferentes (DESAI *et al.*, 1994; GOTO *et al.*, 1992; GOTO *et al.*, 1993; HERNANDEZ-LEDEZMA *et al.*, 1993; KANNO *et al.*, 1995; LEPPENS *et al.*, 1996; SENDAI *et al.*, 1995; SHARIF *et al.*, 1991; THIBIER *et al.*, 1993). Entretanto, recentemente foi verificado que células epiteliais de oviduto murino utilizadas como co-cultura para o desenvolvimento de embriões bovinos apresentam fatores embriotróficos tão eficientes quanto às próprias células de oviduto bovino (DALTON *et al.*, 1994; KIM *et al.*, 1996; MINAMI *et al.*, 1991; MINAMI, 1996; SPARKS *et al.*, 1994; THIBIER *et al.*, 1993).

A ausência ou a baixa sensibilidade das células somáticas utilizadas no co-cultivo ao vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina é uma característica vantajosa em fertilização *in vitro*, já que se visa a produção de embriões sadios e o controle da disseminação de doenças. Porém, pouco se conhece sobre as implicações epidemiológicas desses procedimentos (DESAI *et al.*, 1994; ZUROVAC *et al.*, 1994). O objetivo desse estudo foi avaliar a sensibilidade de culturas primárias de células epiteliais de oviduto bovino e murino ao vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e Preparo do Material

Células Epiteliais de Oviduto Bovino

Os ovidutos foram obtidos em abatedouros, lavados em álcool 70% e transportados em solução salina tamponada estéril (PBS), a 4° C. Inicialmente, eram dissecados e colocados em uma placa de Petri onde cada um deles foi raspado com auxílio de duas lâminas de vidro estéreis no sentido fimbria/ístmico para obtenção das células epiteliais. As células foram lavadas 3 vezes por decantação com PBS. Após a última lavagem, foi

aliquotado 200 µL do pellet para cada frasco de cultivo. A cada frasco foi adicionado meio TCM199 acrescido de 10% de soro fetal bovino, piruvato e antibiótico. Os frascos foram mantidos em estufa umidificada, a 37° C, a 5% de CO₂ e a cada 48 horas o meio era renovado, com a monocamada atingindo confluência total em 5 a 7 dias, quando então eram utilizadas para o inóculo do vírus (MENCK *et al.*, 1994). As fotos foram feitas após 48 horas de infecção tanto no grupo controle quanto no grupo experimental (Figs. 1 e 2).

Células Epiteliais de Oviduto de Camundongo

Foram utilizadas fêmeas púberes, nulíparas, da linhagem Balb C (e/ou variedade Swiss), entre 6 a 8 semanas de idade, acasaladas com machos vasectomizados da mesma linhagem. As fêmeas foram sacrificadas por deslocamento da junção cérebro/espinal, aberto o abdômen, com exposição e extirpação dos ovidutos, os quais foram então colocados em solução salina tamponada estéril acrescida de 10% de soro fetal bovino. Para a obtenção das células da luz, os ovidutos foram submersos em solução de pronase por 90 minutos e mantidos em estufa umidificada a 37° C, a 5% de CO₂. Após esse período os ovidutos eram raspados com agulhas estéreis e as células da luz transferidas para placas de cultivo contendo meio TCM 199 acrescido de 10% de soro fetal bovino, piruvato e antibiótico, e reincubados nas mesmas condições descritas acima, até formação de monoestrato celular confluyente (5° dia de cultivo).

Vírus

Amostra

Vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina, BHV-1, amostra Los Angeles (título de 10^{5,76} TCID₅₀/mL). As amostras foram estocadas a -80° C em meio MEM sem soro fetal bovino.

Infectividade do Vírus Sobre as Células

As culturas foram infectadas com 0,5 mL do vírus. Após 48hs de incubação a 37° C foi observada a ocorrência de efeito citopático e as células foram congeladas e descongeladas e, a infectividade do vírus foi determinada pelo método de microtitulação.

Microtitulação

Volumes de 0,1 mL contendo 3x10⁴ células MDBK foram distribuídos em cada cavidade da placa de microtitulação. As placas foram incubadas a 37° C em estufa com 5% de CO₂ e, após 24 horas, lavadas com solução de Hank's. Os monoestratos foram inoculados com 0,1 mL de diluições de base 10, variando de 10⁻² a 10⁻⁷ das amostras dos sobrenadantes das culturas. As placas foram incubadas a 37° C e examinadas

após 24, 48 e 72 horas para a verificação da ocorrência de efeito citopático. Os títulos foram calculados, após 72 horas, em dose infectante em cultura de tecidos ($DICT_{50}/0,1mL$) expressa em logaritmo decimal (SAKKAS *et al.*, 1992).

DISCUSSÃO

A ausência de informações necessárias para o desenvolvimento de embriões bovinos de uma célula até o estágio de blastocisto tem dificultado o desenvolvimento de um meio quimicamente definido para manutenção de embriões bovinos *in vitro*. A obtenção de um sistema de co-cultivo celular pode auxiliar em muito a aplicação de técnicas de micromanipulação (SPARKS *et al.*, 1992).

Os resultados mostraram que células epiteliais de oviduto bovino e murino podem ser cultivadas *in vitro* em meio TCM199 acrescido de 10% de soro fetal

bovino, piruvato e antibiótico, atingindo confluência respectivamente em 7 e 5 dias de cultivo. Ambas as células, com trocas de meio de dois em dois dias se mantêm viáveis por até 16 dias, o que possibilita a manutenção de embriões *in vitro*, onde são utilizadas até o 14º dia.

Estudos sobre a eficiência da co-cultura com oviduto murino para o desenvolvimento de embriões bovinos maturados e fertilizados *in vitro* mostraram que as células de oviduto podem provocar a indução da atividade de enzimas nos embriões que auxiliam o seu desenvolvimento (MINAMI *et al.*, 1996). Sakkas trabalhando com pré-implantação de embriões de camundongo em diversos tipos de co-cultivos observou que os embriões cultivados em células epiteliais de oviduto murino, em comparação as outras células, apresentam uma maior viabilidade após a transferência (SAKKAS *et al.*, 1992). A análise da expressão do fator de crescimento na pré-implantação de ovidutos de camundongo sugere que os esteróides ovarianos não

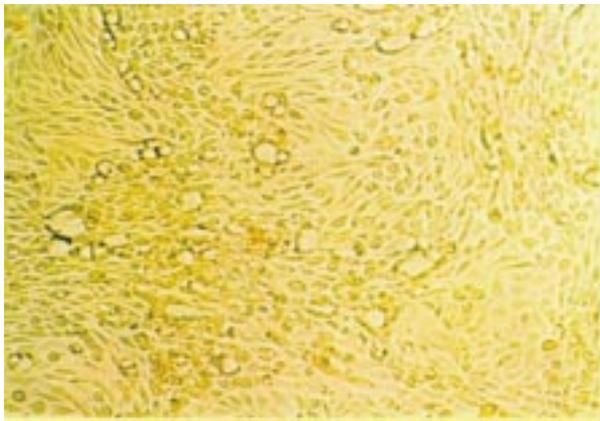


Fig. 1 - Cultura primária de células epiteliais de oviduto bovino (BOEC) - controle (aumento de 100x).

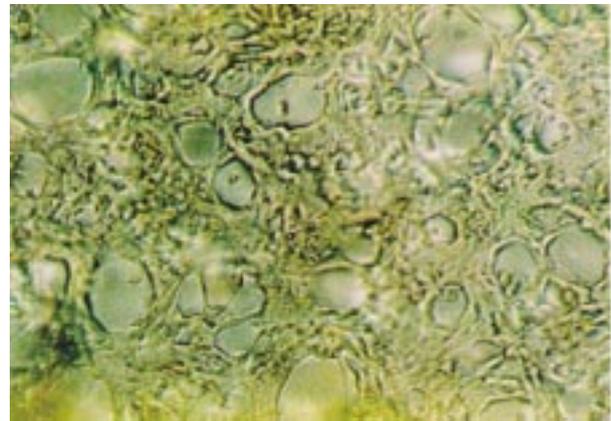


Fig. 2 - Cultura primária de células epiteliais de oviduto bovino após 48 horas de exposição ao BHV-1 (aumento de 100x).



Fig. 3 - Cultura primária de células epiteliais de oviduto murino - controle (aumento de 100x).

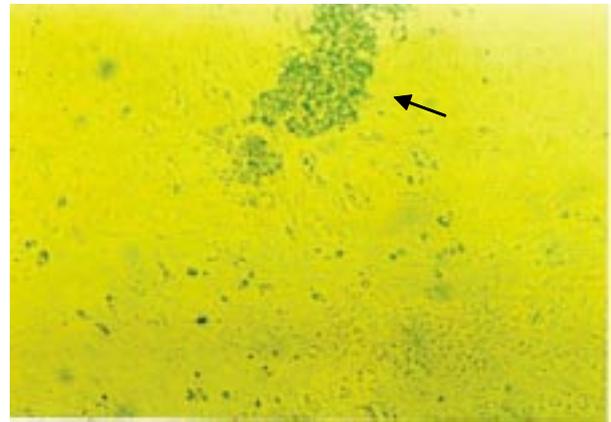


Fig. 4 - Cultura primária de células epiteliais de oviduto murino após 48 horas de exposição ao BHV-1. A seta indica a presença de efeito citopático. (aumento de 100x).

têm um papel importante na modulação da expressão desses genes no oviduto durante o período de pré-implantação, mostrando que vários fatores de crescimento são sintetizados pelo próprio oviduto murino (DALTON *et al.*, 1994).

Em relação a susceptibilidade dessas células ao vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina nossos resultados mostram que tanto as células de oviduto bovino (Figs. 1 e 2) quanto as de oviduto murino (Figs. 3 e 4) apresentaram efeito citopático característico do vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina, sendo que as de oviduto murino apresentam menor sensibilidade do que as de oviduto bovino. Os títulos foram, respectivamente, $10^{4.8}$ TCID₅₀/mL e $10^{6.5}$ TCID₅₀/mL.

Portanto, as células de oviduto murino, com essa característica, podem oferecer vantagens, se utilizadas em co-cultivo de embriões bovinos *in vitro*, já que proporcionam um sistema com menor possibilidade para a transmissão do vírus, e com isso auxiliar o controle e disseminação da doença, como também o desenvolvimento de embriões bovinos *in vitro* (BIELANSKY *et al.*, 1996).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIELANSKI, A & JORDAN, L. Washing or washing and trypsin treatment is ineffective for removal of noncytopathic bovine viral diarrhoea virus from bovine oocytes or embryos after experimental viral contamination of an *in vitro* fertilization system. *Theriogenology*, v.46, p.1467-1476, 1996.
- DALTON, T.T.; KOVER, K.; DEY, S.K.; ANDREWS, G.K. Analysis of the expression of growth factor, interleukin - 1, and lactoferrin genes and the distribution of inflammatory leukocytes in the preimplantation mouse oviduct. *Biol. Reprod.* v.51, n.4, p.597-606, 1994.
- DESAI, N.N.; KENNARD, E.A.; KNISS, D.A.; FRIEDMAN, C.I. Novel human endometrial cell line promotes blastocyst development. *Fertil. Steril.*, v.61, n.4, p.760-766, 1994.
- GOTO, K.; IWAI, N.; TAKUMA, Y.; NAKANISHI, Y. Co-culture of *in vitro* fertilized bovine embryos with different cell monolayers. *J. Anim. Sci.*, v.70, n.5, p.1449-1453, 1992.
- GOTO, Y.; NODA, Y.; NARIMOTO, K.; SHIOTANI, M.; TOKURA, T.; UMAOKA, Y.; NATSUYANA, S.; MORI, T.; OGAWA, K. Oviduct-derived embryo growth promoting activity: A comparison of these ductal organs. *J. Reprod. Dev.*, v.39, n.2, p.85-89, 1993.
- HERNANDEZ-LEDEZMA, J.J.; VILLANUEVA, C.; SIKES, J.D.; ROBERTS, R.M. Effects of CZB versus medium 199 and of conditioning culture media with bovine oviductal epithelial cells or buffalo rat liver cells on the development of bovine zygotes derived by *in vitro* fertilization procedures. *Theriogenology* v.39, p.1267-1277, 1993.
- KANNO, Y.; HOSHI, K.; KATAYOSE, H.; SUZUKI, R.; SATO, A. Use of frozen-thawed human oviduct epithelial cells for co-culture of early embryos. *Jpn. J. Fertil. Steril.*, v.40, n.2, p.23-29, 1995.
- KAWASHIMA, Y. Effects of cultures rabbit oviducts cells on the development of early mouse embryos. *Jpn. J. Fertil. Steril.*, v.39, n.1, p.59-65, 1994.
- KIM, H.; KIM, S.R.; KIM, M.K.; SCHVETZ, A.W. Oviductal protein produces fluorescence staining of the perivitelline space in mouse oocytes. *J. Exp. Zool.*, v.274 n.6, p.351-357, 1996.
- LEPPENS, G.; GARDNER, D.K.; SAKKAS, D. Co culture of one-cell out bred mouse embryos on bovine kidney epithelial cells: Effect on development, glycolytic activity, inner cell mass: trophoctoderm rations an viability. *Hum. Reprod.* (Oxford), v.11, n.3, p.598-603, 1996.
- MANUAL DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES. Seção III: Pesquisa sobre a transmissão de enfermidades pela transferência de embriões. Savoy, Illinois 61874 USA, International Embryo Transfer Society, INC., 1993 p.17-22.
- MENCK, M.C.L.R. *Desenvolvimento in vitro de embriões bovinos em sistemas de co-cultura com células VERO*. Ribeirão Preto: 1994. 83p. [Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto].
- MINAMI, N. Early embryonic development under oviductal influence *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.*, v.42, n.1/4, p.361-369, 1996.
- MINAMI, N.; UTSUMI, K.; IRITANI, A. Oviductal tissue is effective at a certain critical age of mouse embryo. *Theriogenology*, v.35, n.1, p.85-89, 1991.
- OESH, F. & DIENER, B. Cell systems for use in studies on the relationship between foreign compound metabolism and toxicity. *Pharmacol. Toxicol.*, v.76, p.325-372, 1995.
- SAKKAS, D. Preimplantation mouse embryos in co-culture different cell types. *Contracept. Fertil. Sex.*, v.20, n.10, p.959-962, 1992.
- SENDAI, Y.; KOMIYA, H.; SUZUKI, K.; ONUMA, T.; KIKICHI, M.; HOSHI, H.; ARAKI, Y. Molecular cloning and characterization of a mouse oviduct-specific glycoprotein. *Biol. Reprod.*, v.53, n.2, p.285-294, 1995.
- SHARIF, H.; VARGAS, C.; LONERGAN, S.; GALLAGHER, M.; KINIS, A.; GORDON, I. Development of early bovine embryos in the isolated mouse oviduct maintained in organ culture. *Theriogenology*, v.35, n.1, p.147-153, 1991
- SPARKS, A.E.T.; GWAZDAUSKAS, F.C.; MCGILLIARD, M.L. Culture of one-cell bovine embryos in explanted mouse oviduct and bovine oviductal epithelial cells. *Theriogenology*, v.37, p.585-594, 1992.
- SPARKS, A.E.T.; GWAZDAUSKAS, F.C.; MCGILLIARD, M.L. Nonspecies-specific effects of mouse oviducts on the development of bovine IVM/IVF embryos by a serum free co-culture. *Theriogenology*, v.41, p.1435-1445, 1994.
- THIBIER, M. Transferência de Embriões: O meio mais seguro no plano sanitário para troca de genes. *Ars Vet.*, v.9, n.2, p.89-104, 1993.
- ZUROVAC, O.V.; STRINGFELLOW, D.A.; BROCK, K.V.; RIDDELL, M.G.; WRIGHT, J.C. Noncytopathic bovine viral diarrhoea virus in a system for *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*, v.41, p.841-853, 1994.

Recebido em 29/5/02

Aceito em 27/10/02