



**IMPACTO DA LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA NA PRODUÇÃO  
*IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

**VINICIUS SCENEGAGLIA POTASIO DOS SANTOS**

**São Paulo  
2018**

**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São  
Paulo**

**Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios**

**Instituto Biológico**

**Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança  
Alimentar e Ambiental no Agronegócio**

**Impacto da Leucose Enzoótica Bovina na produção *in vitro* de  
embriões bovinos**

Vinicius Scenegaglia Potasio dos Santos

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

**São Paulo**

**2018**

Eu **Vinicius Scenegaglia Potasio dos Santos**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico, de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura: Vinicius A. P. Santos Data 5, 6, 18

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo**  
**Núcleo de Informação e Documentação – IB**

Santos, Vinicius Scenegaglia Potasio dos.  
Impacto da Leucose Enzoótica Bovina na produção *in vitro* de embriões bovinos.  
/ Vinicius Scenegaglia Potasio dos Santos - São Paulo, 2018.  
43 p.  
doi: 10.31368/PGSSAAA.2018.D.VS08

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.  
Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.  
Linha de pesquisa: Gestão Sanitária e Ambiental na produção animal

Orientador: Edviges Maristela Pituco.  
Versão do título para o inglês: Impact of Enzootic Bovine Leukosis on the *in vitro* production of bovine embryos

1. FIV 2. VLB 3. LEB 4. qPCR 5. Infecção experimental I. Santos, Vinicius Scenegaglia Potasio dos II. Pituco, Edviges Maristela III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

IB/Bibl./2018/008

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Vinicius Scenegaglia Potasio dos Santos

Título: Impacto do vírus da Leucose Enzoótica Bovina na produção *in vitro* de embriões bovinos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia do agronegócio, da Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

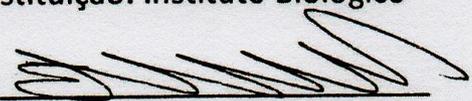
Aprovado em: 30 /05/2018

Banca Examinadora

Profª. Dra: Edviges Maristela Pituco

Instituição: Instituto Biológico

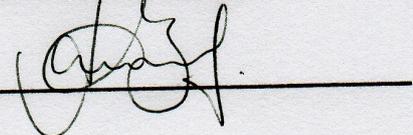
Julgamento: Aprovado

Assinatura: 

Dra. Andrea Cristina Basso

Instituição: In Vitro Brasil

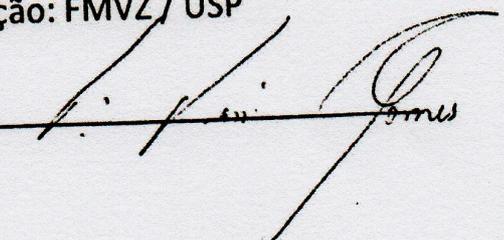
Julgamento: Aprovado

Assinatura: 

Dra. Viviani Gomes

Instituição: FMVZ / USP

Julgamento: Aprovado

Assinatura: 

**Vinicius Scenegaglia Potasio dos Santos**

**Impacto da Leucose Enzoótica Bovina na produção *in vitro* de embriões bovinos**

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

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade do Agroecossistema.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edviges Maristela Pituco

**São Paulo**

**2018**

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à Deus, à minha esposa Lygia, aos meus pais Eliane e Ovidio e ao meu irmão Ovidio Júnior, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e me dando condições para realização deste trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Profa. Dra. Edviges Maristela Pituco**, por me receber no Laboratório, confiou em mim sem me conhecer direito e me proporcionou desenvolvimento científico e profissional neste período.

À **Dra. Líria Hiromi Okuda**, membro suplente da banca, que tanto me ajudou no meu experimento, me auxiliando em todo o processo, sempre acessível, disposta a ajudar e me motivando a continuar.

À **Dra. Andrea Basso**, membro da banca, médica veterinária na In Vitro Brasil, pela confiança em me permitir fazer parte desse trabalho, correções precisas do texto, trazer experiência profissional junto à entidades que fornecem informações para formulação de legislações sobre o projeto.

À **Dra. Vivian Gomes**, membro da banca, professora da FMVZ-USP, por ter aceitado o convite próximo ao dia da defesa e abordando o trabalho sempre pensando no impacto econômico no agronegócio.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa**, membro da banca de qualificação, professor da FZEA-USP, pela atenção, correções e elorias do meu trabalho.

À **Dra. Cláudia Del Fava**, pesquisadora do Instituto Biológico, por me apresentar à minha orientadora, por me treinar em atividades competentes a área de anatomia patológica, me levar a eventos relacionados a medicina veterinária e confiar a mim trabalho que publicamos em parceria.

À **Msc. Vivian da Silva Cardoso Pinto** e a **equipe da In Vitro Brasil**, por terem feito a produção de embriões e pelos esclarecimentos do processo.

À **Marta Elisabete Scarelli Vicente**, laboratorista do LVB, por me auxiliar bastante na parte prática do experimento, me ajudando a fazer as etapas da PCR, sempre prestativa e atenciosa. Foi excelente trabalhar com ela.

À **Dra. Vera Letticie Azevedo Ruiz**, professora da FZEA-USP, por me indicar à **Dra. Josete Garcia Bersano** para ingressar na pós-graduação do Instituto Biológico.

À toda equipe do LVB: **Alisete, Taís Ávila, Adriana Nogueira, Eliana De Stefano** pela atenção e ajuda desde que entrei no laboratório.

A todos pós-graduandos tanto da minha turma de mestrado, quanto as que eram do LVB e de fora: **Maira de Souza** (em uma conversa de 10 minutos me esclareceu o processo que deveria fazer naquela etapa em que estava no trabalho, me ajudando muito), **Adeline, Larissa e Bianca** as quais também me ajudaram no trabalho.

A todos os professores e membros da pós-graduação do Instituto Biológico.

E à minha família que formei no último semestre do mestrado, à minha esposa **Lygia**, companheira, sempre me dando sábios conselhos e mesmo não entendendo quase nada do assunto, se mostrava interessada no meu trabalho. Aos meus pais, **Eliane** e **Ovidio** que são meus grandes exemplos de persistência e dedicação. Ao meu irmão **Ovidio Junior** que trabalhou muito no meu lugar para que eu pudesse concluir o mestrado.

À CAPES pela bolsa.

## EPÍGRAFE

*“Consagre ao Senhor tudo o que  
você faz, e os seus planos  
serão bem-sucedidos”*

*Bíblia NVI - Provérbios 16:3*

SANTOS, Vinicius Scenegaglia Potasio. Impacto da Leucose Enzoótica Bovina na produção *in vitro* de embriões bovinos. 2018. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2018.

## RESUMO

A produção de *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos é uma técnica largamente utilizada para aceleração do melhoramento genético dos rebanhos. O Brasil é o principal produtor mundial de embriões através dessa tecnologia. Com a implementação de ferramentas de criopreservação e transporte, os embriões podem ser deslocados por toda parte do mundo, impulsionando o comércio internacional de genética bovina. Frente a isso, autoridades sanitárias dos países importadores exigem certificado veterinário internacional, que garanta embriões livres de patógenos. Um dos vírus de grande preocupação em barreiras sanitárias é o vírus da Leucose Bovina (VLB), causador da Leucose Enzoótica Bovina (LEB). A Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões e a Organização Mundial de Saúde Animal preconizam medidas sanitárias a fim de mitigar o risco de patógenos estarem presentes no processo e assim não transmitir a infecção. Este trabalho tem por objetivo avaliar os possíveis efeitos do agente VLB na PIVE e elaborar um protocolo sanitário para certificar embriões bovinos produzidos *in vitro* como livres deste agente. O experimento foi realizado com 9 grupos, sendo que 8 tiveram o meio de maturação de oócitos contaminado com diferentes concentrações do VLB e o grupo controle não foi experimentalmente contaminado. Os insumos utilizados na PIVE, bem como o sêmen, foram previamente certificados como negativos para LEB. A técnica de escolha para detecção do agente foi a reação em cadeia da polimerase quantitativa, utilizando o sistema SYBR Green. O exame foi eficaz para detecção do vírus tanto em oócitos, na etapa de maturação, quanto em blastocistos, na última etapa da PIVE. Não houve diferença estatística entre as taxas de clivagem e de blastocistos viáveis. O presente trabalho conseguiu elaborar um método eficaz e prático para detecção do vírus da LEB em matriz de PIVE e poderá ser uma ferramenta utilizada em protocolos de comercialização internacional de embriões bovinos.

**Palavras-chave:** FIV, VLB, LEB, qPCR, infecção experimental.

SANTOS, Vinicius Scenegaglia Potasio. Impact of Enzootic Bovine Leukosis on the in vitro production of bovine embryos. 2018. Dissertation (Master's Degree in Health, Food and Environmental Security in Agribusiness) - Biological Institute, Agribusiness Technology Paulista, Agriculture and Supply Secretariat of the State of São Paulo, São Paulo, 2018.

### ABSTRACT

The in vitro production of bovine embryos (IVPBE) is a technique widely used to accelerate the genetic improvement of the herds. Brazil is the main producer of embryos worldwide through this method. With the advancement of preservation and transport techniques, embryos can be displaced throughout all over the world, boosting the international trade in bovine genetics. In front of this, the health authorities of the importing countries require an international veterinary certificate, which guarantees embryos free of pathogens. One of the viruses of great concern is the Bovine Leukosis Virus (BLV), causing of Enzootic Bovine Leukosis (EBL). The International Society of Embryo Technology and the World Organization for Animal Health recommend measures sanitary to mitigate the risk of pathogens present in the process and, this way, not infected. The objective of this study is to evaluate the possible effects of the agent in PIVE and to elaborate a protocol to certify BLV free bovine embryos produced in vitro. Were made 9 groups, where 8 were experimentally contaminated with oocyte maturation media, with different concentrations of VLB, and one group without contamination. The inputs used in IVPBE, as well as the semen, were previously certified as negative for EBL. The technique of choice for detecting of agent was the chain reaction from quantitative polymerase using the SYBR Green system. The test was effective for detecting of the virus in both oocytes at the maturation stage and in blastocysts at the last stage of IVPBE. There was not statistical difference between cleavage rates and viable blastocysts. The present work was able to elaborate an effective and practical method for the detection of EBL virus in IVPBE matrix and can be a tool used in international embryo marketing protocols.

**Key words:** FIV, VLB, LEB, qPCR, experimental infection

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Curva de amplificação de cada diluição do VLB em triplicata.....	29
Figura 2 - Curva de <i>melting</i> com picos entre 81 e 83°C.....	29
Figura 3 - Curva padrão estabelecida para qPCR de VLB usando o sistema SYBR Green.....	30

**LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 - Representação esquemática do protocolo de produção <i>in vitro</i> de embriões e colheita de amostras para testes .....	16
Quadro 2 - Quantidade de oócitos por grupo .....	17
Quadro 3 - Esquema representando grupos controle e infectados, com respectivas diluições e quantidade de oócitos .....	18
Quadro 4 - Classificação dos embriões e estruturas em relação à qualidade, segundo recomendações da IETS (1999) .....	20
Quadro 5 - Condições de ciclagem (DIAS et. al., 2012).....	22
Quadro 6 - Quantidade de reagentes utilizados para amplificação com concentração final de <i>primers</i> de 0,75 $\mu$ M.....	23
Quadro 7 - Quantidade de reagentes utilizados para amplificação com concentração final de <i>primers</i> de 0,48 $\mu$ M .....	23
Quadro 8 - Quantidade de reagentes utilizados para amplificação com concentração final de <i>primers</i> de 0,37 $\mu$ M .....	23
Quadro 9 - Quantidade de reagentes utilizados para amplificação com concentração final de <i>primers</i> de 0,26 $\mu$ M.....	23
Quadro 10 - Quantidade de reagentes utilizados para amplificação com concentração final de <i>primers</i> de 0,25 $\mu$ M.....	24
Quadro 11 - Quantidade de reagentes utilizados para amplificação com concentração final de <i>primers</i> de 0,20 $\mu$ M.....	24

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Quantidade de oócitos por estágio e respectiva proporção. CIV: cultivado <i>in vitro</i> ; CLIV: clivado.....	26
Tabela 2 - Quantidade e proporção dos estágios dos embriões e qualidade destes. CLIV: clivados, Mo: mórula; Bi: blastocisto inicial; Bl: blastocisto; Bx: blastocisto expandido; Bn: blastocisto eclodindo; Be: blastocisto eclodido.....	26
Tabela 3 - Quantidade e proporção dos oócitos clivados e não clivados, embriões viáveis e estruturas degeneradas. CLIV: clivados.....	27
Tabela 4 - Resultados de qPCR de amostras de insumos de PIVE contaminados com o VLB.....	31
Tabela 5 - Resultados da qPCR de amostras de PIVE. SBMIV: sobrenadante do meio de maturação <i>in vitro</i> ; CN: controle negativo; MIV: meio de maturação <i>in vitro</i> ; ELAV: embriões lavados.....	32

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

°C - Graus Celsius

ATCC - American Type Culture Collection

Be - Blastocisto eclodido

Bi - Blastocisto inicial

Bl - Blastocisto

Be - Blastocisto eclodindo

BSA – Bovine Seric Albumin (Albumina Sérica Bovina)

Bx - Blastocisto expandido

CCO - Complexo cumulus oócito

CCPS - Centros de Coleta e Processamento de Sêmen

CIV - Cultivo de desenvolvimento *in vitro*

CLIV - Clivado

CN - Controle negativo

Cp - Crossing point

dPCR - Reação em cadeia da polimerase digital

DNA - *deoxyribonucleic acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

FIV - Fertilização *in vitro*

IB - Instituto Biológico

IDGA - Imunodifusão em gel de ágar

IETS - International Embryo Technology Society (Sociedade Internacional de Transferência de Embriões)

LEB - Leucose Enzoótica Bovina

LVB - Laboratório de viroses de bovídeos

MEM - meio essencial mínimo

MIV - Maturação *in vitro*

Mo - mórula

mRNA - *Messenger Ribonucleic Acid* (Ácido ribonucleico mensageiro)

N<sub>2</sub> - Nitrogênio

O<sub>2</sub> - Oxigênio

OIE - Organização Internacional das Epizootias (Organização Mundial de Saúde Animal)

OPU - Ovum pick up

pb - Par de base

PCR - Reação em cadeia da polimerase

qPCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativa

RNA - *Ribonucleic Acid* (Ácido ribonucleico)

SVO - Serviço Veterinário Oficial

SFB - Soro fetal bovino

T<sub>m</sub> - Temperatura de *melting*

V - Voltagem

xg - Força centrífuga

ZP - Zona pelúcida

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Produção de embriões <i>in vitro</i> .....	3
2.2. Leucose enzoótica bovina.....	8
2.3. Reação em Cadeia pela Polimerase Quantitativa (qPCR).....	12
3. OBJETIVOS .....	14
3.1. Geral .....	14
3.2. Específicos .....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1. Produção <i>in vitro</i> de embriões e exposição ao vírus da LEB .....	15
4.2. Análise molecular do vírus da LEB.....	20
4.3. Detecção viral por meio da qPCR.....	22
4.4. Análise estatística .....	25
5. RESULTADOS.....	26
5.1. Maturação dos oócitos e fertilização <i>in vitro</i> .....	26
5.2. Avaliação da morfologia e viabilidade dos embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> expostos ao VLB .....	26
5.3. Análise estatística.....	27
5.4. Detecção viral por meio da qPCR.....	27
6. DISCUSSÃO .....	33
7. CONCLUSÃO.....	36
8. REFERÊNCIAS .....	37

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa um lugar de destaque no cenário mundial da criação de bovinos, possuindo o maior rebanho comercial com 218,2 milhões de cabeças em 2016 (IBGE, 2018). Em relação à produção de carne bovina é o segundo maior produtor, ficando atrás dos Estados Unidos em 2017 e, no mesmo ano, foi o terceiro maior consumidor (7750 ton), ficando atrás da China (8227 ton) e dos americanos (12046) (USDA, 2018). A exportação de carne bovina até outubro de 2017, cresceu 5% em quantidade e 10% em valor, em relação ao mesmo período do ano passado, totalizando 4,1 bilhões de dólares, Hong Kong, Egito e China foram os principais destinos. A projeção para 2025 é de o consumo doméstico aumentar e o volume de exportações quase duplicar (ABIEC, 2017).

Em relação à bovinocultura de leite, em 2016, o Brasil era o quarto maior produtor mundial, atrás de Estados Unidos, Índia e China. A produtividade animal, apesar de estar aquém do desejado, de 2014 para 2015 cresceu 7,4% e 4,3% no ano seguinte, chegando a 1709 kg/cabeça/ano (CARVALHO; CARNEIRO, 2018).

Atender e superar as expectativas nas atividades pecuária deve ser o foco para o setor (CARVALHO; CARNEIRO, 2018). Para tanto, a reprodução e sanidade animal devem estar bem alinhadas, garantindo oferta de produtos seguros para o consumo.

As biotecnologias da reprodução podem ser utilizadas como ferramentas de multiplicação de animais de interesse econômico, em maior escala por período de tempo. Uma das técnicas de uso crescente é a PIVE, a qual permite obter maior número de filhos por fêmea por ano; maior aproveitamento de partidas de sêmen; possibilidade de utilização de sêmen e oócitos de bovinos em qualquer parte do mundo, entre outros (GONÇALVES et al., 2014). O Brasil é o país que mais utiliza a PIVE em bovinos no mundo, produzindo, em 2016, 346,8 mil embriões, o que representa 52,7% da produção mundial, seguido pelos Estados Unidos (PERRY, 2017). Outro dado que mostra o expressivo avanço da técnica é a proporção de embriões congelados transferidos no mundo em torno de 74% em 2016 (PERRY, 2017).

A PIVE também diminui a possibilidade de agentes patogênicos infectarem o embrião, embora o risco seja relevante (BIELANSKI, 1999). Dentre os principais agentes infecciosos envolvidos com a reprodução está o vírus causador da LEB, VLB (BUTEL, 2012). A doença, de caráter crônico, apresenta principalmente queda na produção e neoplasias (D'Angelino, 1991). O vírus é endêmico no Brasil, sendo encontrado em todas as regiões do país, diferentemente da Europa, onde muitos países já erradicaram a doença (D'Angelino, 1991). O VLB pode estar presente nos insumos utilizados na PIVE e no sêmen (Narumoto, 2013).

Devido a estes riscos, há uma preocupação mundial quanto à sanidade dos embriões e a eventual transmissão destes patógenos. A Organização Mundial de Saúde Animal, conhecida pela sigla OIE (Organização Internacional das Epizootias) preconiza algumas medidas sanitárias para prevenir a transmissão de patógenos para as fêmeas receptoras e para o futuro bezerro (OIE, 2017). Tais decisões têm como base o Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (1999), onde são descritos procedimentos sanitários adotados na PIVE.

Apesar das recomendações serem bem estabelecidas, exames adicionais são necessários para certificar cada procedimento de produção de embriões como seguro. Assim a PIVE pode ser uma das mais importantes ferramentas comercialização internacional de material genético bovino.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Produção *in vitro* de embriões

Em 1981, nos Estados Unidos, nasceu o primeiro bezerro saudável oriundo de fertilização *in vitro* (FIV) (BRACKETT et al., 1982). Professores da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista "Júlio, de Mesquita Filho" – UNESP Jaboticabal-SP, em 1993 conseguiram obter o primeiro bezerro produto de FIV nacional (WATANABE, 1993). A técnica vem sendo aprimorada a fim de se obter maior número de embriões viáveis por PIVE, buscando mimetizar a situação que ocorre *in vivo* (WRENZYCKI, 2016). A PIVE destaca-se por possibilitar algumas vantagens: melhoramento genético, podendo ser utilizado tanto o macho como a fêmea de elevados valor genético; melhor aproveitamento da quantidade de gametas destes animais; utilização de fêmeas em todas as categorias, podendo ser utilizadas bezerras na obtenção do oócito, diminuindo o intervalo entre gerações; animais que perderam a capacidade reprodutiva por algum problema adquirido ao longo do tempo, entre outros (GALLI et al., 2003; RUMPF, 2007). A técnica também serve de respaldo para outras, como a clonagem por transferência nuclear, a transgenia, a sexagem de espermatozoides e embriões e manipulação e preservação de germoplasma.

Apesar dos avanços das pesquisas, alguns aspectos que ocorrem *in vivo* ainda permanecem desconhecidos, acarretando inconsistência dos resultados de produtividade de embriões. De modo geral, a qualidade dos embriões produzidos *in vitro* ainda é considerada inferior aos produzidos *in vivo*. Contudo, existem protocolos de PIVE bastante eficientes, com resultados satisfatórios que podem ser utilizados em escala comercial (GONÇALVES et. al., 2014; WRENZYCKI, 2016).

#### 2.1.1. Obtenção dos oócitos

Para a realização da PIVE, há a obtenção do complexo cumulus oócito (CCO). A recuperação pode ocorrer *in vivo*, sendo a aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia (Ovum Pick Up - OPU) a forma mais utilizada. Esta técnica se tornou viável desde o início da década de 90, sendo que um dos pontos críticos do processo é a capacidade do profissional em executar o procedimento com precisão, obtendo todo o produto necessário (MERTON et al., 2009). As fêmeas submetidas a OPU devem estar clinicamente saudáveis e pertencentes a rebanhos livres de: febre aftosa, peste bovina, tuberculose, brucelose, LEB em alguns países, diarreia viral bovina e herpes vírus bovino do tipo I. As doadoras podem estar alojadas em fazendas particulares ou em Centros de Produção *in vitro* de Embriões (CPIVE) reconhecidos pelo Serviço Veterinário Oficial (SVO). Estes estabelecimentos,

regulamentados pela Instrução Normativa Nº 57 de 2006 do MAPA, devem estar habilitados pelo SVO correspondente, que controlará pelo menos a cada seis meses, o estado de saúde e o bem-estar dos animais, assim como os métodos utilizados para a coleta de oócitos, procedimentos adotados para a PIVE e os registros efetuados por estes estabelecimentos.

Outra forma comumente utilizada de se obter o oócito, seria a punção *in vitro*, onde se recupera os oócitos a partir de ovários de fêmeas recém-abatidas, podendo ser utilizado para recuperação dos últimos oócitos disponíveis da vida da fêmea. Para tanto as técnicas mais utilizadas são a aspiração, por meio de uma agulha acoplada a uma seringa ou a uma bomba de vácuo, ou também fatiando-se o córtex do ovário e liberando o conteúdo folicular (BERNAL et al., 2015). Alguns trabalhos constataram diferenças entre os métodos, tendo maior praticidade e controle dos folículos coletados através da aspiração folicular *in vivo*. Em parâmetros quali-quantitativos, obtém-se maior quantidade através do fatiamento do ovário e maior qualidade morfológica através da punção *in vitro* (SANTOS et al., 2016).

### **2.1.2. Maturação dos oócitos**

Aproximadamente 80-90% dos oócitos recuperados são submetidos à maturação *in vitro* (MIV), a qual se inicia a partir do momento em que o oócito é retirado do folículo e se estende até a fecundação, durando em torno de 24 horas (MELLO et al., 2016). Nesta etapa espera-se que ocorram transformações nucleares no oócito, dentre as quais se destacam a passagem da meiose I para metáfase da meiose II e, síntese de proteínas e modificações das organelas citoplasmáticas, preparando o oócito para a fecundação (SIRARD, 1998; HYTTEL, 2012). Estas modificações são importantes inclusive para o desenvolvimento embrionário inicial, contando com mitocôndrias, ácido ribonucleico (RNA - *Ribonucleic Acid*) e proteína do oócito (GILBERT et al., 2015).

As células adjacentes ao oócito, pertencentes ao CCO, tem grande importância para a MIV. Há artigos comprovando que as células do cumulus nutrem o oócito através de síntese de transcriptomas de RNA e estes são seletivamente absorvidos pelo gameta (MACAULAY et al., 2014).

Para a maturação oocitária, o meio de cultivo no qual os gametas são depositados e o ambiente devem mimetizar o que ocorre *in vivo*. O fluido folicular sintético é muito utilizado para este fim, contendo, entre outros componentes, piruvato, glutamina, SFB e albumina sérica bovina (BSA), aminoácidos, sais minerais e antibiótico. Fatores de crescimento também podem ser adicionados e, em toda a PIVE, a temperatura e atmosfera gasosa devem ser controladas (38,5°C e 5% CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada) (VARAGO et al., 2008).

Pela preocupação em se avaliar a viabilidade do oócito, Leibfried e First (1979) elaboraram uma metodologia para caracterizá-lo quanto à sua capacidade de ser fecundado e gerar um blastocisto, onde consideraram características do citoplasma do oócito e das células do cumulus, assim como descrito posteriormente por Blondin (1995). Porém, mesmo avaliando estes critérios, podem haver oócitos identificados como de baixa qualidade, mês que são fecundados e se tornam embriões viáveis. Portanto, na prática comercial, por exemplo, quase todos os oócitos coletados são submetidos ao processo de PIVE independentemente de serem classificados como de má qualidade (MELLO et al., 2016).

A falta de elucidação de todos os fatores envolvidos na maturação dos oócitos, bem como a heterogeneidade entre eles faz com que a etapa seja incompleta para alguns consequentemente, a taxa de produção de blastocisto é inferior à produzida *in vivo* (Gonçalves, 2014).

### **2.1.3. Seleção e capacitação espermática**

O termo seleção na PIVE se refere à separação dos espermatozoides viáveis a serem capacitados, fenômeno que o possibilita fecundar o oócito. *In vivo*, os espermatozoides bovinos, uma vez no trato reprodutivo da fêmea, iniciam a seleção e a capacitação na região da vagina e terminam estes processos no oviduto, onde os gametas se encontram (ELLINGTON, 1991). Os espermatozoides, quando da monta natural, são depositados na vagina, onde aqueles que apresentarem baixa retrógrada motilidade são expelidos ou fagocitados. Na cérvix, devido à sua anatomia, os espermatozoides que apresentarem alguma anomalia e diminuição da motilidade, são retidos e não progridem. No útero, tanto na presença de fluidos como pelo contato com o endométrio, os espermatozoides começam a sofrer alterações na membrana celular em torno do acrossoma, o que chamamos de reação acrossoma. Aqueles que chegam ao oviduto finalizam sua capacitação com a perda de componentes que recobrem o flagelo, obtendo a hipermotilidade, essencial para a próxima etapa (SINOWATZ, 2012)

Os espermatozoides viáveis, os quais possuem a membrana íntegra, são selecionados em processos de PIVE, principalmente a partir dos métodos de migração ascendente (*swim-up*) ou de gradiente de densidade, como é o caso do método Percoll (LIU et al., 2013), atualmente o mais utilizado. O processo de *swim-up* elimina debris celulares, plasma e espermatozoides inviáveis, selecionando apenas os que possuem alta motilidade progressiva, obtendo concentração proporcional à qualidade do sêmen inicial. Pelo gradiente de Percoll, a seleção consiste em um gradiente de densidades, por onde os espermatozoides viáveis atravessam formando um “pellet” ao final da

centrifugação (ZÚCCARI et al., 2008), tendo muitas variáveis este método de acordo com o laboratório que o realiza.

A capacitação *in vitro* ocorre no meio onde há fertilização, o qual possui elementos que induzem às modificações metabólicas e biofísicas citadas acima, com destaque para o componente heparina (FUKUI et al., 1990). Ela se liga reversivelmente aos espermatozoides e induz a reação acrossomal, bem como a hipermotilidade flagelar (BORGES et al., 2011).

Os touros utilizados como doadores de sêmen na PIVE devem estar alojados em Centros de Coleta e Processamento de Sêmen (CCPS), os quais a Instrução Normativa Nº 53 de 2006 estabelece medidas para o funcionamento. Entende-se por CCPS, os estabelecimentos que possuem animais doadores de sêmen, alojados em forma permanente ou transitória e que executam os procedimentos de coleta, processamento e armazenamento do sêmen coletado. O estabelecimento deve ser reconhecido pelo SVO correspondente, o qual a cada seis meses, o avalia o estado de saúde e o bem-estar dos animais, assim como os métodos utilizados para a coleta do sêmen e os registros efetuados pelo CCPS.

#### **2.1.4. Fertilização *in vitro***

Este processo envolve modificações no metabolismo e nas propriedades biofísicas da membrana celular do espermatozoide, o que vai culminar com o aumento da motilidade flagelar, importante para a penetração da zona pelúcida (ZP) do oócito e proporcionar a capacidade em fundir-se ao oócito (SINOWATZ, 2012).

Os oócitos maturados e os espermatozoides são depositados no mesmo meio para que ocorra a FIV (GARCIA et al., 2004). Nesta etapa, assim como ocorre *in vivo*, os espermatozoides com hipermotilidade conseguem atravessar as células do cumulus e chegam à ZP. Os receptores da região de ligação da posição equatorial da cabeça do espermatozoide, que irá fecundar o oócito se ligam às glicoproteínas ZP3, presentes na ZP. Esta ligação fixa o espermatozoide à zona. Outro receptor, presente na região promotora da reação acrossômica se liga à ZP3 desencadeando a fusão da superfície externa da ZP com a membrana do acrossoma. A enzima mais abundante que é liberada neste momento é a hialuronidase, a qual degrada a ZP e auxilia a penetração do espermatozoide através da mesma. Após atravessar a ZP o espermatozoide chega ao espaço perivitelino, adere-se ao oócito e se funde ao citoplasma, formando o zigoto. Neste momento, ocorre o bloqueio da fertilização polispérmica, a retomada da meiose e a formação dos pró-núcleos, o que culmina com a primeira clivagem (SINOWATZ, 2012).

### **2.1.5. Cultivo dos embriões**

O zigoto recém formado é transferido para um novo meio de cultivo no qual se desenvolverá. Após a primeira mitose, o zigoto passa a ser chamado embrião, sofrendo diversas mitoses subsequentes, processo chamado clivagem. Cerca de 48 horas após a fertilização e após várias mitoses, dá-se a formação da mórula, quando o jovem embrião atinge cerca de 50-80 células. Conforme o embrião se desenvolve, ao redor de 4 e 5 dias após a FIV, inicia-se a formação da blastocèle, uma cavidade formada de líquidos que aumenta com o passar das horas até a expansão do embrião, formando o blastocisto. Ao sétimo dia após a FIV, o blastócito expandido está pronto para ser transferido para a receptora, onde dará origem ao feto (VEJLSTED, 2012).

### **2.1.6. Diretrizes sanitárias na PIVE**

As diretrizes recomendadas pela OIE e Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS - International Embryo Technology Society) abordam desde as instalações, equipamentos e a equipe técnica que irá realizar a aspiração folicular e a manipulação, transporte e armazenamento dos oócitos e embriões, até as condições sanitárias dos animais doadores.

Em relação ao embrião, o manual da IETS recomenda procedimentos para eliminar ou inativar possíveis patógenos aderidos à ZP, e a forma de maior redução dessa possibilidade é com o uso da tripsina. O método deve ser realizado apenas em embriões que tiverem a ZP intacta, com o uso de ponteiros estéreis e individuais para cada lavagem. Deve-se lavar dez ou menos embriões por vez e no mínimo dez lavagens, com o fator de diluição requerido de 1:100. O procedimento é realizado da seguinte forma: os embriões são lavados em cinco banhos com solução salina fosfatada tamponada contendo antibióticos e 0,4% de BSA e, então passar por duas lavagens utilizando solução com tripsina 0,25%, permanecendo os embriões em cada lavagem de 30 a 45 segundos em exposição à enzima e, em seguida, os embriões devem passar por mais cinco banhos de salina fosfatada tamponada contendo antibiótico e 2% de soro ou 0,4% de BSA, para remoção da atividade enzimática restante (STRINGFELLOW; SEIDEL, 1999).

### **2.1.7. Acordos de comercialização internacional de embriões produzidos *in vitro*.**

No Brasil, o MAPA é o órgão responsável por regulamentar os acordos com o SVO de outros países, tanto à exportação quanto à importação de embriões bovinos. O Sistema de Informação de Requisitos e Certificados da Área Animal do MAPA possui os acordos realizados com diversos países

para comercialização dos embriões, os quais todos preconizam as medidas presentes no Código Sanitário para Animais Terrestres da OIE e do Manual da IETS (disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sisrec/manterDocumento.action>). Há acordos bilaterais para o comércio de embriões produzidos *in vitro* com a Argentina, Bolívia e Colômbia, por exemplo, onde as doadoras devem estar alojadas nos CPIVE e não necessariamente mencionam sobre a necessidade de estarem certificadas como livres do VLB. Já no acordo com Moçambique existe a necessidade de as doadoras de oócitos e embriões serem livres do vírus da LEB.

## **2.2. Leucose enzoótica bovina**

### **2.2.1. Etiologia**

A LEB é causada pelo VLB, com seu genoma em RNA vírus com duas fitas simples, da família *Retroviridae*, da subfamília *Orthoretrovirinae* e do gênero *Deltaretrovirus*. Possui a enzima transcriptase reversa que transcreve seu RNA em ácido desoxirribonucleico (DNA - *deoxyribonucleic acid*), penetrando no núcleo das células e integrando-se ao genoma do hospedeiro (BUTEL, 2012).

### **2.2.2. Epidemiologia**

A doença já foi relatada em todos os continentes e atualmente alguns países tem adotado programas para erradicá-la de seu território, sendo que alguns países da União Europeia são considerados livres da doença (EFSA, 2015). O critério utilizado por esta organização é um elevado índice de rebanhos selecionados como livres do VLB, em no mínimo 99,8%.

No Brasil, em todas as regiões, estudos já relataram a ocorrência de animais soropositivos para anticorpos anti o VLB (TOSTES, 2005), com destaque para a prevalência levantada no estado do Pará, 49,8% (MOLNÁR et al., 1998) e São Paulo, 52,0% (MEGID et al., 2003). Vale citar que em muitos dos trabalhos mencionados, havia ocorrência de animais infectados em praticamente todos os rebanhos avaliados.

Devido à forma de transmissão da doença, por meio de material (seringas, agulhas, luvas de palpação retal, material cirúrgico) contaminado com sangue de animais infectados, quanto mais tecnificado e intensivo for o sistema de produção da propriedade, maior a probabilidade de disseminação do vírus devido a contaminação iatrogênica (DEL FAVA; PITUCO, 2004). A susceptibilidade genética também contribui, sendo de maior risco de sofrer infecção os animais com

maior aptidão em produção leiteira (DA et al., 1993). D'Angelino (1991) em sua pesquisa verificou que a taxa de prevalência aumentava à medida em que a faixa etária dos animais se elevava, encontrando taxa de 26,2% em bezerros de até 6 meses e 70,6% em animais acima de 60 meses, o que evidencia que o risco de doenças crônicas aumenta com o avançar da idade em vista ao maior tempo de exposição ao vírus.

Heidman e colaboradores (2015) sugerem que instalações onde os animais ficam aglomerados e com temperaturas baixas, aumentam a sobrevivência do vírus no ambiente e induz o maior contato entre os animais, elevando à morbidade do VLB na propriedade.

### **2.2.3. Cadeia epidemiológica**

A fonte de infecção do VLB são os bovinos (*Bos indicus* e *Bos taurus*) principalmente, portadores sintomáticos ou assintomáticos. Além dos bovinos e os demais animais susceptíveis à infecção em condições naturais são capivaras e búfalos (RAVAZZOLO; COSTA, 2007).

O agente penetra no bovino pelas vias intrauterina, oronasal, intrarretal, e através de qualquer ferimento hemorrágico causado por material contaminado com o vírus, como em casos de cirurgias, coleta de sangue, vacinação, entre outros (KOBAYASHI et al., 2014). Como o agente se encontra no plasma sanguíneo e nas células mononucleares, principalmente nos linfócitos B, o vírus é eliminado por toda excreção e secreção, como colostro, leite, saliva e sêmen (NARUMOTO, 2013; YUAN et al., 2015).

A transmissão horizontal é o principal meio de infecção dos animais, destacam-se o meio iatrogênico (palpação retal, cirurgias e coletas de sangue com reutilização de materiais entre os animais) e contato intenso entre animais infectados e sadios devido a (EVERMANN, 2014). O risco de transmissão vetorial através de moscas hematófagas foi evidenciado por Kobayashi e colaboradores (2014). Há também transmissão vertical, relacionando-se diretamente à carga viral da mãe com a infecção do feto (MEKATA et al., 2014).

### **2.2.4. Patogenia**

O agente tem como células-alvo primária os linfócitos B e de acordo com a sensibilidade genética do animal, o VLB se replica nas células de defesa, integrando-se ao genoma do hospedeiro e reduzindo a eficácia das mesmas (OLIVER-ESPINOSA et al., 1994; MIRSKY et al., 1996). Há proliferação exacerbada de células mononucleares em órgãos do sistema linfático e em outros tecidos deste sistema, gerando leucocitose, linfocitose persistente, formas celulares atípicas e neoplasias (BIRGEL,

1982).

### **2.2.5. Sinais clínicos**

Cerca de 33% dos bovinos infectados desenvolvem leucose persistente e de 1 a 5% desenvolvem linfomas decorrentes de uma exacerbada infiltração monocítica (OIE, 2017). Os sinais ocorrem de acordo com o local da neoplasia. Os linfonodos superficiais aparecem aumentados, porém pode ocorrer que apenas os viscerais se alterem. Obstruções no trato gastrointestinal podem ocorrer, causando timpanismo, inapetência e perda de peso. Neoplasias no sistema nervoso, como na medula espinhal, podem acarretar distúrbios neurológicos e paralisias. Outros sistemas podem ser acometidos, como o circulatório, respiratório, reprodutor e urinário (LEUZZI JUNIOR et al., 2001).

### **2.2.6. Diagnóstico**

A detecção precoce do agente pode ser realizada por meio da PCR, sendo este método vantajoso em relação ao imunodiagnóstico (IDGA e ELISA), pois identifica o animal infectado antes da soroconversão que pode ocorrer em até 16 semanas (DEL FAVA; PITUCO, 2004; JIMBA et al., 2010; DIAS et al., 2012; ). Entre 3 a 16 semanas após a infecção, os anticorpos mais comumente encontrados são contra as glicoproteínas p24 e gp51, sendo esta última mais utilizada por produzir anticorpos mais precoces (OIE, 2012). A forma de diagnóstico direta é a mais oportuna em materiais utilizados para PIVE, e a PCR é o único teste direto recomendado pela OIE, para detecção do VLB (OIE, 2012).

### **2.2.7. Prevenção e controle**

Para o controle da LEB em uma propriedade, é primordial o conhecimento de quais animais são soropositivos e soronegativos, sendo aconselhável apartar um grupo do outro. Materiais possivelmente contaminados, como agulhas, lâminas de bisturi, seringas e luvas de palpação retal, não devem ser reutilizadas. Bezerros recém nascidos de vacas sabidamente portadoras do VLB não devem receber diretamente o colostro, que deve passar por um processo prévio de congelamento ou pasteurização, ou ainda provir de uma vaca sã. Bovinos devem ser certificados como livres do VLB antes de serem introduzidos no rebanho de doadores de material genético (OIE, 2012). A erradicação de casos de LEB em uma propriedade pode ser feita eliminando os animais soropositivos de forma gradual, para que não ocorra diminuição brusca do plantel e cause impacto econômico na atividade

(DEL FAVA; PITUCO, 2004).

### **2.2.8. Importância da LEB**

A principal importância da LEB é o prejuízo econômico que causa na cadeia produtiva. (D'Angelino, 1991) comparou 196 animais soronegativos para VLB com 351 soropositivos e constatou que a produção dos animais infectados era 11% menor. Erskine e colaboradores (2012) também associaram a infecção com a diminuição da produção leiteira e, conseqüentemente, da rentabilidade. Outros pesquisadores, além de verificarem que animais portadores do vírus possuem uma redução significativa na produção de leite, este ainda tem menor teor de gordura (Da et al., 1993). Devido à redução de quantidade e qualidade do leite, o período de produção da fêmea é reduzido e a taxa de descarte se eleva (D'Angelino, 1991). Pode ainda perdas econômicas em abatedouros, por comprometimento parcial ou total da carcaça, devido aos linfomas desenvolvidos.

Além das perdas econômicas diretas, causadas pela diminuição do rendimento dos animais, há perdas pelo risco de disseminação da doença através dos produtos biológicos oriundos de tais animais, como sêmen e embriões, impactando na comercialização internacional (OIE, 2017).

Muitos produtores, em países sem programas oficiais de controle, praticam voluntariamente medidas para obter rebanho livre da doença, bem como países que possuem programa de controle e erradicação da LEB acatam as orientações recomendadas pela OIE e não importam germoplasmas com riscos de estarem contaminados (EFSA, 2015).

### **2.2.9. VLB na PIVE**

Para algum patógeno infectar o embrião, alguns eventos devem acontecer: o agente precisa alcançar a membrana celular, do oócito ou do embrião, atravessando a zona pelúcida ou aproveitando o rompimento da mesma. Após o alcance, deve haver receptores específicos nas membranas celular, principalmente para vírus, os quais irão permitir a interação e conseqüentemente a penetração do agente na célula. E este ponto é um dos principais fatores de resistência, sendo que a ausência de um ou mais receptores já pode impedir a infecção. Finalmente, no interior da célula, o agente deve possuir um mecanismo celular ativo que possibilite sua replicação genômica e produção de proteínas. Caso o agente não consiga penetrar na célula, pode ocorrer de estar aderido à ZP e assim ser carregado pelo embrião na implantação e possivelmente infectar a receptora e o futuro bezerro (STRINGFELLOW; SEIDEL, 1999).

O VLB já foi encontrado em sêmen e SFB (FUSUMA et al., 2013; NARUMOTO, 2013). Já no interior de oócitos e embriões não foi encontrando (STRINGFELLOW; SEIDEL, 1999).

Uma revisão detalhada indica que os riscos de infecção do embrião durante a PIVE utilizando sêmen contendo VLB é quase desprezível (WRATHALL et al., 2006). Bielanski e colaboradores (2000) não relataram influência negativa da presença do VLB adicionado experimentalmente sobre o desempenho da PIVE. Apesar destes indícios, o VLB está entre os quatro vírus que possuem significado especial para o comércio internacional de gametas ou embriões (os demais: Herpes vírus bovino tipo I, vírus da Diarreia Viral Bovina e vírus da Língua Azul).

As autoridades veterinárias estão especialmente preocupadas com a validade da certificação utilizada para garantir que os embriões estejam livres de determinadas doenças de difícil diagnóstico (STRINGFELLOW; SEIDEL, 1999).

Considerando a importância do VLB, pelo seu impacto econômico elevada prevalência no Brasil e pela sua importância no cenário do comércio internacional, é importante a realização de estudos que corroborem com a literatura e que detectem a presença do agente a fim de que sirvam a eventuais legislações que possam regulamentar o transporte de gametas e embriões.

### **2.3. Reação em Cadeia pela Polimerase Quantitativa (qPCR)**

A metodologia da qPCR consiste em uma amplificação convencional de DNA, porém a detecção e monitoramento dos produtos de amplificação são feitos ao longo dos ciclos em tempo real, baseado na emissão e quantificação de um sinal fluorescente feito pelo fluoróforo, em nosso caso o SYBR® Green PCR Master Mix (Roche®). Este reagente capta e emite luz em um determinado comprimento de onda, o qual é captado por um sistema óptico que é convertido em dados no software ligado a um equipamento, foi usado o Light Cycler 480 (Roche®), disponível no LVB/IB (MACKAY, 2004).

O interessante do SYBR® Green é que emite luz a partir do momento em que se liga a fitas duplas de nucleotídeos e deixa de emitir quando não está ligado mais. Tende, portanto, a elevar a emissão de luz a cada ciclo no qual o alvo é copiado. Um parâmetro utilizado neste sistema é o crossing point, determinado pelo momento onde a fluorescência se eleva ao ponto de se considerada significativa e, assim, torna-se um dos indicadores para determinar se a amostra possui ou não a sequência alvo. Também há como se estabelecer a curva de melting, que consiste em avaliar a diminuição da emissão de fluorescência na reação. Obtém-se a curva após o último ciclo de amplificação, a partir da elevação gradual da temperatura do termociclador, acarretando a ruptura das ligações de fita dupla dos nucleotídeos e o desligamento do SYBR® Green. O programa gera um gráfico da quantidade de emissão de luz e, quando 50% da fluorescência acaba, é neste momento que

é gerado o pico da curva de melting ou temperatura de melting ( $T_m$ ), apontando a temperatura na o evento ocorreu. Este parâmetro é utilizado para dar especificidade ao teste, devido este ponto estar associado especificamente ao alvo a ser amplificado da PCR (MACKAY, 2004).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Geral

Avaliar os possíveis efeitos do VLB no desenvolvimento e viabilidade de embriões produzidos *in vitro*.

#### 3.2. Específicos

- Estabelecer protocolos de PCR quantitativa (qPCR) para identificação do patógeno em sistema de PIVE.
- Avaliar se há efeito do VLB na taxa de clivagem.
- Avaliar se há efeito do VLB na taxa de embriões viáveis.
- Propor protocolo sanitário para certificação de embriões livres do vírus da LEB produzidos *in vitro*.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Produção *in vitro* de embriões e exposição ao vírus da LEB**

#### **4.1.1. Insumos de origem animal utilizados no processo**

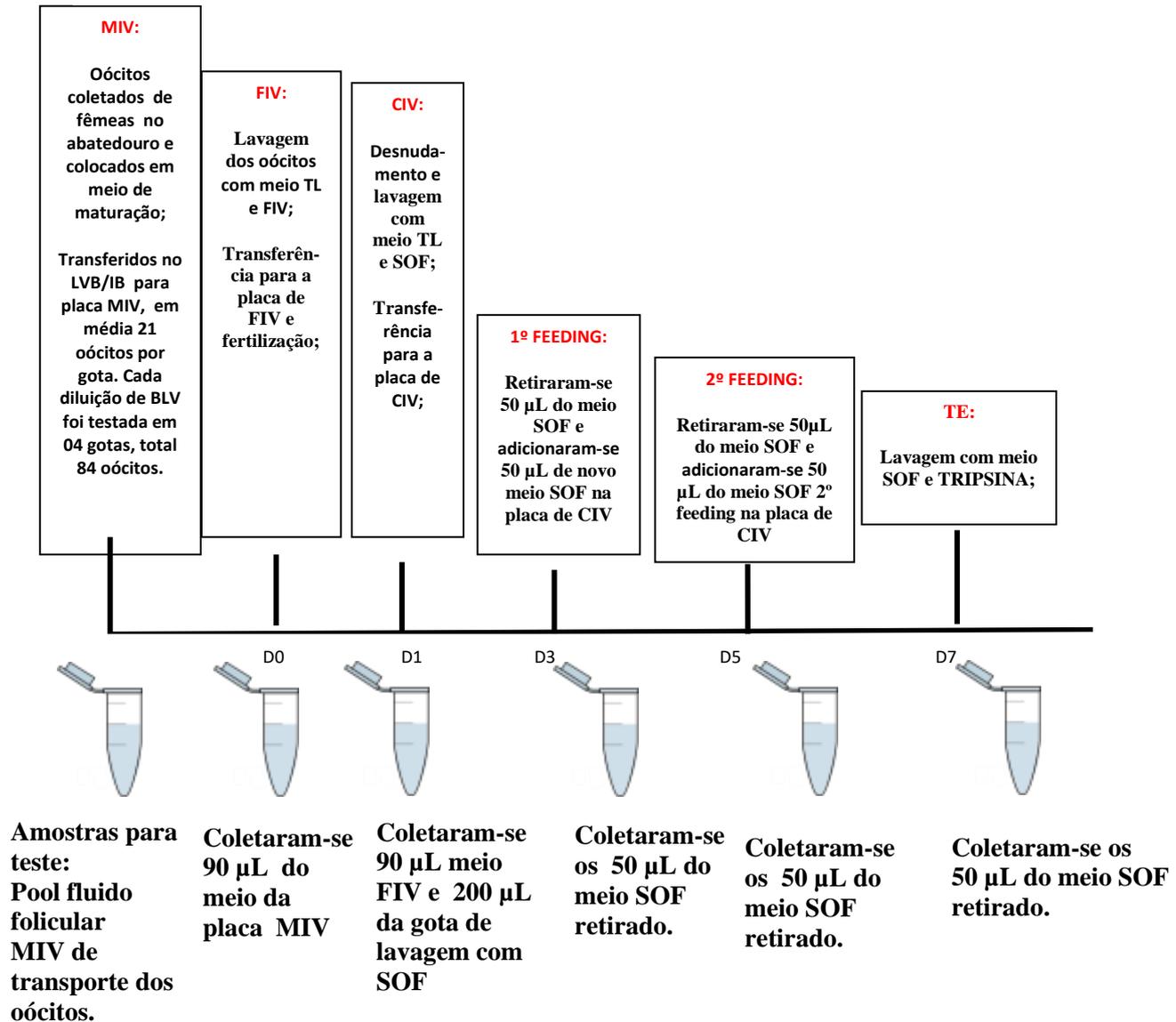
SFB, BSA, tripsina, sêmen, oócitos e fluido folicular foram testados por métodos moleculares, antes da PIVE, para certificação de material livre do vírus da LEB.

Testes para detecção do VLB foram realizados nos meios de cultivo e estruturas (oócitos não clivados, embriões degenerados e viáveis) de cada etapa do processo, conforme apresentado nos quadros 1 e 2 (06 etapas da PIVE - D0 a D7), para investigar após infecção experimental dos oócitos a eficiência dos procedimentos de lavagem dos oócitos e embriões, na eliminação do VLB.

#### **4.1.2. Delineamento experimental**

Os oócitos foram divididos em 9 grupos, compostos em média por 84 oócitos cada, sendo 08 grupos infectados no dia zero, momento da transferência dos oócitos dos tubos para a placa (D0 maturação dos oócitos-MIV), com vírus da LEB pertencente à coleção viral do Laboratório de Virose de Bovídeos / Instituto Biológico (LVB/IB), amostra identificada pelo número 1017/14, e um grupo controle negativo (sem exposição ao vírus). Foram utilizadas as diluições  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$  do vírus da LEB para infecção experimental de cada grupo (Quadro 1).

**Quadro 1:** Representação esquemática do protocolo de produção *in vitro* de embriões e colheita de amostras para testes.



#### 4.1.3. Obtenção dos oócitos

Os oócitos utilizados no experimento foram obtidos de vacas de abatedouro, localizado no interior do Estado de São Paulo, na cidade de Bariri. Os ovários foram removidos cerca de 20 minutos após a morte do animal, no momento da evisceração e depositados em frascos isotérmicos. Os folículos foram aspirados com seringa de 10 mL e agulha calibre 18G, contendo 0,5 mL de solução salina fosfatada. Os fluidos foliculares aspirados foram transferidos para tubo cônico de polipropileno de 50 mL e havendo homogeneização dos conteúdos aspirados entre os ovários para não haver interferência da fêmea na distribuição dos oócitos entre os grupos experimentais. O fluido aspirado ficou decantando por 15 min para a separação dos oócitos.

#### 4.1.4. Seleção e maturação *in vitro* dos oócitos

Ainda no abatedouro, o sedimento foi transferido para placas de poliestireno de 90 mm de diâmetro e visualizado em microscópio estereoscópico, com aumento de 20 a 80 X para proceder à procura dos oócitos.

Foram selecionados para a maturação 764 oócitos de cumulus compacto, com pelo menos três a quatro camadas de células do cumulus e ooplasma de granulação uniforme.

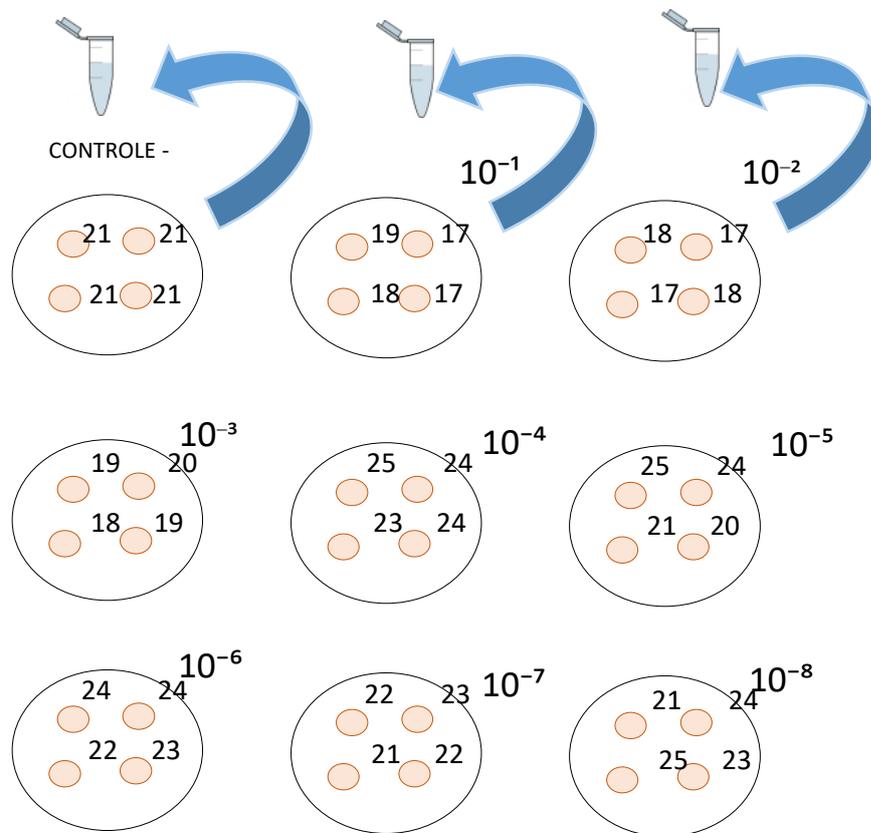
Depois de selecionados, os oócitos foram encaminhados ao LVB/IB em tubos de ensaio contendo meio de maturação. No laboratório, foram obtidas amostras do meio de fluido folicular, bem como dos demais insumos utilizados na PIVE para verificar-se a presença de agentes infecciosos. Todos os resultados foram negativos.

Em média, 21 oócitos foram transferidos dos tubos para placas de maturação por gota, de 100µL de meio MIV contaminado com o VLB em suas respectivas diluições. Na montagem das placas, as gotas eram cobertas com 4 mL de óleo mineral e aquecidas previamente em incubadora por 1 hora em temperatura de 38,5°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada (quadros 3 e 4). As placas contendo os oócitos foram incubadas, nas mesmas condições anteriores durante 20 à 24h.

**Quadro 2:** Quantidade de oócitos por grupo.

<b>Grupo</b>	<b>Número de oócitos</b>
<b>1 - Controle Negativo</b>	84
<b>2 - Infectado VLB 10<sup>-1</sup></b>	71
<b>3 - Infectado VLB 10<sup>-2</sup></b>	70
<b>4 - Infectado VLB 10<sup>-3</sup></b>	76
<b>5 - Infectado VLB 10<sup>-4</sup></b>	95
<b>6 - Infectado VLB 10<sup>-5</sup></b>	90
<b>7 - Infectado VLB 10<sup>-6</sup></b>	93
<b>8 - Infectado VLB 10<sup>-7</sup></b>	88
<b>9 - Infectado VLB 10<sup>-8</sup></b>	97

**Quadro 3:** Esquema representando grupos controle e infectados, com respectivas diluições e quantidade de oócitos.



#### 4.1.5. Exposição dos oócitos ao VLB

Como mencionado anteriormente, a contaminação experimental foi realizada adicionando o vírus na gota onde os oócitos foram maturados. O VLB utilizado faz parte da coleção viral do LVB/IB, identificada com número 1017/14, oriundo de sangue bovino. O espectro de diluição escolhido ( $10^{-1}$  até  $10^{-8}$ ) compreende tanto concentrações superiores ao que se encontra na natureza, quanto concentrações inferiores.

#### 4.1.6. Fertilização *in vitro* dos oócitos bovinos

A FIV (D0) foi realizada após 20 – 24h de maturação dos oócitos, em gotas de 100 $\mu$ L de meio TALP-FIV [meio TALP com 30 $\mu$ g/mL de heparina (Sigma H-3149), 18 $\mu$ M de penicilamina (Sigma P-4875), 10 $\mu$ M de hipotaurina (Sigma H-1384) e 1,8 $\mu$ M de epinefrina (Sigma E-4250)], contendo 0,2mM de piruvato de sódio, 83,4 $\mu$ g/mL de amicacina e suplementado com 6mg/mL de BSA, cobertas com óleo mineral.

O sêmen, congelado em palhetas de 0,5 mL, foi aquecido em água a 35°C por 30 segundos e preparado por centrifugação em gradiente de Percoll (Sigma P-4937), de 45 e 90%, a 900 *xg* por 30min, em meio TALP-sêmen [meio TALP com 10mM de HEPES (J.T. Baker 4018-01)].

O sedimento contendo os espermatozoides foi avaliado quanto à concentração e motilidade espermática. A concentração final foi ajustada para  $25 \times 10^6$  espermatozoides móveis/mL com meio TALP-FIV. Posteriormente, cerca de 8µL do sêmen diluído foram adicionados às gotas de cada subgrupo de oócitos, obtendo-se a concentração final de  $2 \times 10^5$  espermatozoides vivos/gota ( $2 \times 10^6$ /mL), resultando em  $12-14 \times 10^3$  espermatozoides por oócito. O período de incubação foi de 18 a 20h, em incubadora à temperatura de 38,5°C, 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada.

#### **4.1.7. Cultivo *in vitro* (D1 desnudamento e transferência para a placa CIV)**

Após o término da incubação com os espermatozoides (D1), as células do cumulus foram removidas com suave aspiração. Os meios contendo restos de espermatozoides, células do cumulus e as estruturas degeneradas foram recolhidos e armazenados a -20 °C até a realização das análises de PCR.

As estruturas clivadas foram lavadas em meio SOF e submetidos ao cultivo *in vitro* (CIV) de desenvolvimento em placas de poliestireno contendo 100µL de meio SOF, suplementado com 2,5% de SFB, 0,5% de BSA, 0,20 mM de piruvato de sódio (Biochemical 44094) e 83,4 µg/mL de amicacina (Cristalia).

As gotas foram cobertas com óleo mineral e o cultivo realizado em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> + 5% de O<sub>2</sub> + 90% de N<sub>2</sub>, e umidade saturada, à temperatura de 38,5°C, durante 7 dias, até atingirem o estágio de blastocisto. Após 48 horas da fertilização (D3), dia de contagem de clivados e do primeiro “feeding”, retirou-se 50% do meio de cultivo da gota e adicionou a mesma quantidade de meio fresco. O meio removido foi armazenado a -20° C. E novamente, após 48 horas (D5), foi realizado o segundo “feeding”, feito da mesma forma que o primeiro “feeding”. Após 48 horas (D7) os embriões foram avaliados e separados em duas frações, uma contendo os embriões inviáveis e restos da placa de CIV e outra fração com os embriões viáveis.

Os embriões viáveis e com a ZP intacta passaram pelo processo de lavagem recomendado pela IETS, com utilização de tripsina, a fim de eliminar possíveis VLB aderidos aos mesmos.

#### 4.1.8. Avaliação da morfologia e viabilidade dos embriões bovinos produzidos *in vitro* expostos ao VLB

A avaliação dos embriões foi feita em estereomicroscópio (80X-50X), com objetivo de verificar alterações morfológicas nos embriões (quadro 4). O levantamento da viabilidade foi realizado pela taxa de clivagem e de desenvolvimento em blastocisto, tanto nos grupos experimentais contaminados com o patógeno como no grupo controle.

**Quadro 4:** Classificação dos embriões e estruturas em relação à qualidade, segundo recomendações da IETS (1999).

CLASSIFICAÇÃO DE QUALIDADE EMBRIONÁRIA	
GRAU	CLASSIFICAÇÃO
1	<b>Excelente:</b> embriões sem defeitos morfológicos ou extrusões celulares. Máximo potencial de desenvolvimento a fresco ou criopreservado.
2	<b>Bom:</b> embriões com maior número de alterações morfológicas ou extrusões celulares, mas com pelo menos 50% da massa embrionária íntegra e mostrando sinais de desenvolvimento.
3	<b>Regular:</b> extrusões ou fragmentação comprometendo mais que 50% da massa celular e dificultando a classificação das células viáveis. Potencial de desenvolvimento significativamente reduzido.
4	<b>Morto ou degenerado:</b> oócitos não fecundados e embriões com comprometimento definitivo da massa celular, com blastômeros de tamanhos variados, apresentando sinais de degeneração celular, fragmentação e alteração de cor.

#### 4.2. Análise molecular do vírus da LEB

##### 4.2.1. Extração dos ácidos nucléicos

Para obtenção do DNA viral, foi utilizado o reagente TRizo® (Ambion) e extração por coluna de sílica, no equipamento QIAcube® HT (QIAGEN), o qual possui braço robótico, seguindo as instruções dos fabricantes. No sistema automatizado, foi necessário acrescentar meio essencial mínimo (MEM) de cultivo, às amostras dos grupos 1 ao 9 para obter 200 µL final, também recomendado pelo fabricante.

##### 4.2.2. Quantificação do vírus

A tentativa de quantificação do material genético da amostra de VLB controle para cálculo do limite da detecção, foi feita de acordo com as seguintes técnicas:

- Espectrofotometria: o produto da qPCR do VLB foi purificado e quantificado por espectrofotometria (DIAS et al., 2012). Sabendo-se que o alvo da qPCR possui 100pb, o resultado obtido do DNA viral, pelo QuantiFluor® Promega, em massa (ng/μl) foi transformado em número de cópias através da fórmula descrita a seguir (disponível online em: <http://www.scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realtme-pcr>).

Fórmula:

$$\text{Número de cópias} / \mu\text{L} = \frac{6.022 \times 10^{23} \text{ (moléculas / mole)} \times \text{DNA (g / } \mu\text{L)}}{\text{Número de pares de base} \times 660 \text{ daltons}}$$

Onde: 6.022X10<sup>23</sup> (moléculas/mole) - número de Avogadro e 660 daltons - peso médio de um par de bases.

- PCR digital (dPCR): baseado na tecnologia de gotas de emulsão de água-óleo (HINDSON et al., 2011), amostras de meios de maturação e de cultivo e embriões produzidos *in vitro*, contaminados pelo VLB foram submetidas ao teste utilizando reagentes SYBR. Cada amostra foi dividida pelo aparelho Droplet Digital™ PCR em 20.000 gotículas e a amplificação por PCR dos alvos de VLB ocorreram em cada gotícula individualmente. Cada gotícula, quando há reação emite uma fluorescência a qual é captada e os dados são então analisados usando a estatística de Poisson para determinar a concentração do modelo de DNA alvo na amostra. A técnica foi realizada no laboratório da empresa Bio-Rad, detentora dos equipamentos e reagentes.
- Clonagem do amplificado, introduzindo-o em E. coli e replicando-as. Para isso, previamente purificamos o produto da qPCR utilizando Wizard® SV Gel.

#### 4.2.3. Construção da curva padrão para análises da qPCR com a amostra padrão VLB FLK – VR 1315

Para padronização da curva padrão do VLB utilizando o sistema SYBR Green (Roche®), inicialmente foi realizado um gradiente de temperatura dos *primers* para determinar a temperatura adequada para ocorrer a reação sem perda da sensibilidade e especificidade. Para tanto, determinou-se temperaturas variando entre 55°C a 65°C.

Após determinação da melhor temperatura de anelamento dos *primers*, a partir da quantificação do DNA pelo método QuantiFluor® Dyes, foram realizadas diluições seriadas em base 10

da estirpe do VLB FLK-VR 1315 (linhagem de células FLK contaminadas com o VLB e adquirida pelo LVB/IB no American Type Culture Collection na década de 90).

### 4.3. Detecção viral por meio da qPCR

#### 4.3.1. Reação em Cadeia pela Polimerase Quantitativa (qPCR)

O alvo de amplificação da qPCR foi a glicoproteína p51 que codifica o gene do envelope viral (env) a partir dos iniciadores senso AGCAAGGCTGATAATCAGAATCG e antisenso AATGCTTGACCTCTCGCCTTTT seguindo as condições de ciclagem (quadro 5).

**Quadro 5:** Condições de ciclagem (DIAS et. al., 2012).

	Temperatura (°C)	Período	Ciclos
<b>Pré-incubação</b>	95	00:05:00	1
<b>Amplificação</b>	95	00:00:20	45
	60	00:00:45	
	72	00:00:05	
<b>Curva de <i>melting</i></b>	95	00:00:05	1
	65	00:01:00	
	97	-	
<b>Resfriamento</b>	40	00:00:10	1

#### 4.3.2. Desenvolvimento e validação da qPCR

Foram realizadas 33 reações para desenvolvimento e validação do teste, totalizando 717 amostras submetidas à qPCR, tanto de amostras teste (contaminação experimental com VLB), quanto controle negativo (CN) e controle padrão positivo VLB FLK – VR 1315 (CP). Para comprovar o desempenho do método foi utilizado o threshold (Ct) e a repetibilidade do experimento.

As sequências de iniciadores foram verificadas em relação ao GenBank utilizando o algoritmo BLAST para assegurar que eram específicos para VLB (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), e obtiveram 100% de identidade.

Foi feito um gradiente de *primers* utilizando amostra de VLB puro para verificar em qual reação conseguiria os melhores resultados (quadros 6 a 11).

**Quadro 6:** Quantidade de reagentes utilizados para amplificação com concentração final de *primers* de 0,75  $\mu\text{M}$ .

REAGENTES	VOLUME PARA UMA AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO FINAL ( $\mu\text{M}$ )
Água livre de nucleasse	3 $\mu\text{L}$	-
<i>Primer</i> senso VLB 15pmol	1 $\mu\text{L}$	0,75 $\mu\text{M}$
<i>Primer</i> anti senso VLB 15pmol	1 $\mu\text{L}$	0,75 $\mu\text{M}$
Lightcycler 480 SYBR Green I Master	10 $\mu\text{L}$	1X
DNA	5 $\mu\text{L}$	-
<b>Volume final de reação</b>	<b>20 <math>\mu\text{L}</math></b>	

**Quadro 7:** Quantidade de reagentes utilizados para amplificação com concentração final de *primers* de 0,48  $\mu\text{M}$ .

REAGENTES	VOLUME PARA UMA AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO FINAL ( $\mu\text{M}$ )
Água livre de nucleasse	3,7 $\mu\text{L}$	-
<i>Primer</i> senso VLB 15pmol	0,65 $\mu\text{L}$	0,48 $\mu\text{M}$
<i>Primer</i> anti senso VLB 15pmol	0,65 $\mu\text{L}$	0,48 $\mu\text{M}$
Lightcycler 480 SYBR Green I Master	10 $\mu\text{L}$	1X
DNA	5 $\mu\text{L}$	-
<b>Volume final de reação</b>	<b>20 <math>\mu\text{L}</math></b>	

**Quadro 8:** Quantidade de reagentes utilizados para amplificação com concentração final de *primers* de 0,37  $\mu\text{M}$ .

REAGENTES	VOLUME PARA UMA AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO FINAL ( $\mu\text{M}$ )
Água livre de nucleasse	4 $\mu\text{L}$	-
<i>Primer</i> senso VLB 15pmol	0,5 $\mu\text{L}$	0,37 $\mu\text{M}$
<i>Primer</i> anti senso VLB 15pmol	0,5 $\mu\text{L}$	0,37 $\mu\text{M}$
Lightcycler 480 SYBR Green I Master	10 $\mu\text{L}$	1X
DNA	5 $\mu\text{L}$	-
<b>Volume final de reação</b>	<b>20 <math>\mu\text{L}</math></b>	

**Quadro 9:** Quantidade de reagentes utilizados para amplificação com concentração final de *primers* de 0,26  $\mu\text{M}$ .

REAGENTES	VOLUME PARA UMA AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO FINAL ( $\mu\text{M}$ )
Água livre de nucleasse	4,3 $\mu\text{L}$	-
<i>Primer</i> senso VLB 15pmol	0,35 $\mu\text{L}$	0,26 $\mu\text{M}$
<i>Primer</i> anti senso VLB 15pmol	0,35 $\mu\text{L}$	0,26 $\mu\text{M}$
Lightcycler 480 SYBR Green I Master	10 $\mu\text{L}$	1X
DNA	5 $\mu\text{L}$	-
<b>Volume final de reação</b>	<b>20 <math>\mu\text{L}</math></b>	

**Quadro 10:** Quantidade de reagentes utilizados para amplificação com concentração final de *primers* de 0,25  $\mu\text{M}$ .

REAGENTES	VOLUME PARA UMA AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO FINAL ( $\mu\text{M}$ )
Água livre de nucleasse	4,0 $\mu\text{L}$	-
Primer senso VLB 10pmol	0,5 $\mu\text{L}$	0,25 $\mu\text{M}$
Primer anti senso VLB 10pmol	0,5 $\mu\text{L}$	0,25 $\mu\text{M}$
Lightcycler 480 SYBR Green I Master	10 $\mu\text{L}$	1X
DNA	5 $\mu\text{L}$	-
Volume final de reação	20 $\mu\text{L}$	

**Quadro 11:** Quantidade de reagentes utilizados para amplificação com concentração final de *primers* de 0,20  $\mu\text{M}$ .

REAGENTES	VOLUME PARA UMA AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO FINAL ( $\mu\text{M}$ )
Água livre de nucleasse	4,2 $\mu\text{L}$	-
Primer senso VLB 10pmol	0,4 $\mu\text{L}$	0,2 $\mu\text{M}$
Primer anti senso VLB 10pmol	0,4 $\mu\text{L}$	0,2 $\mu\text{M}$
Lightcycler 480 SYBR Green I Master	10 $\mu\text{L}$	1X
DNA	5 $\mu\text{L}$	-
Volume final de reação	20 $\mu\text{L}$	

O Ct, de cada amostra foi determinado quando o sistema começou a detectar um aumento no sinal de fluorescência associado com um crescimento exponencial do produto de PCR durante a amplificação.

Avaliou-se os resultados obtidos no qPCR com a eletroforese, onde os amplicons da qPCR foram corados com mistura do tampão de carregamento 6x (ThermoScientific®) e Gel Red (Biotium®) diluído 1:150 em água Nuclease-free, transferido para gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 1X e submetido à voltagem constante de 100V, 400mA por 1 hora. Após a corrida eletroforética, os produtos foram visualizados no transiluminador sob luz ultravioleta (302nm). Os tamanhos dos fragmentos de DNA eram comparados com um padrão de peso molecular de 100 pb (DNA ladder de 100 pb – ThermoScientific®).

#### 4.3.3. Detecção viral por meio da qPCR de insumos de PIVE contaminados experimentalmente com VLB.

Para avaliação de possíveis inibidores de PCR nos insumos utilizados na PIVE, contaminou-se experimentalmente meios de maturação e de FIV (dez e oito amostras respectivamente), líquido folicular (oito amostras) e meio com debris celulares do último dia (D7) de PIVE (dez amostras). Os

reagentes utilizados foram os mostrados no quadro 3, iguais aos utilizados por Dias e colaboradores (2012).

#### **4.3.4. Detecção viral por meio da qPCR de PIVE contaminados experimentalmente com VLB**

Foram provadas amostras em triplicata do sobrenadante dos tubos utilizados para maturar os oócitos durante o transporte; o meio de cultivo dos oócitos contaminados com o vírus e os embriões viáveis lavados com ZP intacta. Foram utilizados os reagentes do quadro 7.

#### **4.4. Análise estatística**

As taxas de clivagem e de blastocistos (baseadas no número inicial de oócitos) foram analisadas usando método de variância ANOVA e programa estatístico SAS (Statistical Analysis System, NEW YORK, NY). As diluições virais foram utilizadas como uma variável fixa e foram feitas múltiplas comparações pelo teste de Duncan. Os dados serão considerados significativos com  $P < 0.05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Maturação dos oócitos e fertilização *in vitro*.

A maior parte dos oócitos foram fertilizados e clivados (tabela 1).

**Tabela 1:** quantidade de oócitos selecionados para MIV e quantos foram clivados.

Grupos	Nº Oócitos Selecionados	Nº de Oócitos Clivados
CN	84	72
VLB 10 <sup>-1</sup>	71	60
VLB 10 <sup>-2</sup>	70	56
VLB 10 <sup>-3</sup>	76	70
VLB 10 <sup>-4</sup>	95	82
VLB 10 <sup>-5</sup>	90	82
VLB 10 <sup>-6</sup>	93	79
VLB 10 <sup>-7</sup>	88	71
VLB 10 <sup>-8</sup>	97	88

### 5.2. Avaliação da morfologia e viabilidade dos embriões bovinos produzidos *in vitro* expostos ao VLB

Os embriões em sua maioria ou apresentaram qualidade regular (Grau 3) ou não foram fecundados e estavam mortos ou degenerados (Grau 4) (tabela 2).

**Tabela 2:** quantidade de embriões clivados e estágio e qualidade dos embriões no D7. **SEPARAR**

Grupo	CLIV	Mo	Bi	Bl	Bx	Bn	Be	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4
CN	72	16	0	22	2	1	0	0	12	29	43
VLB 10 <sup>-1</sup>	60	2	0	26	0	0	0	0	6	22	43
VLB 10 <sup>-2</sup>	56	0	0	27	1	0	0	1	6	21	42
VLB 10 <sup>-3</sup>	70	0	0	37	0	0	0	0	10	27	39
VLB 10 <sup>-4</sup>	82	1	0	45	1	2	0	0	10	39	46
VLB 10 <sup>-5</sup>	82	0	1	40	1	0	0	1	12	29	48
VLB 10 <sup>-6</sup>	79	5	4	46	1	0	0	1	12	43	37
VLB 10 <sup>-7</sup>	71	4	1	41	4	0	0	1	16	33	38
VLB 10 <sup>-8</sup>	88	15	1	39	1	0	0	0	17	39	41

CLIV: clivados, Mo: mórula; Bi: blastocisto inicial; Bl: blastocisto; Bx: blastocisto expandido; Bn: blastocisto eclodindo; Be: blastocisto eclodido.

### 5.3. Análise estatística

A grande maioria dos oócitos foram fecundados e a maioria dos embriões não se tornaram viáveis, em todos os grupos, sendo que a de menor taxa foi a do grupo do VLB  $10^{-8}$  e maior a do grupo VLB  $10^{-1}$  (tabela 3). Não houve diferença entre as taxas de clivagem e de blastocistos viáveis (valor de P pela ANOVA  $P=0,6911$  e  $0,2834$ , respectivamente).

**Tabela 3:** quantidade e taxas de zigotos clivados e embriões viáveis.

Grupo	Nº de oócitos	Taxa de Clivagem (%)	Taxa de Blastocistos viáveis (%)
CN	84	72 86%	12 14%
VLB $10^{-1}$	71	60 85%	6 8%
VLB $10^{-2}$	70	56 80%	7 10%
VLB $10^{-3}$	76	70 92%	10 13%
VLB $10^{-4}$	95	82 86%	10 11%
VLB $10^{-5}$	90	82 91%	13 14%
VLB $10^{-6}$	93	79 85%	13 14%
VLB $10^{-7}$	88	71 81%	17 19%
VLB $10^{-8}$	97	88 91%	17 18%

CLIV: clivados. Taxas não se diferem com  $P>0,05$ .

### 5.4. Detecção viral por meio da qPCR

#### 5.4.1. Extração dos ácidos nucleicos

O DNA viral foi detectado em amostras com os ácidos nucleicos extraídos pelos 2 métodos, reagente TRizol® (Ambion) e sistema automatizado de extração QIAcube® HT (QIAGEN), usando o kit

de extração Cadon Pathogen por coluna de sílica, mesmo sendo diluído no MEM. O sistema automatizado destacou-se pelo desempenho, com menor tempo para realização desta etapa quando comparado com extração pelo TRizol®. Outra vantagem do equipamento é a obtenção simultânea do RNA e DNA, quando se pretende certificar os embriões para vários agentes, evitando procedimentos separados. O método também apresentou menor risco de contaminação entre as amostras.

#### **5.4.2. Quantificação do vírus**

Utilizando o Droplet Digital PCR (ddPCR™), das 17 amostras oriundas de meios de PIVE contaminados pelo VLB, a carga viral foi de 8 a 31,55 cópias/μL. Quando utilizado o QuantiFluor® Dyes, a partir do VLB-FLK padrão, obteve-se  $2,6 \times 10^{11}$  cópias/μL. A clonagem do amplificado não foi concluída pois não houve a replicação do alvo na E. coli, devido ou a não penetração do alvo na bactéria ou a falta de replicação do mesmo.

Como parâmetro foi utilizado o resultado obtido pelo QuantiFluor® Dyes, por ser o único método consolidado no LVB/IB. O resultado obtido pelo PCR digital não foi considerado pois a reação não estava padronizada, podendo os dados não estarem corretos.

#### **5.4.3. Construção da curva padrão para análise da qPCR**

A amostra padrão FLK-VLB foi diluída  $2,6 \times 10^{11}$  para  $2,6 \times 10^{10}$  e a partir desta foram feitas diluições seriadas até chegarmos a uma concentração de 0,26 cópias/μL ( $10^0$ ). Obtivemos uma reação com erro de 0.354, eficiência de 2.038, slope de 3.235 e interceptação de 32.12 (Figura 1 a 3). Foi determinado o limite de detecção de 13 cópias/5 μL da reação.

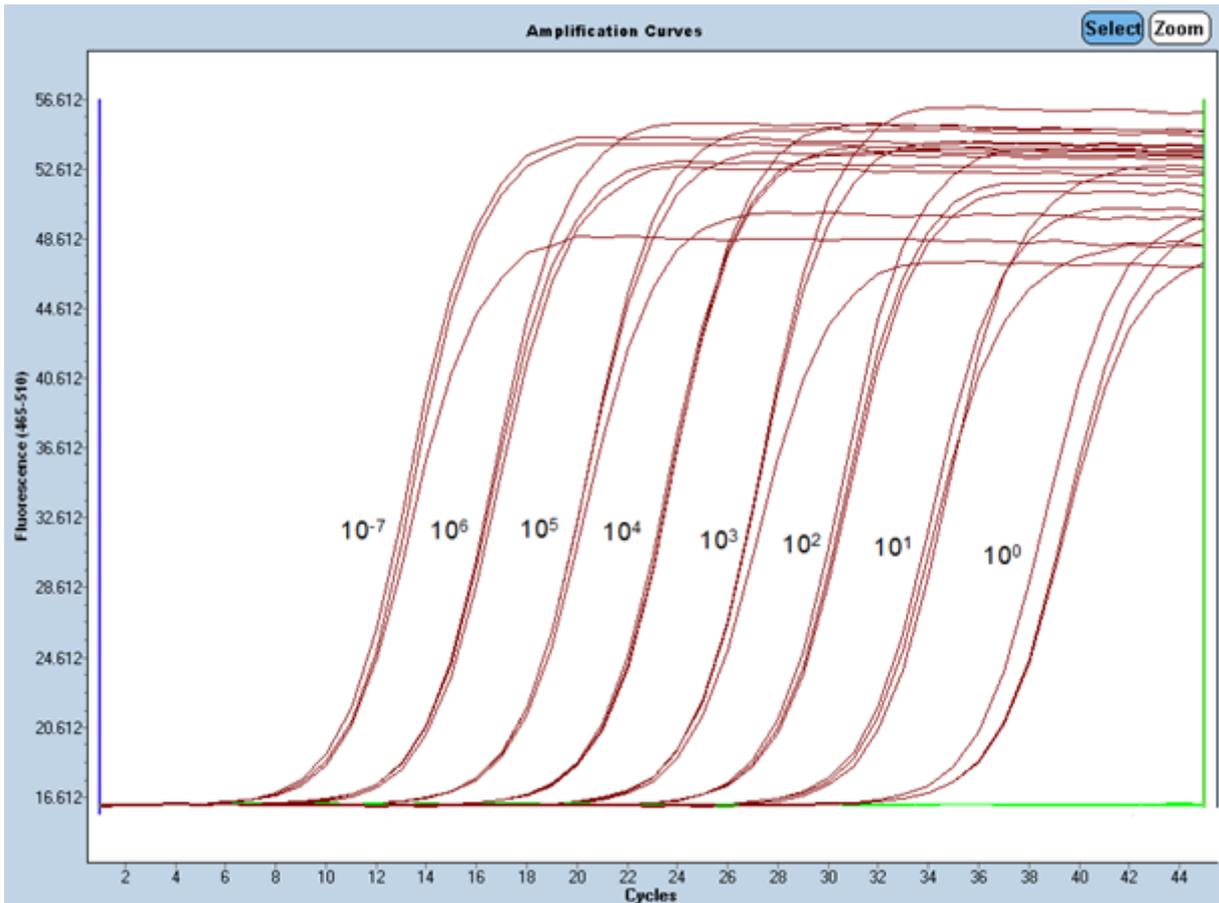


Figura 1: curva de amplificação de cada diluição do VLB em triplicata.

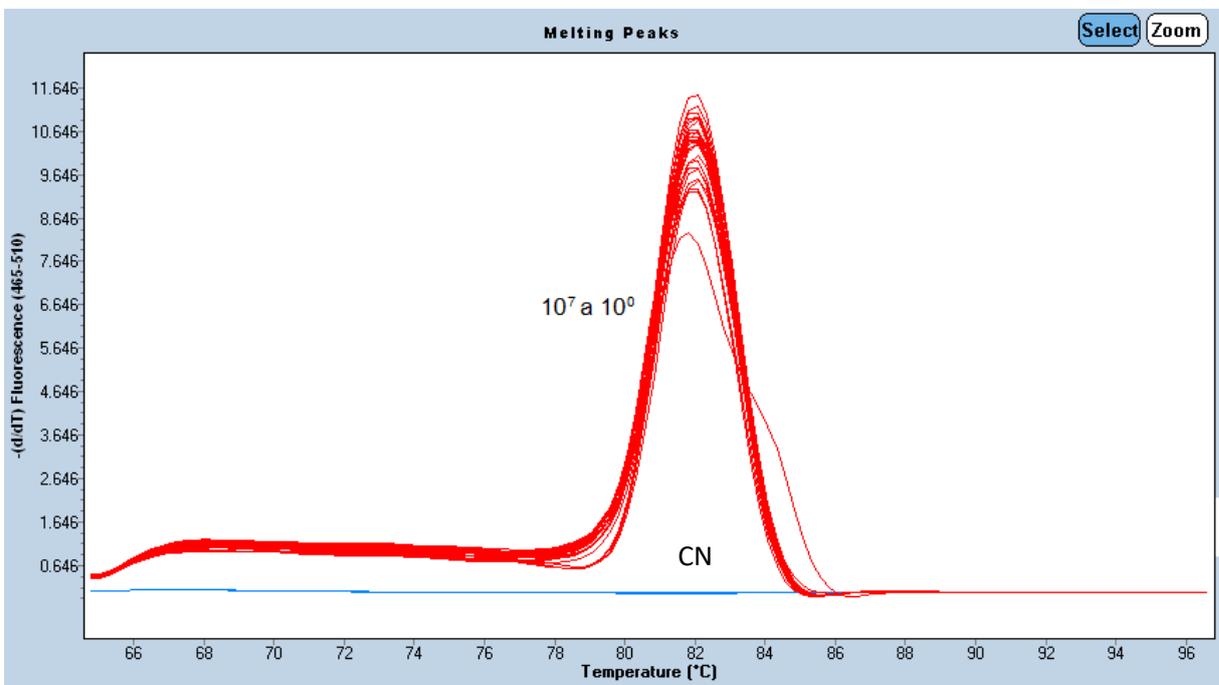
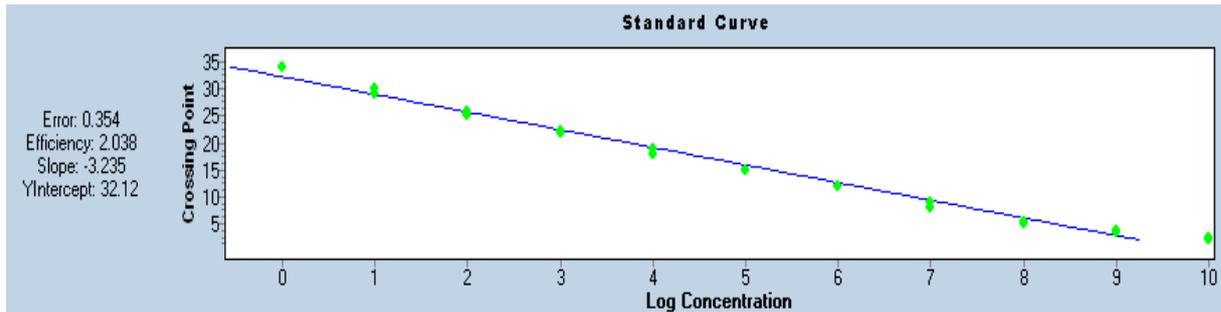


Figura 2: temperatura de *melting* entre 81 e 83°C.



**Figura 3:** curva padrão estabelecida para qPCR de VLB usando o sistema SYBR Green.

#### 5.4.4. Desenvolvimento e validação da qPCR

Validou-se a qPCR realizando 04 repetições, para avaliar a repetibilidade e reprodutibilidade da prova com a estirpe de VLB padrão.

A análise das diluições foi feita em triplicata no mesmo dia e em três dias diferentes para avaliar a repetibilidade e reprodutibilidade do teste. O melhor desempenho na qPCR foi obtido utilizando os *primers* a concentração de 0,37  $\mu\text{M}$  e temperatura de anelamento dos *primers* a 62°C. Esta conclusão foi baseada nos resultados do teste de gradiente de temperatura, variando entre 55°C a 65°C, no termociclador convencional.

#### 5.4.5. Detecção viral por meio da qPCR de insumos de PIVE contaminados experimentalmente com VLB

O Cp das amostras ficou entre os ciclos 11,01 e 38,23 e Tm de 78,85°C a 80,87°C, conforme a tabela 4.

**Tabela 4:** resultados de qPCR de amostras de insumos de PIVE contaminados com o VLB.

Amostras	Crossing point (Cp)	Média	Temperatura de melting (Tm)	Média	Resultado
Meio de maturação <i>in vitro</i> 1	24,32		80,17		
Meio de maturação <i>in vitro</i> 2	22,57		80,24		
Meio de maturação <i>in vitro</i> 3	22,37		80,03		
Meio de maturação <i>in vitro</i> 4	22,86		80,12		
Meio de maturação <i>in vitro</i> 5	22,82	23,06	80,54	80,26	Positivo
Meio de maturação <i>in vitro</i> 6	22,83		80,2		
Meio de maturação <i>in vitro</i> 7	23,83		80,28		
Meio de maturação <i>in vitro</i> 8	23,31		80,16		
Meio de maturação <i>in vitro</i> 9	22,45		80,21		
Meio de maturação <i>in vitro</i> 10	23,31		80,67		
Liquido folicular 1	20,96		79,75		
Liquido folicular 2	12,73		79,88		
Liquido folicular 3	17,91		79,98		
Liquido folicular 4	23,58	20,36	78,85	79,64	Positivo
Liquido folicular 5	22,54		79,53		
Liquido folicular 6	11,01		80,11		
Liquido folicular 7	38,23		79,15		
Liquido folicular 8	15,99		79,92		
Meio de fertilização <i>in vitro</i> 1	22,88		80,34		
Meio de fertilização <i>in vitro</i> 2	22,51		80,37		
Meio de fertilização <i>in vitro</i> 3	22,47		80,33		
Meio de fertilização <i>in vitro</i> 4	23,38	23,4	80,49	80,39	Positivo
Meio de fertilização <i>in vitro</i> 5	24,15		80,18		
Meio de fertilização <i>in vitro</i> 6	24,09		80,32		
Meio de fertilização <i>in vitro</i> 7	23,92		80,87		
Meio de fertilização <i>in vitro</i> 8	23,83		80,27		
Debris celulares (D7) 1	22,72		80,34		
Debris celulares (D7) 2	22,75		80,28		
Debris celulares (D7) 3	22,93		80,47		
Debris celulares (D7) 4	23,38		80,48		
Debris celulares (D7) 5	23,43	23,29	80,28	80,38	Positivo
Debris celulares (D7) 6	23,17		80,33		
Debris celulares (D7) 7	23,36		80,49		
Debris celulares (D7) 8	24,69		80,16		
Debris celulares (D7) 9	22,57		80,35		
Debris celulares (D7) 10	23,91		80,7		

Foram consideradas amostras positivas com Cp 10 ao 35 e Tm de 80 a 83°C, devido às amostras sabidamente positivas, terem apresentado estes resultados repetitivamente.

#### 5.4.6. Detecção viral por meio da qPCR de PIVE contaminados experimentalmente com o VLB

O sêmen utilizado para FIV foi previamente certificado livre de VLB. Uma das amostras do meio de maturação contaminada com a diluição  $10^{-1}$  apresentou resultado de Cp e Tm dentro do esperado, 34,8°C e 81,61°C respectivamente. Já as amostras dos meios de cultivo contaminados com diluição  $10^{-8}$ , amplificou, porém, a Tm foi de 76,3 e 52,54°C. O mesmo aconteceu com a amostra dos embriões lavados, apresentando pico menor que 80°C. Em relação às amostras de sobrenadante do meio de maturação de oócitos, tanto a do controle negativo quanto a de diluição  $10^{-1}$  amplificaram, porém, a curva de *melting* ficou abaixo de 80°C (tabela 5).

**Tabela 5:** Resultados da qPCR de amostras de PIVE.

Grupos	Crossing point (Cp)	Temperatura de <i>melting</i> (Tm) (°C)	Resultado
SBMIV CN	32,87	78,92	Negativo
SBMIV VLB $10^{-1}$	22,88	77,12	Negativo
MIV VLB $10^{-1}$ 01	34,80	81,61	Positivo
MIV VLB $10^{-1}$ 02	32,46	80,35	Positivo
MIV VLB $10^{-8}$ 01	29,80	76,30	Negativo
MIV VLB $10^{-8}$ 02	22,99	52,54	Negativo
ELAV VLB $10^{-1}$	32,25	76,67	Negativo

SBMIV: sobrenadante do meio de maturação *in vitro*; CN: controle negativo; MIV: meio de maturação *in vitro*; ELAV: embriões lavados.

## 6. DISCUSSÃO

O Brasil é líder mundial em produção *in vitro* de embriões bovinos o que proporciona rebanhos de excelente genética, para as raças que se propõe a produzir, especialmente as de origens zebuína. Para potencializar o desfrute destes animais, a exportação de embriões vem como uma alternativa promissora e lucrativa. Países tropicais e subtropicais, em sua maioria, possuem clima, sistema de produção e raças bovinas semelhantes ao brasileiro, sendo os clientes potenciais da genética nacional.

O VLB, por infectar principalmente leucócitos, pode estar presente na PIVE, via insumos, como o SFB e o sêmen. Não há estudos que comprovem se o VLB, uma vez presente no processo da PIVE, é carregado do embrião à receptora, ou se faz com que o bezerro e/ou a receptora se tornem infectados. Por isso, há barreiras sanitárias para embriões, impostas por países importadores livres desse vírus, para não terem o risco de introduzir material biológico infectado ou com potencial transmissão. Devido à falta de dados científicos que evidenciem o real risco de disseminação do VLB, quando embriões são produzidos *in vitro*, a tendência dos países é impedir a importação de material genético de países onde a doença ocorre de forma endêmica. Gard (2015) ressalta a importância de pesquisa para avaliação de eventuais patógenos carregados pelos embriões, e o impacto que a ausência destes estudos causam na comercialização internacional destes produtos. A falta de legislação específica acarreta diminuição do desfrute dos animais. Neste sentido torna-se fundamental a validação de protocolos de análise molecular para certificação de embriões livres de VLB, que possam ajudar nas tomadas de decisões.

O diagnóstico por qPCR foi o escolhido por possuir vantagens, quando comparado ao convencional, como menor tempo gasto na execução do ensaio; fácil realização, sendo necessária apenas uma reação, diminuindo a chance de contaminação das amostras e maior sensibilidade em relação ao PCR convencional. Heenemann e colaboradores (2012) também conseguiram amplificar o VLB, porém utilizando outro sistema de emissão de luz para detecção da amplificação, o de sonda e com o gene alvo diferente para amplificação, o da polimerase. O sistema SYBR Green escolhido neste trabalho, possui menor custo em relação ao de sonda (MACKAY; LANDT, 2007; YEH et al., 2009).

Reproduzindo o protocolo de Dias e colaboradores (2012), como validação interlaboratorial para detecção de VLB utilizando PCR em tempo real, os resultados foram inconsistentes. Os ensaios realizados apresentaram inespecificidade, sem reprodutibilidade, nem repetibilidade. Provavelmente devido à concentração de reagentes e equipamentos diferentes entre os ensaios realizados e pelo presente ensaio não ter utilizado o sistema Plexor<sup>®</sup>, o qual modifica o *primer*. Para contribuir no aprimoramento desse método, vários ensaios foram realizados em nosso experimento.

O melhor desempenho nas amplificações e maior especificidade da reação qPCR ocorreu após elevar em 2°C a temperatura de anelamento, em comparação com Dias e colaboradores (2012). Além

disso, foi necessário diminuir a concentração de *primers*, dessa forma, obteve-se resultados mais específicos, eliminando-se as inconsistências, como diluições com carga mais alta de vírus com resultados negativos e vice-versa. Fato derivado possivelmente do sistema SYBR Green, devido sua ligação à fita dupla de ácido nucleico, provavelmente estaria se ligando aos dímeros formados pelos *primers*, uma vez que os  $T_m$  não eram semelhantes aos resultados esperados.

O  $T_m$  considerado para amostras positivas (80 a 83°C), é diferente do qual Dias e colaboradores obtiveram (81 a 82°C), possivelmente devido à diferença entre equipamentos e insumos utilizados, bem como alguma diferença na sequência gênica do VLB utilizado.

A técnica se apresentou eficaz em detectar a presença de VLB em amostras oriundas do processo de PIVE. Todas as amostras infectadas experimentalmente apresentaram os resultados esperados, indicando ausência de inibidores nas amostras. Diferentemente do que foi encontrado por Pinto (2016), a qual contaminou o meio de maturação de oócitos com o vírus da Diarreia Viral Bovina, e foi necessário diluir amostras de meio de maturação *in vitro* para conseguir realizar a qPCR. Dias e colaboradores (2012), partindo de matriz sanguínea de bovinos, também não encontraram inibidores de PCR para teste com VLB. Arruda (2007) também conseguiu obter resultados satisfatórios utilizando qPCR pelo sistema SYBR Green na detecção de retrovírus de amostras de soro sanguíneo. Portanto, com algumas alterações na metodologia conseguimos reproduzir os resultados obtido por Dias e colaboradores (2012).

Os resultados também indicaram que o processo de lavagem dos embriões recomendado pelo Manual da IETS é eficaz para eliminação da presença de partícula viral de VLB na fase final da PIVE (D7), onde ocorre a lavagem com tripsina. Bielanski e colaboradores (2000) também não encontraram presença em embriões com ZP intacta ou com ela já rompida. Isso pode ocorrer devido a ZP e a membrana celular do embrião não possuir receptores que se liguem às proteínas do envelope do VLB, ou a tripsina foi eficaz de romper essa ligação entre o VLV e a ZP.

Em relação ao desempenho da PIVE, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos em relação as taxas de clivagem e blastocisto viáveis. Bielanski e colaboradores (2000) analisaram o desenvolvimento de embriões com a ZP intacta ou sem ela, expostos *in vitro* ao VLB, a partir de contaminação do meio MIV e FIV durante a PIVE. Em ambos os casos não houve diferença entre o grupo CN e o grupo contaminado. Havia 165 oócitos, obtidos de ovários de fêmeas bovinas recém abatidas no grupo do meio MIV contaminado e 265 no grupo CN e as taxas de clivagem e de blastocisto viáveis foram de 63% e de 28% respectivamente, iguais ao do grupo CN. Em nosso experimento partimos de 680 oócitos em meios MIV contaminados e 84 no grupo CN, o qual pode corroborar com os resultados obtidos anteriormente.

Narumoto (2013) pesquisou a presença de anticorpos para o VLB em soro sanguíneo de touros alojados em CCPS no Brasil; utilizando os testes sorológicos imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e ELISA anticorpo, obtivendo 16,87% (97/575) e 26,40% (799/3027) positivos, respectivamente. O mesmo autor, utilizando PCR convencional, também avaliou a presença do vírus nas amostras de sêmen e verificou que 5,26% (300/5704) foram positivas. Alguns pesquisadores relacionaram a presença do vírus à forma de coletar o sêmen. Por ter sido feita por massagem das glândulas seminais, pode ter provocado um processo inflamatório e leucócitos se infiltraram no ejaculado carreando o vírus (LUCAS et al., 1980). Porém, outros pesquisadores, através de lavagens de sêmen e sedimentação-migração (*swim-up*) não conseguiram eliminar o vírus, sugerindo que o agente já estava aderido ao espermatozoide (BIELANSKI et al., 2001).

As autoridades sanitárias de países importadores de sêmen bovino podem exigir a apresentação do certificado veterinário internacional, o qual garanta a impossibilidade de o animal doador ter sido infectado pelo VLB. Para esta certificação, a OIE recomenda que o doador esteja alojado durante todo o período de colheita de sêmen, em um rebanho livre do VLB; ou, sendo o touro com menos de dois anos, deve ser filho de mãe soronegativa; ou ainda, o touro doador tenha sido diagnosticado livre do vírus pelo menos 30 dias antes da coleta e pelo menos 90 dias após a coleta (OIE, 2017). As medidas sugeridas mostram a preocupação com a transmissão do vírus à fêmea, através da monta natural, inseminação artificial e até a contaminação do embrião na produção *in vitro*.

Contrapondo as recomendações da OIE, recentemente foi feito um estudo onde os sêmens de três touros soropositivos ao VLB foram utilizados para PIVE, obtendo-se no total 190 embriões, dos quais nenhum foi positivo ao vírus da LEB (STEWART et al., 2015).

A detecção do vírus no momento da maturação dos oócitos é o principal ponto para o processo, no sentido de interromper ou não a PIVE e evitar eventuais custos desnecessários. Neste sentido, pesquisas para identificação do VLB em oócito bovino, seguindo os procedimentos recomendados pela IETS de obtenção e manipulação do mesmo, não encontrou o vírus em oócitos de fêmeas soropositivas para o agente (CALLAHAN et al., 1976; BOUILLANT et al., 1982; BIELANSKI; MAXWELL; SIMARD, 2000). Há a possibilidade de que, no momento de coleta dos oócitos, a doadora não estivesse em viremia, contudo, o presente trabalho detectou o VLB no meio de maturação *in vitro*, o que assegura a eficiência do teste em certificar o status sanitário na PIVE em seu início.

Neste panorama, onde há grande potencial genético do rebanho a ser explorado e a alta prevalência do VLB no Brasil, mostra-se necessária a realização de novos estudos para corroborar ou não com as barreiras sanitárias recomendadas pela OIE.

## 7. CONCLUSÃO

- A técnica de qPCR, utilizando o sistema SYBR Green, foi eficaz para detecção do VLB, responsável pela LEB, em amostras contendo meios utilizados na PIVE. A sensibilidade do teste garante a detecção em concentração que pode ocorrer *in vivo* ou em insumos de PIVE.
- A lavagem dos embriões recomendada pela IETS foi eficaz na eliminação do VLB.
- O trabalho nos permite propor um protocolo de estudo para que haja definição de procedimentos para certificação de embriões livres de VLB, corroborando com o que já é preconizado pelo Manual da IETS e pela OIE, especificamente o que consta nos capítulos 4.6., 4.7. e 4.8 do Código Sanitário para Animais Terrestres volume I.

## 8. REFERÊNCIAS

- ABIEC. Exportações Brasileiras de Carne Bovina Brazilian Beef Exports Fonte / Source : SECEX-MDIC  
 Categorias / Products : IN NATURA / FRESH BEEF , INDUSTRIALIZADA / PROCESSED , MIÚDOS / OFFALS  
 , SALGADAS / SALTED , TRIPAS / CASINGS Período : jan / 2011 - dez / 2. n. 000, p. 1–20, 2011.  
 Disponível em: <<http://www.abiec.com.br/download/exportacoes-161117.pdf>>.
- BERNAL, S. M.; HEINZMANN, J.; HERRMANN, D.; TIMMERMANN, B.; BAULAIN, U.; GROSSFEL, R.;  
 DIEDERICH, M.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H. Effects of different oocyte retrieval and in vitro  
 maturation systems on bovine embryo development and quality. *Zygote*, v. 23, n. 03, p. 367–377, 15  
 jun. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24423448>>. Acesso em: 13 mar.  
 2018.
- BIELANSKI, A. Potencial para controle ou transmissão de doenças por meio de transferência de  
 embriões produzidos in vitro: uma revisão. In: STRINGFELLOW, D. A. . S. S. M. (Ed.). **Manual da  
 Sociedade Internacional de Transferência de Embrião**. 3ª. ed. São Paulo: SBTE, 1999. p. 47 – 56.
- BIELANSKI, A.; MAXWELL, P.; SIMARD, C. Effect of bovine leukaemia virus on embryonic development  
 and association with in vitro fertilised embryos. *The Veterinary record*, v. 146, n. 9, p. 255–6, 26 fev.  
 2000.
- BIELANSKI, A.; SIMARD, C.; MAXWELL, P.; NADIN-DAVIS, S. Bovine immunodeficiency virus in relation  
 to embryos fertilized in vitro. *Veterinary Research Communications*, v. 25, n. 8, p. 663–673, 2001.
- BIRGEL, E. Leucose enzoótica dos bovinos adultos: aspectos clínicos e diagnósticos. In: BIRGEL, E.;  
 BENESI, F. (Ed.). **Patologia clínica veterinária**. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária,  
 1982. p. 249–260.
- BORGES, J. C.; SILVA, M. R.; GUIMARÃES, J. D.; ESPER, C. R.; FRANCESCHINI, P. H. Membrana  
 plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e  
 criopreservação,. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 35, n. 3, p. 303–314, 2011. Disponível em:  
 <<http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v35n3/pag303-314.pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2018.
- BOUILLANT, A. M.; RUCKERBAUER, G. M.; EAGLESOME, M. D.; SAMAGH, B. S.; SINGH, E. L.; HARE, W.  
 C.; RANDALL, G. C. Attempts to isolate bovine leukemia and bovine syncytial viruses from blood,  
 uterine flush fluid, unfertilized ova and embryos from infected donor cattle. **Annales de recherches  
 vétérinaires. Annals of veterinary research**, v. 12, n. 4, p. 385–95, jan. 1982.
- BRACKETT, B. G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M. L.; DONAWICK, W. J.; EVANS, J. F.; DRESSEL, M. a. Normal

development following in vitro fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v. 27, n. 1, p. 147–158, 1982.

BUTEL, J. S. . Vírus de cânceres humanos. In: BROOKS, G. F.; CARROLL, K. C.; BUTEL, J.S.; MORSE, S. A.; MIETZNER, T. A. (Ed.). **Microbiologia Médica**. 25ª. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012. p. 828.

CALLAHAN, R.; LIEBER, M. M.; TODARO, G. J.; GRAVES, D. C.; FERRER, J. F. Bovine leukemia virus genes in the DNA of leukemic cattle. **Science (New York, N.Y.)**, v. 192, n. 4243, p. 1005–7, jun. 1976.

D'ANGELINO, J. L. **Leucose enzoótica dos bovinos. estudo retrospectivo da performance produtiva e reprodutiva de animais infectados e não infectados**. 1991. Universidade de São Paulo, 1991.

DA, Y.; SHANKS, R. D.; STEWART, J. A.; LEWIN, H. A. Milk and fat yields decline in bovine leukemia virus-infected Holstein cattle with persistent lymphocytosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 14, p. 6538–41, 1993.

DEL FAVA, C.; PITUCO, E. Infecção pelo vírus da leucemia bovina (BLV) no Brasil. **Biológico**, v. 66, p. 1–8, 2004.

DIAS, N. L.; FONSECA JÚNIOR, A. A.; RODRIGUES, D. S.; CAMARGOS, M. F. PCR em tempo real para diagnóstico da leucose enzoótica bovina. **Ciência Rural**, v. 42, p. 1434–1439, 2012.

EFSA - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific opinion on enzootic bovine leukosis. **The EFSA Journal**, v. 13, n. July, p. 63, 2015.

ELLINGTON, J. E. The bovine oviduct and its role in reproduction: a review of the literature. **The Cornell Veterinarian**, v. 81, p. 313 – 328, 1991.

EVERMANN, J. **Cause for Concern: Bovine Leukemia Virus** Washington State University Veterinary Medicine Extension, , 2014. . Disponível em: <[http://vetextension.wsu.edu/wp-content/uploads/sites/8/2015/03/BovineLeukemiaVirus\\_June20141.pdf](http://vetextension.wsu.edu/wp-content/uploads/sites/8/2015/03/BovineLeukemiaVirus_June20141.pdf)>.

FUKUI, Y.; SONOYAMA, T.; MOCHIZUKI, H.; ONO, H.; FIRST, N. L.; FIRST, N. L. Effects of heparin dosage and sperm capacitation time on in vitro fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in vitro. **Theriogenology**, v. 34, n. 3, p. 579–91, set. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16726862>>. Acesso em: 22 mar. 2017.

GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v. 59, n. 2, p. 599–616, 2003.

GARCIA, J.; AVELINO, K.; VANTINI, R. **Estado da arte da fertilização in vitro em bovinos** 1º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada. [s.l: s.n.].

GILBERT, I.; MACAULAY, A.; ROBERT, C. Oocyte developmental competence and embryo quality : distinction and new perspectives. **Anim. Reprod.**, v. 12, n. 3, p. 397–407, 2015.

GONÇALVES, P. B. D., FIGUEIREDO, J. R., FREITAS, V. J. F. . **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2ª. ed. São Paulo: Roca, 2008.

HEENEMANN, K.; LAPP, S.; TEIFKE, J. P.; FICHTNER, D.; METTENLEITER, T. C.; VAHLENKAMP, T. W. Development of a Bovine leukemia virus polymerase gene-based real-time polymerase chain reaction and comparison with an envelope gene-based assay. **Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 24, n. 4, p. 649–55, 2012.

HINDSON, B. J.; NESS, K. D.; MASQUELIER, D. A.; BELGRADER, P.; HEREDIA, N. J.; MAKAREWICZ, A. J.; BRIGHT, I. J.; LUCERO, M. Y.; HIDDESSEN, A. L.; LEGLER, T. C.; KITANO, T. K.; HODEL, M. R.; PETERSEN, J. F.; WYATT, P. W.; STEENBLOCK, E. R.; SHAH, P. H.; BOUSSE, L. J.; TROUP, C. B.; MELLEN, J. C.; WITTMANN, D. K.; ERNDT, N. G.; CAULEY, T. H.; KOEHLER, R. T.; SO, A. P.; DUBE, S.; ROSE, K. A.; MONTESCLAROS, L.; WANG, S.; STUMBO, D. P.; HODGES, S. P.; ROMINE, S.; MILANOVICH, F. P.; WHITE, H. E.; REGAN, J. F.; KARLIN-NEUMANN, G. A.; HINDSON, C. M.; SAXONOV, S.; COLSTON, B. W. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. **Analytical chemistry**, v. 83, n. 22, p. 8604–10, 15 nov. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22035192>>. Acesso em: 27 mar. 2018.

HYTTEL, P. Gametogênese. In: HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. . (Ed.). **Embriologia Veterinaria**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. p. 455.

JIMBA, M.; TAKESHIMA, S.; MATOBA, K.; ENDOH, D.; AIDA, Y. BLV-CoCoMo-qPCR: Quantitation of bovine leukemia virus proviral load using the CoCoMo algorithm. **Retrovirology**, v. 7, n. 1, p. 91, 2010.

KOBAYASHI, S.; HIDANO, A.; TSUTSUI, T.; YAMAMOTO, T.; HAYAMA, Y.; NISHIDA, T.; MUROGA, N.; KONISHI, M.; KAMEYAMA, K.; MURAKAMI, K. Analysis of risk factors associated with bovine leukemia virus seropositivity within dairy and beef breeding farms in Japan: a nationwide survey. **Research in veterinary science**, v. 96, n. 1, p. 47–53, 2014.

LEUZZI JUNIOR, L. A.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. . Leucose enzoótica bovina e vírus da leucemia bovina. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, p. 211–221, 2001.

LIU, B.; CUI, Y.; YU, S. Effect of Swim-Up and Percoll Treatment on Sperm Quality and In vitro Embryo Development in Yak. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 12, n. 12, p. 2235–2242, 2013.

MACAULAY, A. D.; GILBERT, I.; CABALLERO, J.; BARRETO, R.; FOURNIER, E.; TOSSOU, P.; SIRARD, M.-A.;

CLARKE, H. J.; DOUARD, É.; KHANDJIAN, W.; RICHARD, F. J.; HYTTEL, P.; ROBERT, C. The Gametic Synapse: RNA Transfer to the Bovine Oocyte. **BIOLOGY OF REPRODUCTION**, v. 9190, n. 4, p. 1–12, 2014. Disponível em: <[https://oup.silverchair-cdn.com/oup/backfile/Content\\_public/Journal/biolreprod/91/4/10.1095\\_biolreprod.114.119867/1/biolreprod0090.pdf?Expires=1489428720&Signature=DlhYJ4l1cq6wwRd-7QHB7tEhBaltug4d6rjQ1mUz~5hki0jezMajTdO8AwU7SmFSYvc53IGU9f946rMCwtc7PThDm0pkac12yFVERxn9zd~qs-Zoac9A~U-N~Pn4ShZStzK5NEXT7HE6Qo0o5M1IU4Z72nwXJqu6rEE2laie0kW3jBxQvZuMjz316Buh2SeuEkwusVV~IIZELyR~DqCrDkHHCQG8wtrYtmyK5uudEY1WqPbb5qHtDqdHaTh3PZGr8fgXF-KONnTu8L0ZePGNDgHkfPoR8aTsUMSYybdIYJRa35ivyBp7cuHSOOV-YQNXQoyKxFEr6pDao3G0-btRg\\_\\_&Key-Pair-Id=APKAIUCZBIA4LVPVW3Q](https://oup.silverchair-cdn.com/oup/backfile/Content_public/Journal/biolreprod/91/4/10.1095_biolreprod.114.119867/1/biolreprod0090.pdf?Expires=1489428720&Signature=DlhYJ4l1cq6wwRd-7QHB7tEhBaltug4d6rjQ1mUz~5hki0jezMajTdO8AwU7SmFSYvc53IGU9f946rMCwtc7PThDm0pkac12yFVERxn9zd~qs-Zoac9A~U-N~Pn4ShZStzK5NEXT7HE6Qo0o5M1IU4Z72nwXJqu6rEE2laie0kW3jBxQvZuMjz316Buh2SeuEkwusVV~IIZELyR~DqCrDkHHCQG8wtrYtmyK5uudEY1WqPbb5qHtDqdHaTh3PZGr8fgXF-KONnTu8L0ZePGNDgHkfPoR8aTsUMSYybdIYJRa35ivyBp7cuHSOOV-YQNXQoyKxFEr6pDao3G0-btRg__&Key-Pair-Id=APKAIUCZBIA4LVPVW3Q)>. Acesso em: 9 mar. 2017.

MACKAY, I. M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 10, n. 3, p. 190–212, mar. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15008940>>. Acesso em: 10 abr. 2018.

MACKAY, J.; LANDT, O. Real-Time PCR Fluorescent Chemistries. In: **Protocols for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes**. New Jersey: Humana Press, 2007. 353p. 237–262.

MEGID, J.; NOZAKI, C. N.; KURODA, R. B. S.; CRUZ, T. F.; LIMA, K. C. Ocorrência de leucose enzoótica bovina na microrregião da Serra de Botucatu. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 5, p. 645–646, 2003.

MEKATA, H.; SEKIGUCHI, S.; KONNAI, S.; KIRINO, Y.; HONKAWA, K.; NONAKA, N.; HORII, Y.; NORIMINE, J. Evaluation of the natural perinatal transmission of bovine leukaemia virus. **The Veterinary Record**, v. 176, n. 10, p. 1–4, 2014.

MELLO, C.; RODRIGUES, R.; FERREIRA, J. E.; LUZIA, S.; SOUSA, G. De; ROBERTO, M.; MELLO, B. De; PALHANO, H. B. Produção in vitro (PIV) de embriões em bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 40, n. 2, p. 58–64, 2016.

MERTON, J. S.; ASK, B.; ONKUNDI, D. C.; MULLAART, E.; COLENBRANDER, B.; NIELEN, M. Genetic parameters for oocyte number and embryo production within a bovine ovum pick-up–in vitro production embryo–production program. **Theriogenology**, v. 72, n. 7, p. 885–893, 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X09002635>>.

MIRSKY, M. L.; OLMSTEAD, C. a; DA, Y.; LEWIN, H. a. The prevalence of proviral bovine leukemia virus in peripheral blood mononuclear cells at two subclinical stages of infection. **Journal of virology**, v. 70,

n. 4, p. 2178–2183, 1996.

MOLNÁR, É.; MOLNÁR, L.; DIAS, H. T.; ALMEIDA, O.; VALE, G. Ocorrência da leucose enzoótica dos bovinos no Estado do Pará, Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 19, p. 7 – 11, 1998.

NARUMOTO, R. . **Situação sanitária de touros residentes em centros de coleta e processamento de sêmen. são paulo**. 2013. Instituto Biológico, 2013.

OIE - CÓDIGO SANITARIO PARA LOS ANIMALES TERRESTRES. **Leucosis bovina enzoótica**. Disponível em: <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahc/current/chapitre\\_ebl.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/current/chapitre_ebl.pdf)>. Acesso em: 24 abr. 2018.

OIE - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. Enzootic bovine leukosis. **Terrestrial Animal Health Code**, 2017. Disponível em: <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.04.11\\_EBL.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.11_EBL.pdf)>. Acesso em: 22 dez. 2015.

OLIVER-ESPINOSA, O. .; PHYSICK-SHEARD, P. W.; WOLLENBERG, G. K. .; TAYLOR, J. . Sporadic bovine leukosis associated with ataxia and tibiotarsal joint swelling: A case report. **Can Vet Journal**, v. 35, n. 12, p. 777–779, 1994.

PERRY, G. . **IETS 2013 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals**International Embryo Transfer Society (IETS). [s.l: s.n.]. Disponível em: <[www.iets.org/pdf/comm\\_data/December2014.pdf](http://www.iets.org/pdf/comm_data/December2014.pdf)>.

PERRY, G. . **2016 STATISTICS OF EMBRYO COLLECTION AND TRANSFER IN DOMESTIC FARM ANIMALS**. Disponível em: <[https://www.iets.org/pdf/comm\\_data/IETS\\_Data\\_Retrieval\\_Report\\_2016\\_v2.pdf](https://www.iets.org/pdf/comm_data/IETS_Data_Retrieval_Report_2016_v2.pdf)>. Acesso em: 8 maio. 2018.

RUMPF, R. Avanços metodológicos na produção in vitro de embriões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 229–233, jul. 2007. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-35982007001000021&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982007001000021&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)>. Acesso em: 26 dez. 2015.

SANTOS, M. V. O.; BORGES, A. A.; NETA, L. B. Q.; PEREIRA, A. F. INFLUÊNCIA DO MÉTODO DE RECUPERAÇÃO OOCITÁRIA SOBRE OS PARÂMETROS QUANTI-QUALITATIVOS DE OÓCITOS BOVINOS INFLUENCE OF THE RECOVERY METHOD ON THE QUANTI-QUALITATIVE PARAMETERS OF BOVINE OOCYTES. p. 105–109, 2016.

SINOWATZ, F. Fertilização. In: HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. . (Ed.). **Embriologia Veterinaria**.

Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. p. 455.

STEWART, J.; RUBESSA, M.; POLKOFF, K.; LOTTI, S.; WHEELER, M. Risk of transmission of Bovine Leukosis Virus (BLV) using seropositive bulls for in vitro fertilization embryo production. **Reproduction, Fertility and Development.**, v. 28, n. 2, p. 245, 2015.

STRINGFELLOW, D. A. ; SEIDEL, S. M. **Manual da sociedade internacional de transferência de embriões: um guia de procedimento e informação geral para uso da tecnologia de transferência de embriões, enfatizando precauções sanitárias.** 3ª. ed. Uberlândia: Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 1999.

TOSTES, R. A. Situação Da Leucose Bovina No Brasil : Uma Revisão. **Colloquium Agrariae**, n. 1, p. 42–50, 2005.

VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; DE, M.; LAGARES, A. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução Bovine in vitro embryo production: state of art and perspective of a constant evolution technique. v. 32, n. 2, p. 100–109, 2008. Disponível em: <www.cbra.org.br>. Acesso em: 8 maio. 2018.

VEJLSTED, M. Clivagem embrionária e blastulação. In: HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. . (Ed.). **Embriologia Veterinaria.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. p. 455.

WRATHALL, A. E.; SIMMONS, H. A.; VAN SOOM, A. Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilisation with virus-infected semen. **Theriogenology**, v. 65, n. 2, p. 247–74, 20 jan. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16005506>. Acesso em: 23 mar. 2018.

WRENZYCKI, C.; ANIMALS, S. In vitro culture systems : how far are we from optimal conditions ? **Anim. Reprod**, v. 13, n. 3, p. 279–282, 2016.

YEH, H.-Y.; YATES, M. V.; CHEN, W.; MULCHANDANI, A. Real-time molecular methods to detect infectious viruses. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 20, n. 1, p. 49–54, 1 fev. 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1084952109000160>. Acesso em: 3 abr. 2018.

YUAN, Y.; KITAMURA-MURAMATSU, Y.; SAITO, S.; ISHIZAKI, H.; NAKANO, M.; HAGA, S.; MATOBA, K.; OHNO, A.; MURAKAMI, H.; TAKESHIMA, S.; AIDA, Y. Detection of the BLV provirus from nasal secretion and saliva samples using BLV-CoCoMo-qPCR-2: Comparison with blood samples from the same cattle. **Virus Research**, v. 210, p. 248–254, 2 dez. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26298004>. Acesso em: 26 jun. 2018.

ZÚCCARI, C. E. S. N. 1; ; CARRIJO, P. R. 2; ; LEITE, P.; ARAKAKI 2; ; SCALDELAI, P. R. R. 2; ; RODOVALHO, N. C. M. 3; ZANENGA, C. A. 3; ; KIEFER, C. 1; ; SILVA, E. V. da C. e; 4. Seleção em gradiente de Percoll® sobre os parâmetros espermáticos do sêmen bovino congelado. **Rev. Bras. Saúde Prod. An**, v. 9, n. 2, p. 358–366, 2008. Disponível em: <file:///C:/Users/Vinicius/Downloads/961-4594-1-PB (2).pdf>. Acesso em: 21 mar. 2017.