

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

**INTERFERÊNCIA DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO VÍRUS DA
DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV) NA EFICÁCIA DA PRODUÇÃO *IN*
VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS**

Andrea Giannotti Galuppo

Porto Alegre
2012

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

**INTERFERÊNCIA DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO VÍRUS DA
DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV) NA EFICÁCIA DA PRODUÇÃO *IN*
VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS**

Aluna: Andrea Giannotti Galuppo

Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias
na área de Reprodução Animal – Biotécnicas de Reprodução.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Rodrigues

Co-orientador: Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal

Porto Alegre

2012

CIP - Catalogação na Publicação

Giannotti Galuppo, Andrea

Interferência da infecção experimental pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) na eficácia da produção in vitro de embriões bovinos / Andrea Giannotti Galuppo. -- 2012.

82 f.

Orientador: José Luiz Rodrigues.

Coorientador: Claudio Wageck Canal.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. reprodução animal. 2. embriologia. 3. virologia. 4. produção in vitro de embriões. 5. controle sanitário. I. Rodrigues, José Luiz, orient. II. Wageck Canal, Claudio, coorient. III. Título.

Andrea Giannotti Galuppo

**Interferência da infecção experimental pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV)
na eficácia da produção *in vitro* de embriões bovinos**

Aprovada em 10 de fevereiro 2012.

APROVADA POR:

Prof. Dr. José Luiz Rodrigues
Orientador e Presidente da Comissão

Profa. Dra. Magali D' Angelo
Membro da Comissão

Prof. Dr. Mario C. S. Brum
Membro da Comissão

Profa. Dra. Adriana Bos Mikich
Membro da Comissão

Prof. Dr. Amauri Braga Simonetti
Membro da Comissão (Suplente)

Dedicatória

Dedico este trabalho as pessoas mais importantes da minha vida, sem as quais eu não teria conseguido chegar até aqui, meu pai Carlos, minha mãe Teresa, minha irmã Renata e ao meu marido Émerson.

Agradecimentos

A Faculdade de Veterinária da UFRGS que forneceu todas as condições necessárias para a realização desse trabalho.

Ao Prof.Dr. José Luiz Rodrigues e Prof.Dr. Claudio Wageck Canal pela importante ajuda na elaboração e execução desse trabalho.

À ABS Pecplan pelo fornecimento das amostras de sêmen.

Ao abatedouro Rost pelo fornecimento dos ovários.

Ao Laboratório de Biologia Celular do Instituto Biológico pelo apoio na realização do teste do Cometa.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado.

A minha amiga e irmã do coração Danielle L Pavão por todo o carinho, apoio e amizade.

Aos amigos Sabrina Lorenzoni e Cristiano Feltrin sem os quais a minha vida teria ficado muito mais difícil.

Àos amigos do Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução Animal e do Laboratório de Virologia da FAVET-UFRGS pela amizade e por estarem sempre prontos a ajudar.

Aos amigos Nelson Beuter Jr, Lis Santos Marques, Catarina Marcon e Matheus Nunes Weber pela ajuda imprescindível e pelo carinho e atenção.

Epígrafe

“A resposta certa, não importa nada:
o essencial é que as perguntas estejam certas”

(Mario Quintana)

Resumo

Os materiais de origem animal utilizados na produção *in vitro* (PIV) de bovinos podem apresentar-se contaminados pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV) quando provenientes de animais infectados. Tendo isso em vista é importante realizar estudos aplicados para minimizar a transmissão de patógenos via biotécnicas de reprodução. Os objetivos desse trabalho foram avaliar a capacidade dos métodos de processamento seminal, Swim up, gradiente de Percoll e a combinação Swim up/Percoll em reduzir ou eliminar o BVDV de amostras de sêmen experimentalmente infectadas (Experimento 1), e também, avaliar o efeito do BVDV durante a maturação *in vitro* (MIV) de complexos cumuli-oophorus bovinos (CCOs), assim como, no seu posterior desenvolvimento embrionário. Foi avaliada também a produção de antígenos nas células do cumulus (CC) em cultivo em comparação com as células MDBK (Experimento 2). No Experimento 1 foram obtidas as seguintes faixas de títulos virais após processamento, $10^{0.87} - 10^{2.3}$ TCID₅₀/mL no Percoll, $10^{1.87} - 10^{3.3}$ TCID₅₀/mL no Swim up e no grupo combinado Swim up/Percoll não foi possível detectar vírus nas amostras. E a PIV produziu taxas de blastulação semelhantes nos grupos de diferentes processamentos seminais avaliados. Os dados mostraram que a combinação Swim up/Percoll reduziu/eliminou significativamente o número de partículas virais nas amostras de sêmen, sem causar danos aos espermatozóides, e também, possibilitou a PIV. No Experimento 2 nossos dados mostraram que os grupos controle (C) e infectado (V) apresentaram padrões diferentes de expansão das CC. A taxa de MIV do grupo C foi significativamente maior do que no grupo V, assim como as taxas de blastulação. Títulos virais mais altos foram obtidos nas CC em comparação com as células MDBK. Os resultados mostraram que a presença do BVDV na MIV infecta as CC, afeta o padrão de expansão das CC e reduz as taxas de maturação e blastulação. Dessa forma conclui-se que os dados obtidos nesse trabalho são extremamente importantes para auxiliar no desenvolvimento de protocolos de lavagem de sêmen a fim de eliminar os microorganismos presentes e possibilitar a produção de embriões livres de patógenos.

Palavras-chave: Sêmen, Embrião, Bovinos, BVDV

Abstract

The materials of animal origin used in cattle to produce *in vitro* embryos (IVP) have been shown to contain BVDV when originate from infected animals. Considering that it is important to perform applicable studies to minimize transmission of pathogens via these assisted reproductive techniques. The aim of the study were evaluate the capacity of sperm separation procedures Percoll gradient, Swim-up, and a combination of Swim-up/Percoll, to reduce/eliminate BVDV from experimentally infected semen samples (Experiment 1), and to evaluate BVDV experimentally infection during *in vitro* maturation (IVM) of bovine cumuli oophorus complexes (COCs) and also BVDV effect on the COCs posterior embryo development. It was also evaluated the production of BVDV antigens through cumulus cells (CC) culture in comparison to MDBK cell culture (Experiment 2). At experiment 1 the virus titration presented a titer range among $10^{0.87} - 10^{2.3}$ TCID₅₀/mL in Percoll; $10^{1.87} - 10^{3.3}$ TCID₅₀/mL in Swim up; and undetected for all samples in the Swim up/Percoll. And the PIV produced similar blastocyst rates among the groups. The data showed that the combination of Swim up/Percoll promoted a significant reduction/elimination in the number of viral particles in the semen, without promotion of damage in spermatozoa cells and allow IVP with similar blastocyst rates among the different groups. From experiment 2 our data showed that control (C) and infected (V) groups presented different CC expansion patterns. The IVM rate for C group was higher than V group. Embryo development rate to blastocyst stage was significantly higher in C group than in V group. The highest virus titers were obtained in CC in comparison with MDBK cells. Our findings showed that BVDV presence during IVM infected CC and this affects their expansion pattern, which may be related to the observed reduced nuclear maturation and blastocyst development rates. Therefore it is possible to conclude that our data are extremely important as a help to develop semen washing protocols to eliminate microorganisms and allow the embryo production free of pathogens.

Keywords: Semen, Embryo, Cattle, BVDV

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 - Imagens mostrando a fecundação <i>in vitro</i> (A) e a ICSI (B)..... | 18 |
| FIGURA 2 - Esquema de uma partícula vírica com seus componentes (A) e foto de microscopia eletrônica de um virion de BVDV (B)..... | 20 |
| FIGURA 3 - Esquema do genoma do BVDV..... | 21 |
| FIGURA 4 - Foto de cultura de células MDBK controle (A) e após 4 dias de infecção pelo BVDVcp (B) com visualização de efeito citopático..... | 21 |
| FIGURA 5 - Esquema mostrando como se originam animais PI e a doença das mucosas..... | 23 |
| FIGURA 6 - Esquema sugerido pela IETS para lavagem de embriões..... | 31 |

Lista de Tabelas

ARTIGO 1

| | |
|--|----|
| TABLE 1 - Sperm concentration after semen processing techniques..... | 40 |
| TABLE 2 - Comparison of Comet assay level results from spermatozoa nuclei evaluation after semen processing techniques..... | 40 |
| TABLE 3 - Results of BVDV titration after semen processing techniques..... | 40 |
| TABLE 4 – Results of <i>in vitro</i> embryo production after using semen processed by Swim up followed by Percoll gradient..... | 41 |

ARTIGO 2

| | |
|---|----|
| TABLE 1 - Comparison of the average area and σ^2 of experimental groups..... | 53 |
| TABLE 2 - Nuclear maturation rate after BVDV experimental infection during IVM..... | 53 |
| TABLE 3 - Blastocyst development rate (BI) after BVDV experimental infection during IVM..... | 54 |
| TABLE 4 - Comparison of BVDV viral titre obtained in MDBK versus CC..... | 54 |

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Unidades

| | |
|-----------------|--|
| BSA | albumina sérica bovina (<i>bovine serum albumin</i>) |
| BVDV | vírus da diarreia viral bovina |
| CCO | complexos <i>cumuli</i> -oócitos |
| CIV | cultivo <i>in vitro</i> |
| cm | centímetro |
| cm ² | centímetro quadrado |
| DNA | ácido desoxirribonucleico |
| FIV | fertilização <i>in vitro</i> |
| FSH | hormônio folículo estimulante |
| g | força gravitacional |
| h | horas |
| hCG | gonadotrofina coriônica humana |
| ICSI | injeção intracitoplasmática de espermatozóide |
| IETS | Sociedade Internacional de Transferência de Embriões |
| Kb | kilobase |
| LH | hormônio luteinizante |
| M | molar |
| mA | miliampere |
| mg | miligrama |
| min | minutos |
| MIV | maturação <i>in vitro</i> |
| mL | mililitro |
| mm | milímetro |
| mM | milimolar |
| mm ² | milímetro quadrado |
| μL | microlitro |
| μm | micrometro |
| °C | graus celsius |
| ORF | origem aberta de replicação |
| PBS | solução salina tamponada |
| PCR | reação em cadeia da polimerase |
| pH | potencial hidrogeniônico |

| | |
|---------|--|
| PI | persistentemente infectado |
| PIV | produção de embriões <i>in vitro</i> |
| % | percentagem |
| RNA | ácido ribonucleico |
| RT-PCR | reação em cadeia pela polimerase com transcrição reversa |
| SFB | soro fetal bovino |
| TCM 199 | meio de cultura de tecidos |
| TE | transferência de embriões |
| V | volt |
| ZP | zona pelúcida |

Obs: Visto terem seu uso consagrado na literatura técnica algumas abreviaturas e siglas seguem as iniciais de sua grafia no idioma inglês.

Sumário

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA..... | 17 |
| 2.1 | Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos..... | 17 |
| 2.2 | Vírus da diarreia viral bovina..... | 19 |
| 2.2.1 | Agente Etiológico..... | 19 |
| 2.2.2 | Patogenia..... | 22 |
| 2.2.3 | Diagnóstico..... | 24 |
| 2.2.4 | Epidemiologia e Controle..... | 24 |
| 2.3 | Transmissão de doenças infecciosas por técnicas de reprodução animal assistida..... | 26 |
| 2.4 | Transmissão do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) por técnicas de reprodução animal assistida..... | 28 |
| 2.4.1 | Métodos de desinfecção para gametas e embriões..... | 29 |
| 3 | ARTIGO 1..... | 33 |
| | Efficiency evaluation of sperm separatory techniques for bovine viral diarrhea virus removal from frozen bovine semen samples..... | 34 |
| | Abstract..... | 34 |
| | Introduction..... | 35 |
| | Materials and Methods | 36 |
| | Experimental Design | 36 |
| | Results..... | 40 |
| | Discussion..... | 41 |
| | Acknowledgements..... | 43 |
| | References..... | 43 |
| 4 | ARTIGO 2..... | 46 |
| | Bovine <i>in vitro</i> nuclear maturation and blastocyst development rates of cumuli-oophorus complexes experimentally infected with BVDV..... | 47 |

| | | |
|----------|----------------------------------|-----------|
| | Abstract..... | 47 |
| | Introduction..... | 48 |
| | Materials and Methods..... | 50 |
| | Results..... | 53 |
| | Discussion..... | 54 |
| | Conclusions..... | 58 |
| | Acknowledgements..... | 58 |
| | References..... | 58 |
| 5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 62 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 63 |
| | APENDICES..... | 71 |

1 INTRODUÇÃO

As biotécnicas de reprodução animal revolucionaram os programas de melhoramento genético e estratégias de acasalamento e, cada vez mais, materiais de origem animal, como gametas e embriões, têm sido transportados internacionalmente (EVANS, 1998; BIELANSKI, 2007). Entretanto, para a realização da produção *in vitro* de embriões (PIV), basicamente, é necessária a manipulação dos gametas e a permanência dos embriões no laboratório por período prolongado, o que possibilita maior risco de contaminação e, conseqüentemente, da transmissão de patógenos (STRINGFELLOW, GIVENS e WALDROP, 2004). E, conforme as tecnologias da reprodução vão se tornando mais complexas, criam-se novas oportunidades para a introdução de patógenos no sistema (STRINGFELLOW, GIVENS e WALDROP, 2004).

A contaminação por microorganismos pode ter sua origem a partir de uma infecção sistêmica ou do trato reprodutivo de animais doadores de gametas/embriões, ou ainda, ocorrer durante a manipulação desses materiais no laboratório (BIELANSKI, 2007). As principais fontes de contaminação de embriões são os gametas e os fluidos associados, células somáticas utilizadas na maturação e/ou manutenção dos embriões, materiais de origem animal utilizados para suplementação dos meios de cultura (ex: soro fetal bovino e albumina sérica bovina), contaminação por manipulação do pessoal, de instrumentos ou equipamentos e meios de lavagem e/ou transporte de embriões (STRINGFELLOW, GIVENS e WALDROP, 2004; BIELANSKI, 2007).

Portanto, é importante salientar que o crescimento contínuo e o sucesso da indústria de produção e transferência de embriões estão diretamente relacionados com o comprometimento dos produtores e profissionais ligados à área, a fim de assegurar a viabilidade e isenção de patógenos nos embriões produzidos e comercializados (DELVER, 2010). Atualmente, o acesso a mercados internacionais é dependente da adesão a procedimentos comprovadamente eficientes que permitam assegurar o status sanitário do embrião (DELVER, 2010). Conseqüentemente, pesquisas sobre os riscos de transmissão de infecções por gametas e embriões, assim como, sobre os possíveis prejuízos gerados pela presença de um patógeno durante o procedimento de

PIV, são de extrema importância para o desenvolvimento de protocolos de controle e para a certificação sanitária dos produtos finais (WALDROP et al., 2009).

Portanto, os objetivos desse trabalho foram testar os métodos tradicionais de processamento seminal, gradiente de Percoll e Swim up, e também a combinação de ambos em amostras de sêmen experimentalmente infectadas pelo BVDV, seguida da produção de embriões *in vitro*. Num segundo momento avaliamos as taxas de maturação e blastulação obtidas a partir de complexos cumuli-oophorus infectados com o BVDV durante a maturação *in vitro*. Dessa forma, o objetivo geral do trabalho foi avaliar a interferência do vírus da diarreia viral bovina na eficácia do procedimento de fecundação *in vitro* em bovinos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção *in vitro* de embriões

A primeira fecundação *in vitro* (FIV) em mamíferos foi realizada em coelhos e foi descrita por Chang (1959). A partir daí foi possível determinar as melhores condições para obtenção de nascimentos com a utilização da técnica de FIV. Como, por exemplo, a necessidade de manipulação dos gametas em temperatura próxima a corporal, o uso de óleo mineral sobre o meio de cultura e ambiente com alta umidade, para controle de evaporação, uso de tensão de oxigênio por volta de 8% (próxima a encontrada no interior do oviduto) e CO₂ para manutenção do pH (BRACKET, 2001). Por fim, a implementação de um meio definido com base em solução salina suplementada com albumina bovina, glicose e bicarbonato permitiu o desenvolvimento inicial de embriões mamíferos *in vitro* (BRACKET, 2001).

Após o relato de Chang (1959), Whittingham (1968) obteve sucesso trabalhando com camundongos e, alguns anos mais tarde Toyoda e Chang (1974) realizaram a FIV em ratos. Steptoe e Edwards (1978) estabeleceram um novo marco na história da FIV no mundo, com o sucesso do nascimento do primeiro bebê humano. Portanto, os primeiros estudos realizados em coelhos possibilitaram a construção de bases para uso da FIV em outras espécies de mamíferos, como hamster, camundongos, ratos e posteriormente bovinos, ovinos e caprinos, dentre outras espécies (BRACKET, 2001).

Particularmente o uso de biotécnicas associadas à reprodução de animais domésticos, para melhoramento genético, teve início na década de 70 (GONÇALVES et al., 2002). Nos anos 80, finalmente, foi produzido um bezerro a partir de FIV. Brackett et al. (1982) foram os primeiros a publicar o nascimento de um bezerro sadio, produzido por FIV a partir de oócitos maturados *in vivo*. A partir de então, as biotecnologias associadas à reprodução de bovinos receberam grande impulso, por ter sido verificado que poderiam ser integralmente viabilizadas sob condições artificiais.

Considerando o desenvolvimento das biotécnicas de reprodução animal a inseminação artificial (IA) e a transferência de embriões (TE) podem ser denominadas como a primeira geração de tecnologias para produção de embriões. Os principais procedimentos utilizados incluem superovulação das doadoras, coleta não-cirúrgica, criopreservação e transferência não-cirúrgica de embriões para receptoras sincronizadas

(WRIGHT e ELLINGTON, 1995; STRINGFELLOW, GIVENS e WALDROP, 2004). A PIV representa a segunda geração de tecnologias de reprodução assistida, a qual tem sido desenvolvida e aperfeiçoada nos últimos 25 anos (STRINGFELLOW, GIVENS e WALDROP, 2004; ALVARENGA, 2005). Os procedimentos normalmente utilizados para a PIV são a aspiração transvaginal de oócitos *in vivo* ou a punção de ovários provenientes de abatedouro, seguidas da maturação *in vitro* dos oócitos (MIV), capacitação dos espermatozóides, fecundação *in vitro* (FIV) e cultura *in vitro* (CIV) dos embriões. Nos últimos anos, desenvolveu-se a terceira geração de tecnologias para a produção de embriões, que inclui técnicas como a injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI) e a clonagem (Figura 1) (STRINGFELLOW, GIVENS e WALDROP, 2004).

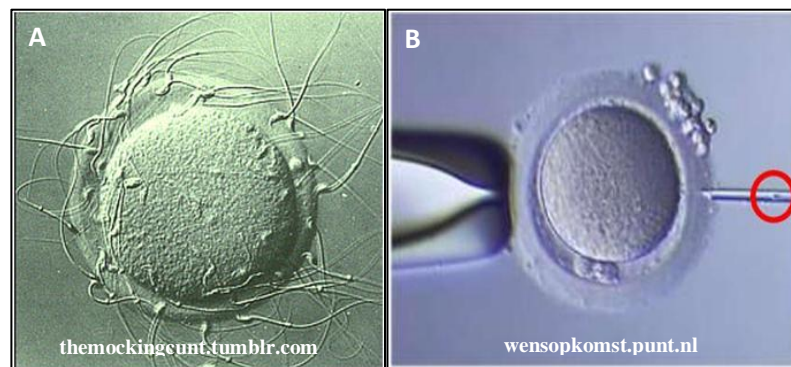


Figura 1: Imagens mostrando a fecundação *in vitro* (A) e a ICSI (B).

Em comparação às primeiras tentativas as condições de cultivo estão cada vez melhores, possibilitando a produção de embriões de melhor qualidade morfológica e viabilidade gerando maiores taxas de sobrevivência pós-descongelamento e prenhez. O uso de meios com base mais complexa como o TCM199, associado ao uso de fatores de crescimento permite o desenvolvimento *in vitro* até o estágio de blastocisto. A utilização de meios cada vez mais definidos deverá facilitar a reprodutibilidade de resultados, assim como, o controle da introdução de patógenos (BRACKET, 2001). Portanto, cada uma das técnicas citadas acima deve ser executada com extrema atenção e responsabilidade, desde a obtenção dos oócitos, até a transferência dos embriões, passando pela manipulação dos meios de cultura e do sêmen. Descuidos ou falta de atenção podem provocar danos ao desenvolvimento do embrião *in vitro* e conseqüentemente prejudicar a qualidade dos resultados obtidos pelo laboratório (GALUPPO et al., 2006).

Por todo o potencial de aplicação que a PIV representa para as espécies humana e animal, como pela sua expressividade tanto para a ciência básica quanto para a aplicada, tem sido muito difundida e utilizada em diversos países, de forma destacada no Brasil, a partir da década de 90 (GONÇALVES et al., 2002; VIANA et al., 2010). As biotécnicas de reprodução assistida foram aperfeiçoadas, novas metodologias foram desenvolvidas e implementadas e hoje a maioria delas é utilizada comercialmente. A utilização dessas biotécnicas oferece oportunidade para o desenvolvimento de pesquisas para melhoramento do potencial reprodutivo de mamíferos, assim como, possibilita o entendimento dos mecanismos básicos envolvidos no desenvolvimento embrionário dessas espécies (BRACKET, 2001).

2.2 Vírus da Diarréia Viral Bovina

O vírus da diarréia viral bovina (BVDV) foi inicialmente descrito em 1946 em Nova Iorque, como agente causador de uma enfermidade aguda, infecciosa e contagiosa, cujo principal sinal clínico era gastroenterite com diarréia severa (OLAFSON et al., 1946). Atualmente, sabe-se que, o BVDV infecta naturalmente uma variedade de ruminantes domésticos e silvestres, além de suínos, mas os bovinos são seu hospedeiro natural (BAKER, 1987; RIDPATH e FLORES, 2007). Tem a capacidade de se replicar em uma grande variedade de células *in vitro*, inclusive de origem humana (RIDPATH e FLORES, 2007). Considerando sua ampla distribuição nos rebanhos bovinos mundiais, e também, por representar uma das causas mais importantes de perdas econômicas devido a redução na produtividade e problemas reprodutivos nesses animais, torna-se importante o desenvolvimento de estudos sobre esse patógeno (GARD et al., 2007; GAROUSSI, 2007).

2.2.1 Agente Etiológico

O BVDV pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus* e possui virions esféricos de aproximadamente 40 a 60 nm de diâmetro, compostos por um nucleocapsídeo icosaédrico revestido por um envelope proveniente da membrana da célula hospedeira (Figura 2) (RIDPATH e FLORES, 2007). Seu genoma é constituído por uma molécula de RNA de fita simples com polaridade positiva de cerca de 12,3 Kb (VILCEK et al., 1994). Sua molécula de RNA possui duas regiões não-traduzidas (UTRs) localizadas nas extremidades 3' e 5' e uma única fase aberta de leitura (ORF) (MISHRA et al., 2010). A região 5'UTR é a mais comumente utilizada para detecção e caracterização do

genoma, pois apresenta segmentos altamente conservados (RIDPATH, BOLIN e DUBOVI, 1994; HEATH et al., 2003).

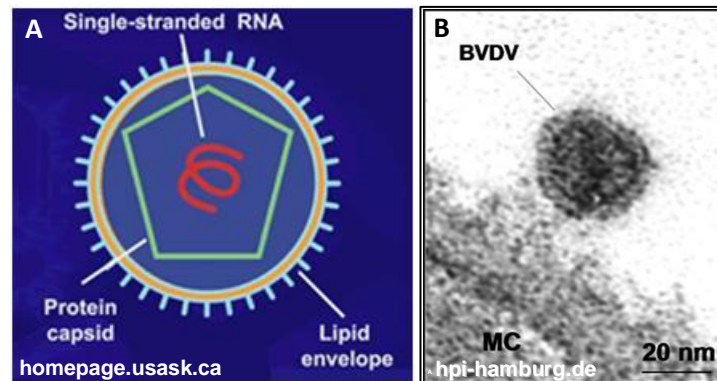


Figura 2: Esquema de uma partícula virica com seus componentes (A) e foto de microscopia eletrônica de um virion de BVDV (B).

O BVDV é caracterizado por dois genótipos BVDV-1 e BVDV-2 determinados a partir de análise filogenética da seqüência que codifica a proteína Npro (RIDPATH, BOLIN e DUBOVI, 1994; MISHRA et al., 2010). O BVDV-1 representa a maioria das cepas de referencia e vírus utilizados em vacinas. O BVDV-2 é obtido em isolados de surtos agudo e doença hemorrágica. Também podem ser categorizados em subgenótipos, BVDV-1a, BVDV-1b e BVDV-2a, BVDV-2b descritos na América do Norte e Sul (RIDPATH e FLORES, 2007).

A penetração do BVDV nas células ocorre por endocitose, após ligação de proteínas do envelope com a membrana celular, e sua replicação acontece no citoplasma da célula hospedeira (FLORES, KREUTZ e DONIS, 1996). O RNA é traduzido em uma única poliproteína que é clivada produzindo proteínas estruturais e não-estruturais. As proteínas não-estruturais atuam no processo de clivagem da poliproteína e na replicação do genoma. Já as proteínas estruturais são utilizadas na montagem da progênie viral (RIDPATH e FLORES, 2007). Nos *Pestivirus* foi descrita a proteína não-estrutural N^{pro}, que é codificada a partir do primeiro gene da ORF e atua se autoclivando da poliproteína inicial, e as proteínas estruturais do capsídeo (C), e do envelope E^{ms}, E1 e E2 (Figura 3) (MISHRA et al., 2010). Ao final da replicação as novas partículas formadas são observadas em vacúolos no citoplasma e sua liberação ocorre após a fusão desses vacúolos com a membrana da célula hospedeira (RIDPATH e FLORES, 2007).

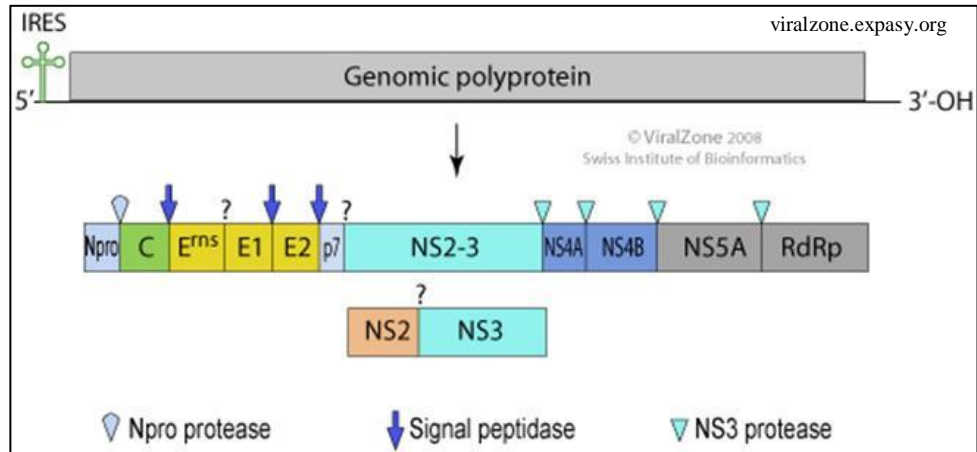


Figura 3: Esquema do genoma do BVDV

O efeito da replicação do vírus nas células pode variar de infecções sem nenhum efeito morfológicamente visível, causada pelo BVDV não-citopático (BVDVncp) até a vacuolização, lise e destruição celular provocada pelo BVDV citopático (BVDVcp) (Figura 4) (DEREGT e LOEWEN, 1995; GONG et al., 1998). O BVDV é então classificado em dois biotipos, citopatogênico e não-citopatogênico, de acordo com seu efeito em cultura de células, independente da sua capacidade de provocar a doença em um animal (BAKER, 1987; DEREGT e LOEWEN, 1995). Os dois biotipos não são distinguíveis sorologicamente (RADOSTITS e LITTLEJOHNS, 1988). O BVDVncp é o biotipo mais comum na natureza e é responsável pela produção de fetos e animais persistentemente infectados (PIs) (BOLIN e RIDPATH, 1992). Os BVDVcp são originados dos ncp por mutações e rearranjos genéticos que geram ao final a expressão da proteína NS3 e, são isolados quase que exclusivamente de animais com a doença das mucosas (GONG et al., 1998).

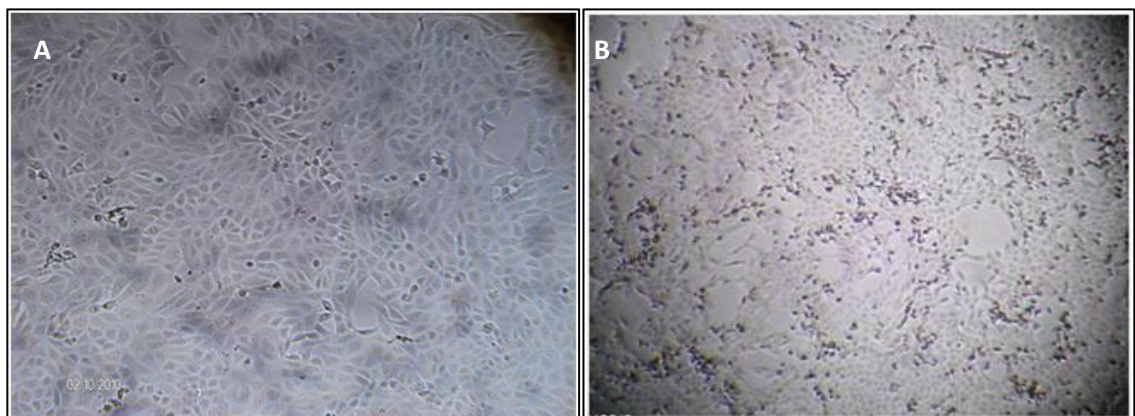


Figura 4: Foto de cultura de células MDBK não expostas ao vírus (A) e após 4 dias de infecção com BVDV cp (B) com visualização de efeito citopático

2.2.2 Patogenia

O BVDV é conhecido por provocar infecções subclínicas e causar problemas reprodutivos, defeitos congênitos, enterites, problemas respiratórios, doença hemorrágica, infecções persistentes e doença das mucosas (BAKER, 1987; DEREGT e LOEWEN, 1995). A severidade da infecção depende de fatores como a cepa viral, o status imunológico e reprodutivo do animal e a ocorrência de infecções secundárias (RIDPATH e FLORES, 2007). Quando a infecção passa a apresentar sinais clínicos, geralmente são verificados febre, leucopenia e viremia por aproximadamente 15 dias, seguidos de depressão, inapetência, secreção ocular e nasal, e ocasionalmente ulcerações orais (BAKER, 1987). Após infecção pela via oro-nasal o epitélio do trato respiratório superior, orofaringe e tecido linfóide regional parecem ser os sítios primários de replicação viral (RIDPATH e FLORES, 2007). O vírus também se replica em células germinativas, tanto femininas quanto masculinas, e a presença de infecção gera uma redução da fertilidade em ambos os sexos (KAFI et al., 2002).

No caso de infecção aguda essa pode ser leve, caracterizada por manifestações clínicas gastroentéricas e respiratórias, ou severa, caracterizada por manifestações gastroentéricas, respiratórias e hemorrágicas (RIDPATH e FLORES, 2007). Entretanto, a maioria dos animais infectados não apresentam sinais clínicos perceptíveis. A enfermidade costuma ser autolimitante com morbidade alta, porém baixa mortalidade (RIDPATH e FLORES, 2007). Após uma infecção aguda, o BVDV tem sido encontrado em animais imunocompetentes que desenvolveram uma infecção testicular prolongada (GIVENS et al., 2009). Por ser imunossupressor o BVDV pode predispor os animais infectados a infecções por outros patógenos (BAKER, 1987).

Outra forma de infecção é a persistente (BAKER, 1987; WALZ et al., 2008). Animais persistentemente infectados (PIs) são provenientes de fêmeas que se infectaram com uma amostra de BVDV_ncp durante a gestação, entre os dias 40 e 120, possibilitando a ocorrência da infecção transplacentária (Figura 5) (LAUREYNS et al., 2009). As conseqüências dessa infecção dependem do estágio de gestação, do biotipo do vírus (cp ou ncp) e da amostra. Pode ocorrer reabsorção embrionária, abortos, mumificação fetal, natimortos, nascimento de bezerros fracos seguido de morte ou desenvolvimento retardado, malformações e nascimento de animais PI (MCGOWAN e KIRKLAND, 1995). Touros PIs são capazes de excretar grandes quantidades ($10^{7,6}$ CCID₅₀/mL) de

partículas virais no sêmen (MCGOWAN e KIRKLAND, 1995). Altos títulos virais também são encontrados na saliva, secreções nasais, lágrimas, leite, fezes, urina, secreções vaginais, fluido folicular e células da granulosa dos animais PIs (BIELANSKI e LOEWEN, 1994; HOUE, 1999). Os animais PI desenvolvem imunotolerância ao vírus infectante, uma vez que o sistema imune ainda imaturo não reconhece o vírus como um antígeno durante a gestação (DEREGT e LOEWEN, 1995). Portanto, esses animais se tornam portadores permanentes e excretam continuamente o vírus, podem apresentar crescimento retardado, malformações ou até ser aparentemente saudáveis (BAKER, 1987).

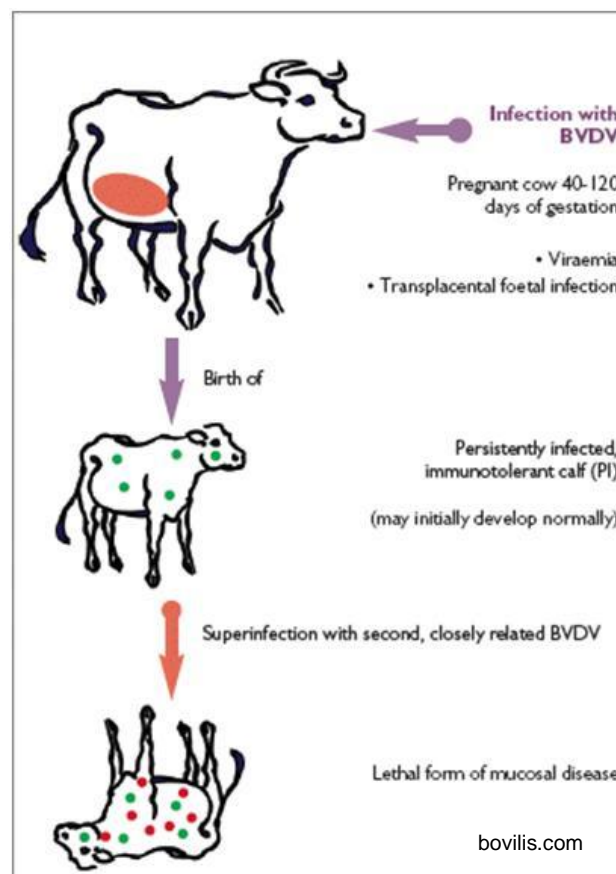


Figura 5: Esquema mostrando como se originam animais PI e a doença das mucosas

Os animais PIs que sofrerem uma nova infecção, porém com BVDVcp homólogo podem desenvolver a chamada doença das mucosas (DM), que é uma forma letal da infecção pelo BVDV (Figura 5) (BAKER, 1987; DEREGT e LOEWEN, 1995). O BVDVcp que desencadeia a DM pode ser proveniente de um vírus ncp do próprio animal que sofreu uma mutação que irá desencadear a produção da proteína NS3 (DEREGT e LOEWEN, 1995; RIDPATH e FLORES, 2007). Fontes de infecção por

vírus cp homólogos seriam vacinas vivas ou contato com animais infectados (BAKER, 1987). Em geral a DM acomete animais entre seis meses e dois anos de vida, e se caracteriza por febre, leucopenia, diarreia, inapetência, desidratação, lesões erosivas nas narinas e na boca e morte, com letalidade de 100% (RADOSTITS e LITTLEJOHNS, 1988). A DM também pode ocorrer na forma crônica, porém mais rara, e neste caso apresenta sinais clínicos inespecíficos, como inapetência e perda de peso (BAKER, 1987). Esses animais sobrevivem por no máximo 18 meses e geralmente morrem após debilitação progressiva (BAKER, 1987).

2.2.3 Diagnóstico

Sempre que houver num rebanho perdas embrionárias, abortos, malformações fetais, nascimentos de animais fracos ou morte perinatal, deve-se suspeitar de infecção por BVDV. E também, na presença de animais com sinais clínicos como doença entérica, respiratória com componentes hemorrágicos, erosões e ulcerações no trato digestivo (RIDPATH e FLORES, 2007). O BVDV é comumente diagnosticado por soro neutralização, para identificação de anticorpos, ou por isolamento viral em cultura de células, associado ao ensaio de imunoperoxidase (IPX) ou imunofluorescência (IFA) (DEREGT e LOEWEN, 1995). O sangue de animais infectados de forma aguda ou persistente em geral apresenta altos títulos virais. Outros testes que podem ser utilizados são o teste de ELISA de captura de antígeno, ELISA para detecção de anticorpos e RT-PCR (KRAMPS et al., 1999). Especificamente para rebanhos leiteiros pode ser utilizado PCR para detecção de RNA viral no leite (RIDPATH e FLORES, 2007). Para identificação de animais PIs é indicado que se faça isolamento em cultura de células, ELISA para captura de antígenos ou RT-PCR (DEREGT e LOEWEN, 1995).

2.2.4 Epidemiologia e Controle

O BVDV apresenta distribuição mundial, e no Brasil tem sido descrito desde o final dos anos 1960, com ampla distribuição no rebanho bovino (CANAL et al., 1998). Os índices de soropositividade variam entre 18 e 84% (RIDPATH e FLORES, 2007). A entrada do BVDV em um rebanho pode ocorrer através da introdução de animais PI, de fêmeas prenhes de animais PI, de animais portadores de infecção aguda e através de contato com animais vizinhos infectados (HOUE, 1999). Sabe-se que as maiores perdas relacionadas ao vírus estão diretamente ligadas a problemas reprodutivos (GIVENS et al., 2009).

Durante a infecção aguda os animais excretam baixos títulos virais, durante 3 a 10 dias e a transmissão ocorre principalmente por contato direto ou indireto (HOUE, 1999). Também existe a possibilidade de infecção por materiais contaminados, como agulhas, luvas de palpação, brincos, e sêmen contaminado (BAKER, 1987). A transmissão vertical (mãe-embriões/fetos) acontece em animais infectados durante a prenhez (HOUE, 1999). Como os animais PIs são reservatórios virais durante toda a sua vida, tornam-se importantes fontes de contaminação dos rebanhos (BAKER, 1987; DEREGT e LOEWEN, 1995).

Apesar de o controle poder ser feito com ou sem vacinação, o BVDV é melhor controlado com vacinação. A manutenção de um rebanho livre de BVDV sem vacinação é complexo devido a ampla distribuição do vírus e as múltiplas possibilidades de rotas de entrada no rebanho (BAKER, 1987; DEREGT e LOEWEN, 1995). O vírus pode entrar num rebanho via outros ruminantes, como ovinos e caprinos, através de animais PI, sêmen contaminado, transferência de embriões, materiais contaminados, e até vacinas de vírus vivos (BAKER, 1987). O controle com vacinação pode ser feito no caso de rebanhos com alta rotatividade de animais, rebanhos com sorologia positiva, com histórico de doença clínica e reprodutiva, e com confirmação virológica de BVDV. As vacinas podem ser mono e polivalentes, atenuadas e inativadas. A vacinação normalmente deve ser feita em bezerros aos 4-6 meses de idade e revacinação após 30-40 dias, é recomendada outra revacinação aos 8-12 meses. Para manutenção dos títulos de anticorpos neutralizantes os animais devem ser vacinados a cada 6-12 meses. Especificamente para fêmeas é importante revacinar de 2-3 semanas previamente a temporada de monta. O controle sem vacinação é indicado para casos específicos de rebanhos fechados e rebanhos que não apresentem sinais de presença do BVDV. Esse tipo de controle se baseia no uso de medidas básicas de biossegurança (RIDPATH e FLORES, 2007).

Considerando que tanto a epidemiologia quanto a patogênese do BVDV ainda não foram completamente elucidadas seu controle torna-se complexo e, normalmente, vários desafios surgem durante o processo de erradicação da doença em um rebanho. Sugere-se que em áreas de alta densidade de animais com alta prevalência do BVDV o manejo seja feito com base em quatro princípios: biossegurança, descarte de animais PI, monitoramento permanente e vacinação. Para o sucesso de um programa de erradicação

esses princípios devem ser implementados simultaneamente, de forma rígida e constante (BAKER, 1987; LAUREYNS et al.,2009).

2.3 Transmissão de doenças infecciosas por biotécnicas de reprodução animal assistida

O papel que a PIV possa exercer na transmissão ou controle de patógenos tem sido estudado através de várias abordagens. Em primeiro lugar a abordagem “*in vivo-in vivo*”, pela qual os embriões são colhidos de doadoras infectadas e transferidos para receptoras livres da infecção, que são monitoradas quanto ao surgimento do agente infeccioso. Outra abordagem seria a “*in vivo-in vitro*”, pela qual os embriões são coletados de doadoras infectadas e então pesquisados para aquele agente *in vitro*. Em terceiro lugar a abordagem “*in vitro-in vivo*”, pela qual os embriões de vacas saudáveis são expostos ao agente *in vitro* e então transferidos para receptoras sadias, monitoradas para evidência de infecção subsequente à TE. E, por fim, a abordagem “*in vitro-in vitro*”, pela qual os embriões de doadoras saudáveis são expostos ao agente *in vitro* e então testados *in vitro* (STRINGFELLOW, GIVENS e WALDROP, 2004; WRATHALL e SUTMÖLLER, 1998).

Nesse trabalho, utilizamos a abordagem *in vitro-in vitro*, que permite um maior controle do sistema experimental, possibilitando uma análise mais detalhada das interações de gametas e embriões com patógenos. Considerando que todas as abordagens experimentais mencionadas acima sejam importantes, teoricamente, aquelas que usam embriões derivados de doadoras infectadas se assemelham ao que acontece em condições naturais. Infelizmente, o número de embriões usados nos experimentos *in vivo* é frequentemente muito baixo impossibilitando conclusões significativas sobre as possibilidades de transmissão da doença, o que torna o estudo *in vitro* de extrema importância (WRATHALL e SUTMÖLLER, 1998).

Outro ponto importante no controle da transmissão de doenças está relacionado ao fato de que, normalmente, o estado sanitário da doadora sujeita à aspiração transvaginal de oócitos geralmente é conhecido (STRINGFELLOW e GIVENS, 2000), entretanto, não há histórico de possíveis doenças clínicas ou subclínicas de doadoras comerciais abatidas, que são usadas para produção em massa de embriões. Usualmente, os ovários e tubas uterinas são colhidos ao acaso de animais abatidos, aparentemente saudáveis e armazenados em recipientes para transporte e posterior processamento no laboratório. A

maioria dos sistemas usados para produzir embriões por fecundação *in vitro* (FIV) requer meios complexos com algum tipo de soro ou células de suporte, que provêm um ambiente favorável para o desenvolvimento embrionário (D'ANGELO et al., 2003; GONÇALVES, D'ANGELO e GALUPPO, 1997; KRISHER e BAVISTER, 1998), mas que podem permitir com facilidade a introdução e manutenção de microrganismos no sistema PIV (D'ANGELO, GALUPPO e GONÇALVES, 2002; GALUPPO, D'ANGELO e GONÇALVES, 1998).

Para que ocorra a transmissão de doenças infecciosas por embriões produzidos *in vivo* ou *in vitro*, o agente infeccioso deve estar presente na concentração mínima requerida para a infecção de uma receptora susceptível (STRINGFELLOW, GIVENS e WALDROP, 2004). Além disso, sabe-se que, os embriões de FIV apresentam diferenças morfo e fisiológicas em relação aos produzidos *in vivo*. São menos compactos, o blastocisto tem um número inferior de células e possuem diferenças na elasticidade, resistência à pronase e nas propriedades antigênicas da zona pelúcida (ZP) (VAN SOON et al., 1992; POLLARD e LEIBO, 1993; WRIGHT e ELLINGTON, 1995). Essas informações levantam dúvidas a respeito da interação agente infeccioso-embriões de FIV, os quais podem ser mais suscetíveis (D'ANGELO, 1998). Portanto, é também de especial importância que a quantidade de patógenos associados com um único embrião possa ser determinada, para que seja conhecido o risco de transmissão da doença, pois esta constitui a dose infectante em caso de transferência desse embrião (GARD et al., 2009).

O sêmen pode também ser considerado como potencial fonte de contaminação de microrganismos não-patogênicos e patogênicos na produção de embriões *in vivo* e também em sistema de PIV (STRINGFELLOW e GIVENS, 2000). A coleta do sêmen em geral apresenta-se livre de contaminação, porém não pode ser considerada estéril, sendo recomendado o uso de antibióticos. É importante ressaltar que alguns microrganismos são resistentes a antibióticos, e que, em alguns casos, os antibióticos podem não ser eficientes na eliminação de uma contaminação. Existem relatos de contaminação de embriões PIV por amostras de sêmen contaminadas com: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus sciuri*, *Acinetobacter cacloaceticus*, *Pantoeau agglomerans* ou *Flavobacterium spp* (STRINGFELLOW e GIVENS, 2000; D'ANGELO et al., 2006).

Em relação ao risco de transmissão de doenças por transferência de embriões produzidos *in vivo* ou *in vitro*, os resultados de pesquisas realizadas com embriões com ZP intacta, mostram que o risco de transmissão de patógenos é menor quando comparado com animais vivos (GUERIN et al., 1997). Entretanto, muitas mudanças ocorreram em relação às tecnologias empregadas na manipulação dos embriões até o momento da transferência, que tornaram mais complexo o controle do status epidemiológico do embrião. A avaliação do potencial epidemiológico das técnicas de PIV ainda não está completa, e precauções definitivas ainda não foram estabelecidas.

2.4 Transmissão do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) por técnicas de reprodução animal assistida

Para que haja a possibilidade de infecção transzonal em oócitos ou intraembrionária é necessária a presença de patógenos com características específicas, sendo o fator de maior relevância a predileção pelo trato reprodutivo, como é o caso do BVDV (VAN SOOM et al., 2010). Deve-se mencionar também que microorganismos, como o BVDV que é um vírus RNA, possuem a capacidade de se multiplicarem rapidamente, assim como, sofrerem mutações, o que pode torná-los mais patogênicos e causar novas doenças quando introduzidos em ambientes diferentes (VAN SOOM et al., 2010). Portanto, considerando que o BVDV possui ampla distribuição nos rebanhos bovinos mundiais e é uma das causas mais importantes de problemas reprodutivos nesses animais, torna-se importante o desenvolvimento de estudos sobre a interação desse vírus com gametas e embriões (GARD et al., 2007; GAROUSSI, 2007).

Estudos demonstraram que em animais PI é possível encontrar BVDV em diferentes tecidos do trato reprodutivo, como células da granulosa e fluido folicular (MCGOWAN e KIRKLAND, 1995; TSUBOI e IMADA, 1998). Fray et al. (1998) relataram que provavelmente oócitos bovinos são sensíveis a replicação do BVDV. Entretanto, Tsuboi e Bielanski (2005) não foram capazes de demonstrar a replicação do BVDV NCP utilizando oócitos imaturos. Tsuboi e Imada (1999) descreveram que estágios mais adiantados do desenvolvimento embrionário como a mórula e o blastocisto são sensíveis a replicação viral. Gard et al. (2007) relataram que a possibilidade de transmissão de embriões produzidos *in vivo* ou *in vitro* com sêmen contaminado não pode ser descartada. Em relação ao sêmen a contaminação pelo BVDV pode ser resultado de diferentes tipos de infecção, como infecção aguda e infecção testicular prolongada e

animais PI (GARD, GIVENS e STRINGFELLOW, 2007). Existem relatos de transmissão do BVDV via sêmen contaminado por inseminação artificial a partir de amostras seminais de animais contaminados (KIRKLAND et al., 1994; KIRKLAND et al., 1997).

Esses fatos são confirmados pelo manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), que classifica o BVDV como patógeno categoria 3 em relação ao risco de transmissão por transferência de embriões. A categoria abrange patógenos com “(...) risco de transmissão desprezível, desde que, os embriões sejam manipulados adequadamente entre a coleta e a transferência (...)”, mas descreve também que “(...) dados experimentais adicionais *in vivo* e *in vitro* são necessários para consubstanciar os achados preliminares” (Apêndice A) (BIELANSKI e HARE, 1998).

De acordo com Wrathall et al. (2006), os dados disponíveis ainda são insuficientes para se confirmar a possibilidade de transmissão do BVDV por PIV com o uso de amostras de sêmen contaminadas e também sobre as formas de interação do vírus com gametas e embriões. Segundo Gard et al. (2009), como ainda não foi refutada a possibilidade de transmissão do BVDV por transferência de embriões, deve-se considerar o fato de que, tanto embriões bovinos produzidos *in vivo*, quanto *in vitro*, podem ser responsáveis pela disseminação do vírus. Van Soom et al. (2010) relatam que se as recomendações sugeridas pelo manual da IETS quanto a manipulação de gametas e embriões forem seguidas o risco de transmissão de doenças é mínimo para a maioria dos patógenos, exceto para alguns patógenos como o BVDV, para o qual ainda são necessários mais dados para que se possa concluir algo.

2.4.1 Métodos de descontaminação para gametas e embriões

Considerando que um dos objetivos é propor um método para desinfecção de amostras de sêmen, é importante citar as possibilidades disponíveis atualmente. Em geral os agentes adicionados ao meio de cultura de embriões ou diluidores de sêmen, a fim de, inativar ou remover microorganismos devem apresentar algumas características importantes: serem efetivos na eliminação do microorganismo em uma determinada concentração e condições de cultivo; não serem tóxicos (não causar alterações de viabilidade e fecundação); não reagir com os componentes dos meios de cultura e diluidores de sêmen e seu uso deve ser rápido e de fácil aplicação (BIELANSKI, 2007). Os principais métodos testados até o momento tanto para sêmen quanto para embriões

incluem: lavagens simples com centrifugação, métodos imunológicos (imunodiluidores) e uso de compostos químicos (agentes fotossensíveis, soluções para a acidificação do meio e agente antiviral).

Cada um dos componentes de uma amostra de sêmen normal (plasma seminal, espermatozoides, células germinativas imaturas, células epiteliais, monócitos, leucócitos e macrófagos) pode ser um veículo de transporte para agentes patogênicos (BIELANSKI, 2007). Diferentes vírus foram identificados em amostras de sêmen de animais infectados, e sabe-se que alguns podem aderir ou penetrar no espermatozoide enquanto outros são encontrados no plasma seminal ou nas células não espermáticas (HARE et al., 1985; AFSHAR e EAGLESOME, 1990). Procedimentos de lavagem de sêmen, como a simples centrifugação, o Swim up, o gradiente de Percoll, gradientes de albumina entre outros, além de selecionarem os melhores espermatozoides para a fecundação também são responsáveis por reduzir a concentração de patógenos em amostras de sêmen (WRATHALL, SIMMONS e VAN SOOM, 2006; BIELANSKI, 2007). Entretanto, previamente foi relatado que o uso desses métodos individualmente para remoção do BVDV de amostras de sêmen não foram capazes de eliminar o vírus (BIELANSKI, DUBUC e HARE, 1992).

Em relação aos embriões são utilizadas as lavagens sequenciais e tratamento com tripsina para remoção/inativação de patógenos (Figura 6) (SINGH et al., 1983). Singh et al. (1983) demonstraram que a simples passagem dos embriões de uma gota a outra, consecutivamente por dez gotas (fator de diluição mínimo de 1:100) diminui a carga microbiana a níveis indetectáveis. Esse procedimento se mostrou efetivo na eliminação de diferentes patógenos (ex: FMDV, BSE, BLV) em diferentes espécies (ex; bovinos, ovinos e suínos) (WRATHALL, SIMMONS e VAN SOOM, 2006). A tripsina também pode ser usada para inativação de vírus no sêmen, mostrando-se muito eficiente em relação ao BoHV-1, porém aparentemente a tripsina é capaz de danificar a membrana espermática, interferindo na viabilidade do espermatozoide (SILVA, SOLANA e CASTRO, 1999). Quando se trata de embriões produzidos *in vitro* foi descrito que agentes patogênicos se aderem mais facilmente a zona pelúcida desses embriões, o que torna as lavagens e tratamento com tripsina métodos não tão eficientes na sua remoção. O BVDV é um exemplo de patógeno que não é eliminado da zona pelúcida de embriões bovinos produzidos *in vitro* após lavagem. (GIVENS et al., 2000)

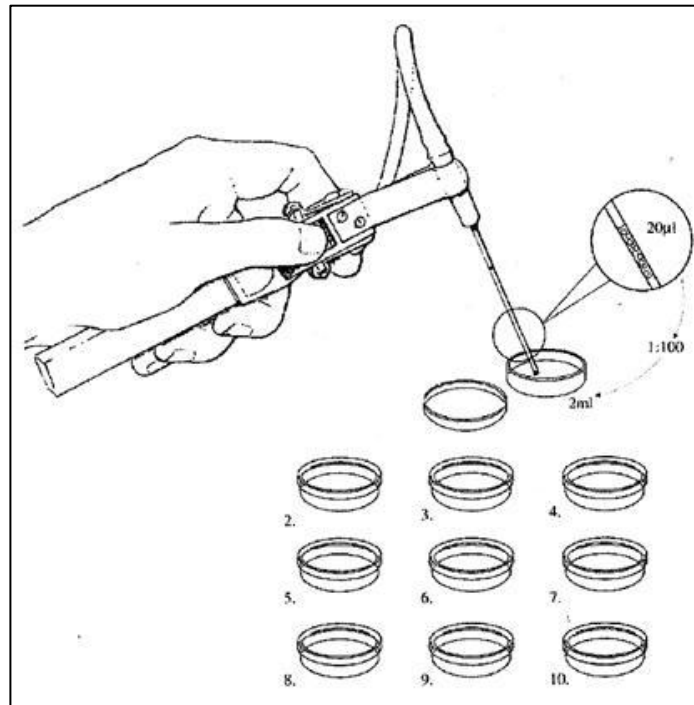


Figura 6: Esquema sugerido pela IETS para lavagem dos embriões.

Em relação aos métodos imunológicos foram testados em amostras de sêmen imunodiluidores contendo anticorpos neutralizantes para vírus (ALLIETA et al., 1995). A partir desses imunodiluidores foi possível identificar que a fração Ig se mostrou a mais eficiente na inativação do BoHV-1, BVDV, PI3 e BTV. Nesses casos não houve nova replicação viral e nem perda de viabilidade espermática (ALLIETA et al., 1995). Foi relatada também a inativação do BVDV em uma amostra de sêmen de um animal PI a partir da suplementação do meio de Swim up com IgG anti-BVDV purificada de um animal naturalmente infectado (ALLIETA et al., 1995). Tsuboi et al (1988) relataram que o uso de soro fetal bovino com altos títulos de anticorpos neutralizantes na PIV previnem a transmissão do BVDV provenientes de complexos cumuli-oophorus (CCO) coletados de animais PI para CCOs coletados de fêmeas sadias. Porém, Stringfellow et al (1999) relataram a permanência do BVDV no sistema de PIV apesar do uso de anticorpos anti BVDV nos meios de maturação e cultivo.

Quanto aos compostos químicos foi descrito o uso de agentes fotossensíveis, soluções para acidificação do meio e agente antiviral. Os agentes fotossensíveis possuem ação germicida e atuam na amostra a partir da incidência de luz branca ou laser de helio neon (250 J/cm²) por 5 a 10 minutos. Um exemplo de composto com essa característica é a

hematoporfirina (HP) o qual se mostrou eficiente para inativação de BoHV-1, BVDV, *Mycoplasma bovis* e *Ureaplasma diversum*. Porém, quando esses patógenos foram adicionados ao sêmen apenas o BoHV-1 foi inativado, entretanto em embriões foi obtido sucesso na inativação do BVDV além do BoHV-1 (GIVENS et al., 2006; BIELANSKI, 2007). Em relação a acidificação do meio, esta é uma técnica que pode ser utilizada apenas na desinfecção de amostras de sêmen, e é particularmente efetiva contra alguns tipos de vírus. A maioria dos vírus, com exceção dos adenovirus e enterovirus, são inativados entre pH 5 e 6 (BIELANSKI, 2007). Já o uso de agente antiviral foi testado apenas em cultivo de embriões, e observou-se que zigotos cultivados com o agente FM DB606 no meio de cultivo na presença de células útero-tubaricas infectadas com BVDV apresentaram desenvolvimento normal quando comparados com o controle. O BVDV teve sua replicação inibida pelo FM DB606, o qual pode ser utilizado com segurança para reduzir a carga viral no meio de cultivo (GIVENS et al., 2006).

Apesar de vários procedimentos e compostos estarem disponíveis para uso na descontaminação de sêmen e embriões, infelizmente nenhum deles pode ser utilizado como descontaminante universal. E a grande maioria pode causar danos a viabilidade de espermatozoides e embriões.

3 ARTIGO 1

Effectiveness of different semen processing techniques for the removal of bovine viral diarrhoea virus from bovine semen samples.

(Apêndice C)

Esse artigo será encaminhado para a revista Journal of Virological Methods, e está formatado de acordo com as normas da revista

Effectiveness of different semen processing techniques for the removal of bovine viral diarrhea virus from bovine semen samples.

**Andrea Giannotti Galuppo^{ab}, Nelson Beuter Junior^b, Nathalia Shimidt Arruda^a,
Angela O. Corbellini^b, Catarina M. Chiappetta^b, Danielle Labadessa Pavão^c,
Magali D'Angelo^c, Claudio Wagek Canal^b and José Luiz Rodrigues^a**

^aLaboratory of Embryology and Reproductive Biotechniques, Faculty of Veterinary, Rio Grande do Sul Federal University, Av Bento Gonçalves, 9090, 91540-000, Porto Alegre, RS, Brazil;

^bLaboratory of Virology, Faculty of Veterinary, Rio Grande do Sul Federal University, Av Bento Gonçalves, 9090, 91540-000, Porto Alegre, RS, Brazil;

^cLaboraty of Cell Biology, Biological Institute of de São Paulo, Av Conselheiro Rodrigues Alves, 1252, 04014-002, São Paulo, SP, Brazil.

Corresponding author: Andrea G. Galuppo, email andregalupo@yahoo.com.br, address - Laboratory of Embryology and Reproductive Biotechniques, Faculty of Veterinary, Rio Grande do Sul Federal University, Av Bento Gonçalves, 9090, 91540-000, Porto Alegre, RS, Brazil; telephone: 55 51 33086126, fax: 55 51 33087305

Abstract

The aim of this study was to evaluate the capacity of three semen processing techniques: Percoll gradient centrifugation (PGC), Swim-up, and a combination of Swim-up and PGC, to reduce the amount of bovine viral diarrhea virus (BVDV) from experimentally infected semen samples. The sperm count and DNA integrity (Comet assay) of processed samples were analyzed. The amount of virus in the processed samples was determined by virus titration. The Swim up/PGC processed samples were tested for *in vitro* embryo production (IVP) and the embryos produced were tested for viral contamination by RT-PCR. Chi-square was used in the statistical analysis ($P < 0.05$). There was a statistical difference between sperm separation techniques when sperm count and Comet assay were analyzed. The processed samples showed a decrease in the final viral titer that varied from 99.9% in the Swim up-processed group to 100% in the Swim up/PGC group. The IVP showed similar blastocyst rates among all groups and RT-PCR was negative for the produced embryos. The data showed that the combination of Swim up/PGC promoted the elimination of BVDV from the semen without causing damage to spermatozoa cells and allowed *in vitro* embryo production.

Keywords: Semen, Swim up, Percoll gradient, BVDV, In Vitro Embryo Production

1 Introduction

Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) has a broad distribution among cattle and its association with cells and fluids from infected animals represents a potential hazard in the application of assisted reproduction techniques (Gard et al., 2007; Gard et al., 2009). BVDV is a single stranded enveloped RNA virus from the family *Flaviviridae*. It has two distinct genotypes (1 and 2) and two biotypes (cytopathic and noncytopathic) (Ridpath and Flores, 2007). This virus causes subclinical disease and a spectrum of clinical signs that included leucopenia, fever, depression, anorexia, excessive salivation and nasal discharge, ulcers of the nose, mouth and muzzle, diarrhoea, dehydration, respiratory disease, early embryonic death, teratogenesis and abortion (Ridpath and Flores, 2007). Although acute BVDV infections are the most common, persistent infections also can occur when a fetus is exposed to a noncytopathic biotype prior to the development of immune competence (Houe, 1999; Gard et al., 2009).

There are reports showing that bulls acutely and persistently infected (PI) with BVDV are capable of shedding virus in semen (Kirkland et al., 1997; Givens et al., 2006; Walz et al., 2008), and can transmit the virus to inseminated cows (Kirkland et al., 1997; Gard et al., 2007). PI bulls shed large amounts of virus ($10^{7.6}$ TCID₅₀/mL) in seminal fluid and the virus may survive cryopreservation and the processing of semen for artificial insemination (Kirkland et al., 1991; McGowan and Kirkland, 1995; Walz et al., 2008). Although the virus was found to be present in the semen of acutely infected or PI bulls, it was not determined whether it was within the spermatozoa, free within the seminal plasma or within the non-sperm cellular components (Wrathal et al., 2006).

An important study performed by Bielanski et al. (1992) concluded that none of the simple physical methods used for the separation of sperm from semen prior to IVF completely removed BVDV from sperm samples. The authors tested five procedures: washing, Swim up, glass bead filtration, glass wool filtration and Percoll gradient centrifugation (PGC). Viral detection was performed by virus isolation in cell culture followed by virus titration. However, Semprini e Levi-Setti (1992) showed that PGC followed by a Swim up procedure effectively removed HIV-1-infected cells from the semen of HIV-seropositive men. Over the years, various forms of sperm washing have been developed and have become the most important procedures for the control and

elimination of microorganisms (Bielansky, 2007). The aim of the present study was to evaluate the capacity of the semen processing techniques PGC and Swim up and a combination of the two to reduce or eliminate BVDV from experimentally infected semen.

2 Materials and Methods

2.1 Experimental Design

2.1.1 Experiment 1

Swim up and PGC are based on a sequence of centrifugations that could affect the sperm cell count and function (Fatehi et al., 2006). The aim of Experiment 1 was to evaluate the quantity and quality of the spermatozoa obtained after processing by sperm count and DNA integrity (Comet Assay).

Sperm count was performed using a Neubauer chamber. The Comet assay is based on the principle that it is possible to visualize alterations in nuclear DNA, such as fragmentation, by the appearance of a trail of DNA loops from the nucleus after electrophoresis (Singh et al., 1988).

2.1.2 Experiment 2

The aim of the Experiment 2 was to test the potential of the semen processing techniques to eliminate or reduce BVDV experimentally introduced into semen samples. The experimental groups were: semen samples free of BVDV, which were processed through either PGC, Swim up or Swim up followed by PGC, and semen samples experimentally infected with BVDV that were processed through the same three procedures.

The experimental infection was performed immediately after semen thawing by mixing semen 1:1 (volume/volume) with a viral suspension in Eagle's Minimal Essential Medium (E-MEM) (Garoussi, 2007). For the control group, the semen was mixed 1:1 (volume/volume) with E-MEM immediately after thawing. The final pellet of each separation procedure was tested for virus titration.

2.1.3 Experiment 3

The aim of the Experiment 3 was to test the capacity of the sperm cells obtained after processing through Swim up followed by PGC to produce bovine embryos *in vitro*. The experimental groups were: IVP with semen free of virus and IVP with semen experimentally infected with BVDV prior to processing. Another control group was processed with an IVP using Swim up processing alone. The blastocysts produced were tested by RT-PCR for BVDV presence.

2.2 Semen processing techniques

The Swim up was prepared with 0.3 mL of thawed semen under 1 mL Sperm-TALP. After 60 min incubation at 38.5°C and a 45° inclination, 0.8 mL of the supernatant was collected and centrifuged at 200 ×g for 10 min.

The PGC (45% to 90%; Nutricell, Campinas, SP, Brazil) was performed with thawed pooled semen added to the top of a 45% Percoll gradient. The tube was centrifuged at 200 ×g for 10 min at room temperature. The supernatant was removed and the pellet was washed once by centrifugation (200 ×g for 10 min) in Sperm-TALP.

Previous testing indicated that the two techniques yield the best recovery of spermatozoa when Swim up is performed first and the resulting pellet is processed using the PGC protocol described above.

2.3 Comet assay

Normal melting point agarose and low melting point agarose (Sigma-Aldrich) were dissolved in PBS by boiling 3 times. Glass slides were immersed in the 1.5% normal melting point agarose, and dried overnight at room temperature. A sample mixture was prepared by mixing 5 µL of spermatozoa suspension in SPERM-TALP with 125 µL of 0.5% low melting point agarose. A 130 µL volume of the sample mixture was pipetted onto the agarose-coated slide and covered with a coverslip (24x24 mm). The slide was maintained at 4°C for 5 min to allow the sample mixture to solidify, and then the coverslip was removed. The slide was immersed in lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO) at 4°C in the dark until use (from 2 h to 14 days). The slides were drained and then placed in a horizontal electrophoresis unit (Bio-Rad, Hercules, Calif, CA, USA) filled with fresh alkaline electrophoresis buffer containing 300 mM NaOH. Electrophoresis was performed at 25 V and 300 mA for 30 min. The slides were then neutralized in 0.4 M Tris-HCl (pH 7.5), stained with

ethidium bromide (20 mg/mL) and mounted with a coverslip. The slides were analysed at 200x magnification using an epifluorescence microscope (Carl Zeiss). Sperm nuclei with mobile fragments of DNA were classified as comets (Singh et al., 1988).

2.4 *Oocyte collection and in vitro maturation (IVM)*

Bovine ovaries were collected immediately after slaughter at a commercial abattoir, and transported to the laboratory (29°C ±2) in modified phosphate-buffered saline (mPBS). Before follicle aspiration, the ovaries were washed with fresh mPBS. Complexes oophorus-cumulus (COCs) were aspirated from ovarian follicles 2 to 8 mm in diameter. Oocytes surrounded by multilayers of compact follicular cells and having a uniform cytoplasm were selected for the experiment. The COCs were washed three times in maturation medium then matured in 100 µL drops of maturation medium, TCM199 (Sigma Aldrich) containing 0.68 mM L-glutamine and 25 mM HEPES supplemented with 0.2 mM pyruvate, 26.2 mM NaHCO₃, 50 µg/mL estradiol-17β, 0.5 µg/mL FSH (Folltropin, Vetrefarm,), 0.03 IU/mL hCG (Profasi, MerckSerono) and 10% (v/v) FCS under mineral oil, and incubated at 38.5°C in a humidified atmosphere in 5% CO₂ in air for 24 h. The COCs were cultured in groups of 15 per drop of IVM medium.

2.5 *In vitro embryo production (in vitro fertilization and culture)*

Spermatozoa were selected using Swim up alone or Swim up followed by PGC processing and the final concentration of sperm was adjusted to 1 x 10⁶ sperm mL⁻¹ per 100 µL medium drop. Before fertilization, the COCs were washed three times and fertilization was performed in Fert-TALP medium supplemented with 6 mg/mL BSA, 0.25 mM pyruvate, 3 mg/mL penicillamine, 10 µM hypotaurine, 1 IU/mL heparin, and 1 µM epinephrine. The gametes were kept at 38.5°C in a humidified atmosphere in 5% CO₂ in air for 18 to 22 h. After 18 to 22 h, the presumptive zygotes were mechanically stripped of CC, washed three times and cultured in SOF medium supplemented with 0.3 mM pyruvate, 1 mM L-glutamine, 2% BMEaa, 1% MEMaa, 10% FCS. Groups of 15 presumptive zygotes were cultured per drop at 38.5°C in a humidified atmosphere supplemented with 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ for 8 days. The blastocysts produced were split in groups from 3 to 5 each for RT-PCR, for negative control and BVDV groups.

2.6 Virus titration

Ninety-six-well flat-bottom plates (**TPP Techno Plastic Products AG**, Switzerland) were seeded with 150 μL of MDBK cells (1×10^6 cells/well), 50 μL of E-MEM and 50 μL of sample serial dilution (10^{-1} to 10^{-8}) and incubated at 37°C with 5% CO_2 for 5 days. At the end of the incubation period the plate was observed under an optical microscope for evaluation of cytopathic effect. The viral titer was assessed as previously described (Reed and Muench, 1938).

2.7 RT-PCR

TRIzol[®] LS Reagent (Invitrogen, USA) was used for total RNA extraction according to the manufacturer's instructions. After RNA isolation, cDNA was synthesized using the SuperScript[™] One-Step RT-PCR with Platinum[®] Taq (Invitrogen, USA) at 65°C for 5 min, 55°C for 60 min then 70°C for 15 min. PCR was performed according Vilcek et al. (1994) using primers 324 and 326. The PCR products were analyzed by electrophoresis carried out in a 2% agarose gel dyed with Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia, Brazil) and visualized under UV light.

2.8 Statistical analysis

Sperm concentration, Comet assay and embryo production were analyzed by chi-squared tests ($P < 0.05$).

2.9. Materials free of BVDV

Bovine serum albumin (BSA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), frozen commercial semen straws (0.5 mL) and fetal calf serum (FCS) (Nutricell, Campinas, SP, Brazil) were free of BVDV as tested by virus isolation in cell culture and RT-PCR.

2.10. Virus samples

Stocks of the cytopathic strain NADL (National Animal Disease Laboratory, Iowa, USA) were propagated in Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cells, which were cultured in E-MEM (Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA). The virus stock was aliquoted and stored (-80°C) until needed. The viral titer was $10^{6.68}$ TCID₅₀/mL.

3 Results

3.1 Experiment 1

Data from the evaluation of possible damage caused by the different semen processing techniques tested (Swim up, PGC and Swim up followed by PGC) are presented in Table 1 (sperm count) and Table 2 (Comet assay).

Table 1: Sperm count after semen processing techniques.

| Groups | Semen processing techniques (million mL ⁻¹). | | |
|---------|--|---------------------|---------------------|
| | PGC | Swim up | Swim up/PGC |
| Control | 42.38 ^{Aa} | 26.13 ^{Ba} | 18.88 ^{Ca} |
| BVDV | 21.5 ^{Ab} | 13.25 ^{Bb} | 14.38 ^{Cb} |

Mean of 8 replications; Capital letters show statistical difference among lines (PGC x Swim up x Swim up/PGC) $P < 0.05$; Small letters show statistical difference among columns (Control x BVDV) $P < 0.05$.

Table 2: Comparison of Comet assay results from spermatozoa nuclei evaluations after semen processing techniques.

| Comet level | PGC | | Swim up | | Swim up/PGC | | Pre-processing | |
|-------------|--------------------|---------|--------------------|---------|--------------------|---------|--------------------|-------|
| | % | N | % | N | % | N | % | N |
| 0 | 95.90 ^a | 209/218 | 97.90 ^b | 175/189 | 94.90 ^c | 377/397 | 95.20 ^d | 80/84 |
| 1 | 4.10 ^a | 9/218 | 2.10 ^b | 4/189 | 4 ^c | 16/397 | 4.80 ^d | 4/84 |
| 2 | 0 ^a | 0 | 0 ^a | 0 | 1.10 ^b | 4/397 | 0 ^a | 0 |

Five replications; Different letters show statistical difference among lines ($P < 0.05$)

3.2 Experiment 2

Analysis of cytopathic effects in MDBK cells indicates that neither Swim up nor PGC processing alone could completely eliminate BVDV from infected samples. For the Swim up group the percentage reduction in virus titer was between 99.9583% to 99.9985% and the reduction for the PGC group was between 99.9958% to 99.9998%. After using a combination of Swim up and PGC protocols, it was not possible to detect BVDV in cell culture; indicating a reduction of 100% (Table 3).

Table 3: Results of BVDV titration after sperm processing techniques.

| Viral titer BVDV (TCID₅₀/mL) | | | |
|---|--------------------|--------------------|-------------|
| Initial titer 10 ^{6.68} TCID ₅₀ /mL | | | |
| Replicate | PGC | Swim up | Swim up/PGC |
| 1 | 10 ¹ | 10 ^{2.97} | ND |
| 2 | 10 ^{1.97} | 10 ^{2.73} | ND |
| 3 | 10 ^{0.87} | 10 ^{1.87} | ND |
| 4 | 10 ^{1.73} | 10 ^{2.3} | ND |
| 5 | 10 ^{2.3} | 10 ^{3.3} | ND |

ND – no cytopathic effect detected

3.3 Experiment 3

The *in vitro* embryo production after Swim up followed by PGC processing of semen samples showed normal cleavage and blastocyst rates in all groups (Table 4). RT-PCR showed no positive results in Control 2 and infected groups.

Table 4: Results of *in vitro* embryo production using semen processed by Swim up followed by PGC.

| Experimental Groups | Sperm concentration (10⁶ mL⁻¹) | Cleavage rate % (n) | Blastocyst rate % (n) |
|----------------------------|---|----------------------------|------------------------------|
| Control 1 | 46.67 | 73.04 (214/293) | 25.31 (41/162) |
| Control 2 | 21.83 | 73 (219/300) | 18.51 (52/281) |
| BVDV | 26.33 | 71.35 (127/178) | 30.07 (43/143) |

Mean of 5 replications; Control 1 – Swim up; control 2 – Swim up/Percoll ; No statistical difference among groups

4 Discussion

BVDV is known to pose a substantial threat to the application of embryo technologies. In addition, the amount of virus is likely to be amplified in *in vitro* embryo production during the culture period (Gard et al., 2007). Therefore, it is important to decrease the amount of virus or to eliminate it completely from infected semen samples in order to avoid its harmful influence on embryo development. The Swim up/PGC combination was an attractive method to achieve that goal.

The most common procedure for human sperm preparation in HIV discordant couples is a two-step gradient centrifugation, followed by Swim up in culture medium. PGC and

Swim up were employed in motile spermatozoa from a HIV positive patient and the final spermatozoa suspension tested for the presence of HIV-RNA. The test showed that Swim up processing after PGC of the infected semen reduced the HIV-1 RNA and HIV-1 proviral DNA to undetectable levels (Hanabusa et al., 2000).

In Experiment 1, the sperm count obtained from the Swim up/PGC group was lower than those obtained in the two other groups (Swim up and PGC individually), but the resulting amount was enough to perform an IVF procedure (Table 1 and Table 4). A similar experiment performed with human semen showed that sperm parameters are not significantly different from those that the World Health Organization considers to be normal (Garrido et al., 2005). The Comet assay showed that the combination of the two semen processing techniques (Swim up/Percoll gradient) produced 1.1% of Comet level 2, which is considered a low damage rate (Table 2) since it was possible to produce 24% of bovine blastocysts from a semen sample presenting 25% of sperm cells damaged by x-ray irradiation (Fatehi et al., 2006).

Experiment 2 showed that the Swim up/PGC combination diminished the amount of BVDV at the semen sample to a point at which it was not possible to detect the virus in cell culture (Table 3). In the two other experimental groups (Swim up and PGC individually) the results were similar to that found by Bielanski et al. (1992). Although lower viral titers were found after semen processing techniques (Swim up and PGC individually) than the ones obtained by Bielanski et al. (1992), which was a range between $10^{3.4}$ and $10^{3.8}$, the former tested PI bull semen, which probably had a larger BVDV initial concentration. A recent study showed that with an initial infectious virus titer of $10^{3.82}$ – $10^{3.25}$ TCID₅₀/50 µL, a reduction of more than 99% was achieved in PCV2 spiked semen samples processed by a double method consisting of single layer centrifugation followed by a Swim up (Blomqvist et al., 2011).

With regard to *in vitro*-produced embryos, the effect of BVDV infection at the time of IVF has been the focus of several experimental studies (Guerin et al., 1992; Wrathal et al., 2006; Gard et al., 2009). The presence of BVDV was shown to be detrimental in culture systems, causing a reduction in maturation, fertilization and/or development rates (Gard et al., 2009). Guerin et al. [1992] found that fertilization and embryo cleavage rates were significantly reduced when semen from a PI bull was used to inseminate oocytes, and development to the blastocyst stage was only 2.1% when

compared to 19.6% from uninfected, control bull semen. Therefore, an indication that the Swim up/PGC combination was effective in reducing and/or eliminating BVDV from semen samples was the cleavage and blastocyst rates obtained in Experiment 3. Similar results were obtained in all groups evaluated (Table 4). This was also corroborated by the negative RT-PCR results.

5 Conclusions

In conclusion, the present results showed that the combination of Swim up followed by PGC completely eliminated BVDV in artificially contaminated semen samples and also allowed the production of blastocysts. The protocol described here can be easily adopted in the daily routine of a commercial IVP system to avoid BVDV introduction in IVF procedures, thus promoting sanitary control and preventing unnecessary embryo loss.

Acknowledgements

We thank ABS Pecplan for supplying the semen and Rost abattoir for supplying the bovine ovaries. Financial support and fellowships were provided by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Propesq/UFRGS.

References

- Bielanski, A., 2007. Disinfection procedures for controlling microorganisms in the semen and embryos of humans and farm animals. *Theriogenology* 68, 1-22.
- Bielanski, A., Dubuc, C., Hare, W.C.D., 1992. Failure to remove bovine diarrhea virus (BVDV) from bull semen by Swim up and other separatory techniques associated with *in vitro* fertilization. *Reprod. Dom. Anim.* 27, 303-306.
- Blomqvista, G., Perssona, M., Wallgrenb, M., Per Wallgrena, C., Morrellc, J.M., 2011. Removal of virus from boar semen spiked with porcine circovirus type 2. *Anim. Reprod. Sci.* 126, 108-114.
- Fatehi, A.N., Bevers, M.M., Schoevers, F., Roelen, B.A., Colenbrander, B., Gadella, B.M., 2006 DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early

embryonic development but induces apoptosis after the first cleavage. *J. Androl.* 27, 176-188.

Gard, J.A., Givens, M.D., Marley, M.S., Galik, P.K., Riddell, K.P., Stringfellow, D.A., Zhang, Y., Edmondson, M.A., 2009. Bovine viral diarrhea virus (BVDV) associated with single *in vivo*-derived and *in vitro*-produced preimplantation bovine embryos following artificial exposure. *Theriogenology* 71, 1238-1244.

Gard, J.A., Givens, M.D., Stringfellow, D.A., 2007. Bovine viral diarrhea virus (BVDV): Epidemiologic concerns relative to semen and embryos. *Theriogenology* 68, 434-442.

Garoussi, M.T., 2007. The effects of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhea virus with sperm cells on *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Vet. Res. Comm.* 31, 365-370.

Garrido, N., Mesenguer, M., Remohí, J., Simón, C., Pellicer, A., 2005. Semen characteristics in human immunodeficiency virus (HIV) and hepatitis C (HCV) seropositive males: predictors of the success of viral removal after sperm washing. *Hum. Reprod.* 20, 1028-1034.

Givens, M.D., Stringfellow, D.A., Riddell, K.P., Galik, P.K., Carson, R.I., Riddell, M.G., 2006. Normal calves produced after transfer of *in vitro* fertilized embryos cultured with an antiviral compound. *Theriogenology* 65, 344-355.

Guerin, B.; Chaffaux, St., Marquant Le Guienne, B., Allietta, M., Thibier, M., 1992. IVF and IV culture of bovine embryos using semen from a bull persistently infected with BVD. *Theriogenology* 37, 217.

Hanabusa, H., Kuji, N., Kato, S., Tagami, H., Kaneko, S., Tanaka, H., 2000. An evaluation of semen processing methods for eliminating HIV-1. *AIDS* 14, 1611-1616.

Houe, H., 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhea virus (BVDV) infections. *Vet. Microbiol.* 64, 89-107.

Kirkland, P.D., McGowan, M.R., Mackintosh, S.G., Moyle, A., 1997. Insemination of cattle with semen from a bull transiently infected with pestivirus. *Vet. Rec.* 140, 124-127.

- Kirkland, P.D., Richards, S.G., Rothwell, J.T., Stanley, D.F., 1991. Replication of bovine viral diarrhea virus in the bovine reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections. *Vet. Rec.* 128, 587-590.
- McGowan, M.R., Kirkland, P.D., 1995. Early reproductive loss due to bovine pestivirus infection. *Brith. Vet. J.* 151, 263-270.
- Reed, L.J., Muench, H., 1938. Simple method of estimating fifty per cent endpoint. *Am. J. Hyg.* 27, 493-497.
- Ridpath, J., Flores, E.F., 2007. *Flaviviridae*, in: Flores EF. (Ed) *Virologia Veterinária*, Editora UFSM, Santa Maria, Brasil, p.563-591.
- Semprini, A.E., Levi-Setti, P., 1992. Insemination of HIV-negative women with processed semen of HIV-positive partners. *Lancet* 340, 1317-1319.
- Singh, N.P., Mccoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* 175. 184-191.
- Vilcek, S., Herring, A.J., Herring, J.A., Nettleton, P.F., Lowings, J.P., Paton, D.J., 1994. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch Virol.* 136, 309–323.
- Walz, P.H., Givens, M.D., Cochran, A., Navarre, C.B., 2008. Effect of dexamethasone administration on bulls with a localized testicular infection with bovine viral diarrhea virus. *Can. J. Vet. Res.* 72, 56-62.
- Wrathall, A.E., Simmons, H.A., Van Soom, A., 2006. Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilization with virus-infected semen. *Theriogenology* 65, 247-274.

4 ARTIGO 2

Bovine cumuli-oophorus complexes experimentally infected with BVDV affect oocyte
in vitro maturation and embryo development rates

(Apêndice C)

**Esse artigo será enviado para a revista Theriogenology e está formatado de acordo
com as normas da revista**

Bovine cumuli-oophorus complexes experimentally infected with BVDV affect oocyte *in vitro* maturation and embryo development rates

A.G. Galuppo ^{a*}; N. Beuter Jr ^b; N.S. Arruda ^a; D.S. Silva ^a; L.S. Marques ^a; C.W. Canal ^b; J.L. Rodrigues ^a

^aLaboratory of Embryology and Biotechnics of Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Av Bento Gonçalves, 9090, Agronomia, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Laboratory of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Av Bento Gonçalves, 9090, Agronomia, Porto Alegre, RS, Brazil

Abstract

The materials of animal origin that are used for *in vitro* embryo production (IVP) in cattle could contain the bovine viral diarrhea virus (BVDV) when they originate from infected animals. Therefore, it is important to implement the necessary precautions and to perform the relevant studies to minimize the transmission of pathogens during the performance of IVP and other novel assisted reproductive techniques. The aims of this study were to evaluate BVDV infection experimentally during the *in vitro* maturation (IVM) of bovine cumuli-oophorus complexes (COCs), to examine the effect of the BVDV on embryo development and to assess the production of BVDV antigens using cumulus cells (CC). The following parameters were investigated: the maximum and minimum diameters of the COCs after IVM in the presence of BVDV were measured to evaluate the expansion area for the CC; the nuclear maturation and embryo development rates were analyzed; and the ability to produce BVDV antigens in a culture of CC versus an MDBK cell culture was assessed. The results for the measurement of the CC expansion areas were as follows: the average area was 0.3618 mm^2 ($\sigma = 0.0821$; $N = 244$ elements) for the control group (C) and 0.3712 mm^2 ($\sigma = 0.1130$; $N = 241$ elements) for the infected group (V) ($p < 0.05$). Our data demonstrate that groups C and V exhibit different CC expansion patterns. The oocyte nuclear maturation rate observed in C (77.78%) was higher than in V (72.73%) ($p < 0.05$), and the C embryos showed a

higher development rate to the blastocyst stage (26.21%) than V (19.16%) ($p < 0.05$). In comparison to MDBK cells the assessment of BVDV antigen production showed that CC produced the highest viral titers. Our findings demonstrate that the presence of the BVDV during IVM results in the infection of CC and affects CC expansion pattern. The infection of CC with the BVDV is related to reduction of oocyte *in vitro* nuclear maturation and embryo development rates. In addition, it may be possible to use CC to produce BVDV antigens.

Keywords: BVDV, embryo, IVP, cattle

1. Introduction

In vitro embryo production (IVP) represents the third generation of techniques that have been developed for assisted reproduction in cattle. This procedure is used worldwide for the commercial production of cattle and as a model for basic research [1]. However, assisted reproductive techniques have the potential to change the animal production environment significantly by modifying the spread of infectious diseases within and among cattle populations [2]. Environmental microbes that are associated with the operator, the abattoir or the laboratory pose risks during the *in vitro* embryo production when materials pooled from various sources are used [3]. It is also important to consider that prior to ovulation and/or aspiration, the oocytes may become infected through contact with an infectious agent that is present in the ovarian granulosa cells or in the follicular fluid, most likely during viraemia at the acute stage of a infection [3, 4].

The bovine viral diarrhoea virus (BVDV) is an important viral pathogen that affects cattle during IVP [5, 6]. The BVDV, a single-stranded enveloped RNA virus that is a member of the family *Flaviviridae*, has two genetically distinct genotypes (1 and 2) and two biotypes (cytopathic and noncytopathic) [1, 7]. The BVDV is broadly distributed among the world's cattle population [2] and causes substantial economic losses for cattle producers through decreased productivity and reproductive losses [8]. Infection with the BVDV is associated with low conception rates, high embryonic mortality and abortion [9].

According to Gard et al. [2], the materials of animal origin that are used in the IVP of embryos in cattle could contain the BVDV when they originate from infected animals. Other studies [1, 10] have addressed the potential transmission of the virus via *in vivo*-

derived and *in vitro*-produced embryos and have evaluated the effect of BVDV infection on *in vitro*-produced embryos. The presence of the BVDV has a detrimental effect on culture systems causing a reduction in maturation rates, fertilization and/or embryo development [1, 11]. Vanroose et al. [11] demonstrated that the presence of the BoHV-1 or BVDV in an IVP system affects fertilization rates and embryonic development. Kafi et al. [12] determined that bovine pestivirus disturbs the normal function of the zona pellucida (ZP) by adhering to its glycoprotein layer and interfering with the exchange of nutrients and metabolites between the ZP and the culture environment. Garoussi [13] suggested that the presence of the CP-BVDV in sperm cells affects the motility or causes abnormalities in the morphology of the sperm, resulting in a decreased fertilization rate. In addition, it appears that the BVDV is carried by gametes, and has been demonstrated that pathogenic agents, such as the BVDV, are more likely to adhere to the surface of the zona pellucida (ZP) of IVP embryos than to embryos that are generated *in vivo* [4, 14]. Garoussi and Mehrzad [14] showed that oocytes infected with the CP- or NCP-BVDV compromise sperm attachment to the ZP and interfere with fertilization. It is important to emphasize that embryo development was observed in the presence of the BVDV in each of these studies; therefore, it is possible to produce transferrable IVP embryos in the presence of this virus, which is a concern from an epidemiological point of view [15].

Because of the high costs associated with the requirements for quarantine facilities to house, handle and perform postmortem examinations of infected animals, limited data concerning the risks associated with the production of IVP embryos from infected animals are available [4]. Garoussi and Mehrzad [14] suggest that there are limited data regarding the interaction between infected bovine gametes and the BVDV. Therefore, it is important to implement the necessary precautions and perform relevant studies to minimize the transmission of pathogens via IVP and other novel assisted reproductive techniques [1]. The aim of this study was to evaluate the COCs maturation and blastocyst development rates of COCs that were experimentally infected with the BVDV and to examine the performance of CC for the production of BVDV antigens.

The aims of this study were first to determine maturation and embryo development rates obtained from BVDV experimentally infected COCs, and second to examine the performance of CC for the production of BVDV antigens

2. Materials and Methods

Unless otherwise indicated, all plasticware used in the experiments were obtained from Nunc (Roskild, Denmark). All chemicals and media were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

The bovine serum albumin (BSA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and the fetal calf serum (FCS) (Nutricell, Campinas, SP, Brazil) used in this study were tested for the presence of the BVDV by examining for the virus in cell cultures and using RT-PCR. These animal-derived materials were shown to be free of the BVDV. The pools of follicular fluid were also tested by RT-PCR and shown to be free of the BVDV.

2.1. Experimental Design

2.1.1. Experiment 1: Expansion analysis of cumulus cells

COCs that were selected after the follicle aspirations and then divided into two groups before been submitted to IVM: the control (C_1) and BVDV experimentally infected COCs (V_1). After IVM, the maximum (d_{max}) and minimum (d_{min}) diameters of the COCs were measured, and their areas were calculated for the evaluation of the cumulus cells (CC) expansion.

2.1.2. Experiment 2: Oocyte *in vitro* nuclear maturation and embryo development to the blastocyst stage

First the COCs were divided into two groups, the control (C_2), and the experimentally infected with the BVDV (V_2). After that the previous groups were splitted in two more groups, one to determine oocyte maturation rate and the other to evaluate the embryo development rate to the blastocyst stage. After IVM the oocytes presenting a polar body (PB) were considered mature. The embryo development (blastocyst rate) was examined on days seven and eight of *in vitro* culture. The stripped CC obtained from the COCs used for PB visualization were maintained in cultures dishes to observe the BVDV cytopathic effect (cpe), which confirms the viral infection of these cells.

2.1.3. Experiment 3: Comparison of BVDV antigen production in CC versus MDBK cultures

This experiment was conducted to evaluate the CC culture ability to produce BVDV antigen compared with a Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cell culture. The CC and MDBK cells were infected with the BVDV, and the cells were passed five times. Samples of the antigens from the 1st, 3rd and 5th passes in the culture were titrated using a TCID₅₀ assay.

2.2. Oocyte collection and *in vitro* maturation

Bovine ovaries were collected immediately after slaughter at a commercial abattoir and were transported to the laboratory (29°C ±2) in modified phosphate-buffered saline (mPBS). Before follicle aspiration, the ovaries were washed with fresh mPBS. The COCs were aspirated from ovarian follicles that measured 2 to 8 mm in diameter. The oocytes that were surrounded by several layers of compact follicular cells and a uniform cytoplasm were selected for the experiment. The COCs were washed three times in maturation medium (TCM199 (Sigma) containing 0.68 mM L-glutamine, 25 mM HEPES, 0.2 mM pyruvate, 26.2 mM NaHCO₃, 50 µg/mL oestradiol-17β, 0.5 µg/mL FSH (Folltropin, Vetrefarm), 0.03 IU/ml hCG (Profasi, MerckSerono) and 10% (v/v) FCS) and were matured in 100-µl drops of maturation medium under mineral oil. The COCs were cultured in groups of 15 COCs per drop of maturation medium at 38.5 °C with 5% CO₂ in a humidified atmosphere during 24 h.

2.3. *In vitro* embryo production (*in vitro* fertilization and culture)

Spermatozoa were selected using the swim-up procedure, and the final concentration of the sperm was adjusted to 1 x 10⁶ sperm ml⁻¹ for each 100-µL drop of medium. Before fertilization, the COCs were washed three times, and fertilization was performed in Fert-TALP medium [16] that was supplemented with 6 mg/ml BSA, 0.25 mM pyruvate, 3 mg/ml penicillamine, 10 µM hypotaurine, 1 IU/ml heparin, and 1 µM epinephrine. The gametes were maintained at 38.5 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ in air for 18 to 22 h. After that, the presumptive zygotes were mechanically stripped of CC, washed three times and cultured in SOF medium supplemented with 0.3 mM pyruvate, 1 mM L-glutamine, 2% BMEaa, 1% MEMaa, and 10% FCS. Groups of 15 presumptive zygotes were cultured per 200 µL medium drop under mineral oil (M8410) at 38.5°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂, 5% O₂, and 90% N₂ for eight days.

2.4. Cell culture system

Experiment 2: The stripped CC isolated from the COCs after IVM were maintained in culture dishes containing IVM medium at 37.5°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ for 5 days. The cpe was observed daily using a light microscope.

Experiment 3: The CC and MDBK cells were cultivated in DMEM (Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA) supplemented with 5% FCS, and the cells were maintained at 37°C with 5% CO₂ in air and a humidified atmosphere for five days. The cpe was observed daily using a light microscope.

2.5. Virus

Stocks of the cytopathic (CP) NADL (National Animal Disease Laboratory, Iowa, USA) viral strain were propagated in MDBK cells, which were cultured in DMEM (Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA). The viral stock was aliquoted and stored (-80°C) until needed. For experiments 1 and 2, the viral titer of the CP-BVDV stock was 10^{5.8} TCID₅₀/ml, and for experiment 3, the viral titer of the CP-BVDV stock was 10^{6.68} TCID₅₀/ml. The viral titer was assessed using the Reed and Muench method [17].

2.6. Experimental infection of COCs

The V₁ and V₂ groups received 10 µL of the BVDV-containing suspension, and the C₁ and C₂ groups received 10 µL of the culture medium (DMEM; Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA) [12].

2.7. Analysis of COCs

To evaluate the expansion of CC after IVM, the dmax and dmin of the COCs were measured (X 100) using an ocular micrometer in an inverted microscope (Carl Zeiss, Axiovert 135, Germany). The area of the COCs was estimated considering the Geom ellipse as the model geometric shape for the average COC shape (COC area_{mm²} = $\pi \times d_{\min} \times d_{\max} / 4 \times 10^6$). After the CC were mechanically removed, the nuclear maturation rate (t_{IVM}) was assessed by polar body extrusion (X 45). The removed CC were cultured (37.5°C, 5% CO₂) for the cpe observation (48 h) and used as a positive control for the infection of CC by the BVDV.

2.8. Statistical analysis

The data were analyzed using a chi-squared test and ANOVA.

3. Results

3.1. Experiment 1: Analysis of cumulus cells expansion

Before the measuring procedure, the COCs were analyzed morphologically (100X), and no differences between the control and the infected groups were observed. In total, 485 COCs were measured. Using the data presented in table 1, an ANOVA was applied to compare the C₁ and V₁ groups. An F_{cal} = 1.0083 was obtained. The values of F_{cal} > F_{tab} were considered significant with a 95% confidence interval (F_{tab} = 1.0000).

Table 1: CC expansion area and the σ^2 of the measured COCs.

| Groups | Number of COCs measured | Average area (mm ²) | σ^2 |
|----------------|-------------------------|---------------------------------|------------|
| C ₁ | 244 | 0.3618 ^A | 0.0821 |
| V ₁ | 241 | 0.3712 ^B | 0.1130 |

The different letters show the statistical significance of the differences between the columns

3.2 Experiment 2: Oocyte *in vitro* nuclear maturation and embryo development rate to the blastocyst stage obtained from COCs experimentally infected with the BVDV during IVM

The oocyte nuclear maturation rate for the C₂ group (77.78%), was approximately 5% higher (p<0.05) than the nuclear maturation rate obtained for the V₂ group (72.73% (72/99)) after 24 h in the presence of the BVDV (Table 2).

Table 2: Nuclear maturation rate after experimental infection with the BVDV during IVM

| Groups | Oocytes N | IVM N (%) |
|----------------|-----------|-------------------------|
| C ₂ | 81 | 63 (77.78) ^A |
| V ₂ | 99 | 72 (72.73) ^B |

*5 replications; different letters represent the statistical significance between lines (p<0.05)

The development rate of the embryo to the blastocyst stage was significantly higher in the C₂ group (26.21%) compared with the V₂ group (19.16%) after seven days of culture (Table 3).

Table 3: Blastocyst development rate (BI) after experimental infection with the BVDV during IVM

| Groups | Oocytes | BI |
|----------------|---------|-------------------------|
| | N | N (%) |
| C ₂ | 145 | 38 (26.21) ^a |
| V ₂ | 167 | 32 (19.16) ^b |

*5 replications; the different letters represent statistical significance between lines (p<0.05)

The visualization of the cpe in the CC was performed daily during five days. However, in all the infected samples, the cell culture presented the cpe after 48 h, confirming infection with the BVDV in those cells.

3.3 Experiment 3: Comparison of the production of BVDV antigens in a cumulus oophorus-cell culture versus an MDBK-cell culture

The results show that the highest virus titers were observed in the CC primary cultures ($10^{5.80}$, $10^{5.63}$ and $10^{5.63}$ for the 1st, 3rd and 5th passes, respectively) compared with the MDBK cell cultures ($10^{4.63}$ for each pass) (Table 4).

Table 4: BVDV viral titers obtained in MDBK cells versus CC

| Passes | Viral titer (TCID ₅₀ /ml) | |
|--------|--------------------------------------|-------------|
| | MDBK | CC |
| 1 | $10^{4.63}$ | $10^{5.87}$ |
| 3 | $10^{4.63}$ | $10^{5.63}$ |
| 5 | $10^{4.63}$ | $10^{5.63}$ |

4. Discussion

Van Soon et al. (2010) pointed out that the BVDV adheres to cumulus cells and interferes with the outcome of IVP. The presence of CC on the outer surface of the ZP has been regarded as a biohazard for embryo transfer in cattle [18]. Experiment 1 evaluated the BVDV effect in the CC of bovine oocytes during IVM using the CC expansion area as a parameter to evaluate the possibility of infection. Usually in the

bovine embryo IVP laboratory routine work, the COCs morphological analysis using a light microscope is the approach to determine quality [19]. In this study, however, we used an objective parameter, i.e., the direct measurement of the COCs, whereas other authors examined the degree of expansion using a score system based on a subjective scale of 0 to +3 (where +3 represents oocytes containing completely expanded cumulus cells) [12, 20]. Employing the subjective scale our morphological evaluation based on the light microscope observations alone revealed no differences among cell morphology of the two groups. However, it was possible to identify different expansion patterns in both groups using an objective parameter (the measurements performed on the COCs – table 1). The larger number of oocytes evaluated (n=485) confirm the difference among the groups (statistically significant) and this change in the cells function could be due to the viral infection. Vanroose et al. [11] obtained contrasting results in a study of the IVM of bovine COCs that were infected with the CP-BVDV. The authors reported no difference in the rate of cumulus expansion between the control group and the group exposed to the virus was observed. Kafi et al. [12] also showed no significant difference between the +3 expansion rate (control vs. treated: $79\% \pm 7.5\%$ vs. $74\% \pm 10.7\%$; $p < 0.05$). It is possible that the authors could not detect the alteration of the CC expansion pattern due to the subjectiveness and the vagueness of their evaluation process.

In experiment 1, IVM for 24 h was not enough for the BVDV to promote cpe in CC. Nevertheless, Birk et al. [21], evaluating the cytoplasmic vacuolization responses to the CP-BVDV in MDBK cells, found that vacuolated cells began to round up and detach 24 h post-infection. The authors suggest that virus-induced dynamic cellular pathology must be investigated within the first 24 h [21]. In our experiment, the cpe did not occur within the first 24 h of the IVM, which explains why it was not possible to identify morphological changes using the subjective approach in the experimentally infected COCs compared with the control group. Despite the suggestion by Goovaerts et al. [19] that the assessment of the viability and metabolism of the CC may help predict the developmental potential of the enclosed oocyte, in our study, the initial evaluation of the CC did not demonstrate the presence of the BVDV in the culture system. This was confirmed in experiment 2, in which the CC stripped from the experimentally infected COCs were maintained in culture for five days to confirm the BVDV infection of these cells. The visualization of the cpe after IVM was possible by cell culture for additional

48 h, and was observed in all the infected CC samples, whereas no cpe was visualized in the control group. Vanroose et al. [11] confirmed this observation with a similar study in which the cpe was observed in COCs that were matured in medium containing $10^{5.3}$ TCID₅₀/ml of the CP-BVDV and maintained in culture for additional three days.

A study by Tsuboi and Imada [22] investigated if the BVDV replicates in follicular epithelial cells (FE) derived from persistently infected heifers. The results revealed a high-titer of the BVDV in the FE from the infected group (TCID₅₀/ml = $10^{6.25}$ to $10^{7.0}$). The study suggests that the BVDV may come into direct contact with oocytes through the gap junctions in FE and CC during oogenesis or oocyte maturation [22]. This event could interfere with IVM process and embryo development. This hypothesis was tested in a study by Vanroose et al. [5] that examined the structural aspects of the ZP of IVP embryos at different stages of development. In an effort to characterize the barrier function of the ZP against viral infection, the study demonstrated that the pores at the surface of the ZP are large enough to allow entry of BoHV-1 (180 to 200 nm) and the BVDV (45 to 55 nm). In all the embryonic stages that were investigated by these authors, more than 96% of the outer pores were large enough for the entry of the BVDV. Suzuki et al. [23] showed during cumulus expansion, the cumulus-oocyte projections are disconnected between the metaphase I and metaphase II stages of development, whereas the cumulus-cumulus connections remain intact. It is known that the intercellular communication between the oocyte and the surrounding follicle cells through gap junctions is of vital importance during the maturation process [24]. The disconnection of the CC from the ZP may provide an opportunity for the BVDV to pass through the ZP pores into the oocyte. Van Soom et al. [18] proposed that the structure of the zona pellucida (ZP) allows at least a partial penetration by some viruses, and moreover, viruses can be carried in cells, such as cumulus cells, adhering to the ZP.

The data obtained in experiment 2, shows that the IVM was compromised by the presence of the virus. The oocyte nuclear maturation rate of the C₂ group was 77.78% (63/81), approximately 5% higher than the nuclear maturation rate of the V₂ group, which was 72.73% (72/99) after 24 h of maturation in the presence of the BVDV ($p < 0.05$) (Table 2). Vanroose et al. [11] showed that the introduction of BoHV-1 or the BVDV during IVM or during *in vitro* culture resulted in significantly lower rates of blastocyst development only. Kafi et al. [12] demonstrated that despite the presence of the BVDV in the maturation media during the 24-h culture period, there was no

apparent effect on the *in vitro* maturation of the oocyte. The study reported a nuclear maturation rate of $89\% \pm 4.8$ for the control group and an $85\% \pm 7.4$ nuclear maturation rate for pestivirus-inoculated oocytes.

Regarding embryo development to the blastocyst stage, our data shows that the blastocyst rate was significantly higher in the control group (26.21%) than in the BVDV-infected group (19.16%) after seven days culture (Table 3). Vanroose et al. [11] found no significant difference in the blastocyst rates among the control and the IVM CP-BVDV-infected embryos. The study showed that even when the embryos were exposed to BoHV-1 or the CP- and NCP-BVDV, the rates of blastocyst formation (23% for BoHV-1; 24% for CP-BVDV; 24% for NCP-BVDV) did not differ from the unexposed embryos (27%). However, Stringfellow et al. [15] reported that the rates of cleavage (74% versus 78%), the cleavage to \geq the 5-cell stage (54% versus 58%) and the development to the morula and blastocyst (9% versus 12%) stages were slightly lower in the BVDV-exposed groups compared with the unexposed groups. Garoussi [13] obtained similar results in a study examining the effects of the CP- and NCP-BVDV on the *in vitro* fertilization of bovine oocytes using sperm cells. The study revealed that the highest infectious titer of the CP-BVDV ($10^{5.5}$ TCID₅₀/ml) in combination with the lowest final sperm concentration (10^5 sperm cells/ml) decreased the fertilization rate significantly compared with the control group (4% vs. 19%). A more recent study performed by Garoussi and Mehrzad [14] reported that the CP- and NCP-BVDV significantly reduced the fertilization rate of oocytes that were incubated with a higher sperm concentration (10^6 sperm/ml).

Considering that there is little detailed knowledge of the molecular mechanisms responsible for the entry of the BVDV biotypes into bovine cells [14], experiment 3 was performed to compare the production of BVDV antigens in a culture of CC versus a MDBK cell culture. The cpe is used as a reference to measure the degree of adaptation of the viral agents, such the BVDV, to the primary cell cultures or cell lines, and the adaptation is followed by the expression of the cpe by an increase in the viral titer in susceptible cells [25]. The results show that compared with the MDBK cells, the highest viral titers were found in the CC (Table 4). The BVDV replicates in cells originating from the species that it usually infects, e.g., bovine cells, ovine cells, and goat cells, and in cells from other species, such as rabbits, cats, and swine. Although several cell lines

are susceptible to infection with the BVDV, the multiplication of the virus *in vitro* can vary due to factors that are not fully understood [26]. According to Odeon et al. [26], the susceptibility of the substrate to the virus is relevant for the isolation of the virus for diagnostic purposes, characterization of the biological behavior of a specific strain, evaluation of immunogenicity tests and vaccine production.

5. Conclusions

In summary, our findings show that the presence of the BVDV during IVM negatively influences the nuclear maturation rate and the development of the embryo to the blastocyst stage. In addition, the BVDV infects CC and interferes with the CC expansion area, and CC can be used to produce BVDV antigens. It is important to consider that the mechanisms involved in the interaction between the BVDV and the ZP of IVP embryos is not fully understood, and further studies are necessary to confirm that the BVDV enters and infects oocytes and/or the cytoplasm of embryonic cells.

Acknowledgements

We thank ABS Pecplan for supplying the semen, and Rost Abattoir for supplying the bovine ovaries. The authors thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for the grant and fellowships.

References

- [1] Gard JA, Givens MD, Marley MSD, Galik PK, Riddell KP, Stringfellow DA, Zhang Y, Edmondson MA. Bovine viral diarrhea virus (BVDV) associated with single *in vivo*-derived and *in vitro*-produced preimplantation bovine embryos following artificial exposure. *Theriogenology* 2009;71:1238-1244.
- [2] Gard JA, Givens MD, Stringfellow DA. Bovine viral diarrhea virus (BVDV): epidemiologic concerns relative to semen and embryos. *Theriogenology* 2007;68:434-442.
- [3] Bielanski A. Disinfection procedures for controlling microorganisms in the semen and embryos of humans and farm animals. *Theriogenology* 2007;68:1-22.

- [4] Bielanski A. Potential for disease control or transmission by transfer of embryos produced *in vitro*: a review. In: International Embryo Transfer Society Manual, Stringfellow DA, Givens MD (Ed.) Illinois, USA, 2010, p.41-49.
- [5] Vanroose G, Nauwynck H, Van Soom A, Ysebaert MT, Charleir G, Van Oostveldt P, De Kruif A. Structural aspects of the zona pellucid of *in vitro*-produced bovine embryos: a scanning electron and confocal laser scanning microscopic study. *Biol Reprod* 2000;62:463-469.
- [6] Stringfellow DA, Riddell KP, Givens MD, Galik PK, Sullivan E, Dykstra CC, Robl J, Kasinathan P. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in cell lines used for somatic cell cloning. *Theriogenology* 2005;64:1004-1013.
- [7] Deregts D, Loewen KG. Bovine viral diarrhoea virus: Biotypes and disease. *Can Vet J* 1995;36:371-378.
- [8] Gregg K, Riddell KP, Chen SH, Galik PK, Xiang T, Guerra T, Marley MS, Polejaeva I, Givens MD. Risk and prevention of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) transmission through embryo production via somatic cell nuclear transfer (SCNT) using oocytes from persistently infected donors. *Theriogenology* 2010;74:1-10.
- [9] Bielanski A, Algire A, Lalonde A, Nadin-Davis S. Transmission of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) via *in vitro*-fertilized embryos to recipients, but not to their offspring. *Theriogenology* 2009;71:499-508.
- [10] Wrathall AE, Simmons HA, Van Soom A. Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilization with virus-infected semen. *Theriogenology* 2006;65:247-274.
- [11] Vanroose G, Nauwynck H, Van Soom A, Vanopdenbosch E, De Kruif A. Effect of bovine herpesvirus-1 or bovine viral diarrhoea virus on development of *in vitro*-produced bovine embryos. *Mol Reprod Develop* 1999;54:255-263.
- [12] Kafi M, McGowan MR, Kirkland PD. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes and *in vitro* culture of presumptive zygotes in the presence of bovine pestivirus. *Anim Reprod Sci* 2002;71:169-179.

- [13] Garoussi MT. The effects of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus with sperm cells on *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Vet Res Commun* 2007;31:365-370.
- [14] Garoussi MT, Mehrzad J. Effect of bovine viral diarrhoea virus biotypes on adherence of sperm to oocytes during *in-vitro* fertilization in cattle. *Theriogenology* 2011;75:1067–1075.
- [15] Stringfellow DA, Riddell KP, Galik PK, Damiani P, Bishop MD, Wright JC. Quality controls for bovine viral diarrhoea virus-free IVF embryos. *Theriogenology* 2000;53:827-839.
- [16] Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod*, 1988;38:1171-1180.
- [17] Reed LJ, Muench H. Simple method of estimating fifty per cent endpoint. *Am J Hyg* 1938;27:493-497.
- [18] Van Soom A, Wrathall AE, Herrler A, Nauwynck HJ. Is the zona pellucid an efficient barrier to viral infection? *Reprod Fertil Develop* 2010;22:21-31.
- [19] Goovaerts IGF, Leroy JLMR, Jorsen EPA, Bols PEJ. Noninvasive bovine oocyte quality assessment: possibilities of a single oocyte culture. *Theriogenology* 2010;74:1509-1520.
- [20] Downs SM. Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. *Theriogenology* 1993;39:65-76.
- [21] Birk AV, Dubovi EJ, Cohen-Gould E, Donis R, Szeto HH. Cytoplasmic vacuolization responses to cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Virus Res* 2008;132:76-85.
- [22] Tsuboi T, Imada T. Bovine viral diarrhoea virus replication in bovine follicular epithelial cells derived from persistently infected heifers. *J Vet Med Sci* 1998;60:569-572.

- [23] Suzuki H, Jeong BS, Yang X. Dynamic Changes of Cumulus-Oocyte Cell Communication During *In vitro* Maturation of Porcine Oocytes. *Biol Reprod* 2000;63:723–729
- [24] Tanghe S, Van Soom A, Nauwynch H, Coryn M, De Kruif A. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation and fertilization. *Mol Reprod Develop* 2002;61:414-424.
- [25] Fernelius AL, Lambert G, Hemness GJ. Bovine viral diarrhea virus-host cell interactions: adaptation and growth of virus in cell lines. *Am J Vet Res* 1969;30:1561-1572.
- [26] Odeon AC, Leunda MR, Faverin C, Boynak N, Vena MM, Zabal O. *In vitro* amplification of BVDV field strains isolated in Argentina: effect of cell line and culture conditions. *Rev Argent Microbiol* 2009;41:79-85.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente o uso de embriões animais tem sido amplamente aceito como uma prática segura e eficiente de movimentação de germoplasma (DELVER, 2010). Do ponto de vista da transmissão de doenças o transito de embriões é consideravelmente mais seguro do que a movimentação de animais ou sêmen (VAN SOOM et al., 2010). Entretanto, procedimentos e políticas para avaliação dos riscos, segurança alimentar e eficácia dessas técnicas precisam ser desenvolvidos, discutidos e implementados (WHEELER et al., 2010). Certamente o crescimento contínuo do uso das biotécnicas está diretamente relacionado com o compromisso de produtores e pesquisadores em assegurar a viabilidade e isenção de patógenos nos gametas e embriões produzidos (DELVER., 2010).

Internacionalmente as autoridades contam com o aumento do rigor nas avaliações do risco de transmissões de doenças via gametas e embriões, para garantir a segurança da movimentação dos mesmos e formular regulamentação para a sua importação. O desenvolvimento de métodos para avaliação quantitativa do risco de transmissão de doenças é importante, uma vez que, leva em consideração o lado técnico da produção de embriões assim como da importação dos mesmos. Essa avaliação utiliza dados relacionados a epidemiologia e patogênese das doenças, e também, dados provenientes de pesquisas com base na avaliação da interação embriões-patógenos.

Durante a última década muitos dados sobre a interação de patógenos com gametas e embriões foram produzidos, e confirmaram que quando as recomendações do manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões são utilizadas, o risco de transmissão de patógenos é mínimo. Porém, no caso de alguns patógenos, como o BVDV, os dados disponíveis ainda não são conclusivos, o que sustenta a necessidade de mais pesquisas (VAN SOOM et al., 2010). Dessa forma conclui-se que os dados obtidos nesse trabalho são extremamente importantes para auxiliar no desenvolvimento de protocolos de lavagem de sêmen a fim de eliminar os microorganismos presentes e possibilitar a produção de embriões livres de patógenos.

REFERÊNCIAS

- AFSHAR A, EAGLESOME MD. Viruses associated with bovine semen. **Veterinary Bulletin**, v.60, p.93–109, 1990.
- ALLIETTA M, GUERIN B, MARQUANT-LE-GUIENNE B, THIBIER M. The effect of neutralization of BVD/MD virus present in bovine semen on the IVF and development of bovine embryos. **Theriogenology**, v.43, p.156, 1995 [Abstract].
- ALVARENGA, M. A. Editorial. **O Embrião: Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões**, Jaboticabal, Jan. Fev. Mar., 2005. Editorial, n. 22, p. 1, 2005.
- BAKER, J.C. Bovine viral diarrhoea virus: a review. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.190, p.1449-1458, 1987.
- BIELANSKI A, DUBUC C, HARE WCD. Inactivation of bovine herpesvirus-1 and bovine virus diarrhoea virus in association with preimplantation bovine embryos using photosensitive agents. **Theriogenology** v.38, p.633–44, 1992.
- BIELANSKI, A. Disinfection procedures for controlling microorganisms in the semen and embryos of humans and farm animals. **Theriogenology**, v.68, p.1-22, 2007.
- BIELANSKI, A.; HARE, W.C.D. Procedimentos para delineamento e análises de pesquisa sobre a transmissão de doenças infecciosas pela transferência de embriões (Apêndice A). In: STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. (Ed.). **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3.ed. Jaboticabal: SBTE. 1998. p.149-156.
- BIELANSKI, A.; LOEWEN, K. *In vitro* fertilization of bovine oocytes with semen from bulls persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. **Animal Reproduction Science**, v.35, p.183-189, 1994.
- BOLIN SR, RIDPATH JF. Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhoea viruses in calves. **American Journal Veterinary Research**, v.53, p.2157-2163, 1992
- 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, p.147-158, 1982.

BRACKETT B.J. Advances in Animal *In vitro* Fertilization In: Wolf D.P. e Zelinski-Wooten M. Ed. **Contemporary Endocrinology: Assisted Fertilization and Nuclear Transfer in Mammals**. Humana Press Inc., Totowa, NJ. Cap2, p.21-51, 2001.

CANAL CW, STRASSER M, HERTIG C, MASUDA A, PETERHANS E. Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.63, p.85-97, 1998

CHANG, M. C. Fertilization of rabbit ova *in vitro*. **Nature**, v.184, p.466-467, 1959.

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal, Belo Horizonte, MG, CBRA**, (2ed), 1998.

D'ANGELO, M. **Interação do herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) com oócitos bovinos maturados *in vitro***. 1998. 52f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

D'ANGELO, M.; GALUPPO, A.G.; BARRA, S.H.C.; SILVA, S.A.C.M.; MELO, G.M.; ZERIO, N.M.C.; VIANA, N.S.; MELLO, M.R.B. Estudo comparativo do desenvolvimento de embriões de camundongo em sistemas de co-cultivo com células primárias e permanentes como modelo experimental em estudos de fecundação *in vitro*. **Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida**, v.7, n.1, p.11-15, 2003.

D'ANGELO, M.; GALUPPO, A.G.; GONÇALVES, R.F. Estudo comparativo da sensibilidade de culturas primárias de células epiteliais de oviduto bovino e murino ao BHV-1. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.69, n.4, p.19-22, 2002.

D'ANGELO, M.; PAVÃO, D.L.; MELO, G.M.; ROJAS, N.; SOUZA, R.J.; ATHAYDE, C.; GALUPPO, A.G.; PINHEIRO, E.S. Acceptable microorganisms concentration in a semen sample for *in vitro* embryo production. **Braz. J. Microbiol**, v.37, p.571-572, 2006.

DELVER, J.L. Practical and ethical considerations for embryo transfer in the 21st century. In: STRINGFELLOW, D.A.; GIVENS, M.D. (Ed). **Manual of the International Embryo Transfer Society**, 4th ed. IETS, Champaign, IL. 2010. p.8-12.

DEREGT, D.; LOEWEN, K. Bovine viral diarrhoea virus: Biotype and disease. **Canadian Veterinary Journal**, v.36, p.371-379, 1995.

EVANS, B. Considerações práticas e éticas para a certificação internacional e comercialização de embriões. In: STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. (Ed.). **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3ed. Jaboticabal: SBTE. 1998. p.7-15.

FRAY, M.D., PRENTICE, H., CLARKE, M.C., CHARLESTON, B. Immunohistochemical evidence for the localization of bovine viral diarrhea virus, a single stranded RNA virus, in ovarian oocytes in the cow. *Veterinary Pathology*, v.35, p.253-259, 1998.

FLORES EF, KREUTZ LC, DONIS RO. Swine and ruminant pestiviruses require the same cellular factor to enter bovine cells. **Journal of Gen Virology**, v.77, p.1295-1303, 1996

GALUPPO AG, D'ANGELO M, MIYASHIRO S, SCARCELLI E, SENEDEZI MLP, MELO GM, SOUZA RJ. Avaliação da sensibilidade de zigotos murinos à *brucella abortus* para o estabelecimento de um modelo experimental em estudos de interações embriões-patógenos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, p.277-282, 2006

GALUPPO, A.G.; D'ANGELO, M.; GONÇALVES, R.F. Estudo comparativo da sensibilidade de culturas primárias de células epiteliais de oviduto bovino e murino ao vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.65, p.99, 1998. Suplemento. Trabalho apresentado à 11ª Reunião Anual do Instituto Biológico, São Paulo, 1998 – Resumo n.150.

GARD, J.A.; GIVENS, M.D.; MARLEY, M.S.; GALIK, P.K.; RIDDELL, K.P.; STRINGFELLOW, D.A.; ZHANG, Y.; EDMONDSON, M.A. Bovine viral diarrhea virus (BVDV) associated with single in vivo-derived and *in vitro*-produced preimplantation bovine embryos following artificial exposure. **Theriogenology**, v.71, p.1238-44, 2009.

GARD, J.A.; GIVENS, M.D.; STRINGFELLOW, D.A. Bovine viral diarrhea virus (BVDV): epidemiologic concerns relative to semen and embryos. **Theriogenology**, v.68, p.434-442, 2007.

GAROUCSI, M.T. The effects of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhea virus with sperm cells on *in vitro* fertilization of bovine oocytes. **Veterinary Research Communications**, v.31, p.365-370, 2007.

GIVENS MD, GALIK PK, RIDDELL KV, BROCK KV, STRINGFELLOW DA. Potential for noncytopathic strains of bovine viral diarrhea virus associate with IVF embryos and remain infective. *Theriogenology*, v.53, p.319, 2000.

GIVENS MD, STRINGFELLOW DA, RIDDELL KP, GALIK PK, CARSON RL, RIDDELL MG, *ET AL*. Normal calves produced after transfer of *in vitro* fertilized embryos cultured with an antiviral compound. **Theriogenology** v.65, p.344–55, 2006.

GIVENS, M.D.; RIDDELL, K.P.; EDMONDSON, M.A.; WALZ, P.H.; GARD, J.A.; ZHANG, Y.; GALIK, P.K.; BRODERSEN, B.W.; CARSON, R.L.; STRINGEFELLOW, D.A. Epidemiology of prolonged testicular infections with bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Microbiology**, v.3, 2009. [epub ahead of print]

GONÇALVES, R.F.; D'ANGELO, M.; GALUPPO, A.G. Uso da microscopia eletrônica de varredura na avaliação morfológica de células epiteliais de oviduto bovino *in vitro*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.64, p.150, 1997. Suplemento. Trabalho apresentado à 10ª Reunião Anual do Instituto Biológico, São Paulo, 1997 – Resumo n.60.

GONÇALVES, P.B.D.; VISINTIN, J.A.; OLIVEIRA, M.A.L.; MONTAGNER, M.M.; COSTA, L.F.S. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002. p.195-196.

GONG Y, TROWBRIDGE R, MACKINTOSH S, SHANNON A, GOWANS EJ. A stable cell line with a proportion of cells persistently infected with bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Microbiology**, v.63, p.117-124, 1998

GUERIN, B.; NIBART, M.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P. Sanitary risks related to embryo transfer in domestic species. **Theriogenology**, v.47, p.33-42, 1997.

HARE WCD. Diseases transmissible by semen and embryo transfer techniques. **OIE Technical Bulletin** v.4, p.1–117, 1985.

HEATH GS, KING DP, TURNER JLE, WAKELEY PR, BANKS M. Use of an internal standard in a TaqMan nested reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Microbiology**, v.96, p.357–366, 2003

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

KAFI, M.; MCGOWAN, M.R.; KIRKLAND, P.D. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes and *in vitro* culture of presumptive zygotes in the presence of bovine pestivirus. **Animal Reproduction Science**, v.71, p.169-179, 2002.

KIRKLAND, P.D.; MACKINTOSH, S.G.; MOYLE, A. The outcome of widespread use of semen from a bull persistently infected with pestivirus. **Veterinary Record**, v.135, p.527-529, 1994.

KIRKLAND, P.D.; MCGOWAN, M.R.; MACKINTOSH, S.G.; MOYLE, A. Insemination of cattle with semen from a bull transiently infected with pestivirus. **Veterinary Record**, v.140, p.124-127, 1997.

KRAMPSA JA, VAN MAANENB C, VAN DE WETERINGA G, STIENSTRAA G, QUAKA S, BRINKHOFB J, RÛNSHOLTC L, NYLIND B. A simple, rapid and reliable enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) specific antibodies in cattle serum, plasma and bulk milk. **Veterinary Microbiology**, v.64, p.135-144, 1999

KRISHER, R.L.; BAVISTER, B.D. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. **Theriogenology**, v.49, p.103-114, 1998.

LAUREYNS J, RIBBENS S, KRUIF A. Control of bovine virus diarrhoea at the herd level: reducing the risk of false negatives in the detection of persistently infected cattle. **Veterinary Journal**, doi:10.1016/j.tvjl.2008.11.014, 2009

MCGOWAN, M.R.; KIRKLAND, P.D. Early reproductive loss due to bovine pestivirus infection. **British Veterinary Journal**, v.151, p.263-270, 1995.

MISHRA N, MATHAPATI BS, RAJUKUMAR K, NEMA RK, BEHERA SP, DUBEY SC. Molecular characterization of RNA and protein synthesis during a one-step growth

curve of bovine viral diarrhoea virus in ovine (SFT-R) cells. **Veterinary Science**, v.89, p.130–132, 2010

OLAFSON P, MACCALLUM AD, FOX FH. An apparently new transmissible disease of cattle. **Cornell Veterinary**, v.36, p.205-213, 1946

POLLARD, J.W.; LEIBO, S.P. Comparative cryobiology of *in vitro* and in vivo derived bovine embryos. **Theriogenology**, v.39, p.287-293, 1993.

RADOSTITS OM, LITTLEJOHNS IR. New concepts in the pathogenesis, diagnosis and control of diseases caused by the bovine viral diarrhoea virus. **Canadian Veterinary Journal**, v.29, p.513-528, 1988

RIDPATH J e FLORES EF. Flaviviridae. In: Flores EF. (org) **Virologia Veterinária**. Editora UFSM, Santa Maria, Brasil, 2007, p.563-591, cap22

RIDPATH JF, BOLIN SR, DUBOVI EJ. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. **Virology**, v.205, p.66-74, 1994

SILVA N, SOLANA A, CASTRO JM. Evaluation of the effects of different trypsin treatments on semen quality after BHV-1 inactivation, and a comparison of the results before and after freezing, assessed by a computer image analyzer. **Animal Reproduction Science** v.54, p.227–35, 1999.

SINGH, E. L.; THOMAS, F. C.; HARE, W. C. D.; EAGLESOME, M. D.; BIELANSKI, A. Non-transmission of infectious bovine rinotracheitis infectious pustular vulvovaginitis virus following trypsin treatment of exposed embryos. **Theriogenology**, v.20, n.2, p. 169-176, 1983.

STEPTOE, P. C.; EDWARDS, R. G. birth after the preimplantation of a human embryo. **Lancet**, v.2, p.366, 1978.

STRINGFELLOW DA, RIDDELL KP, GALIK PK, DAMIANI P, WRIGH JC. Quality controls for bovine viral diarrhoea virus-free IVF embryos. **Theriogenology**; v.51, p.275, 1999 [Abstract].

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

STRINGFELLOW, D.A.; GIVENS, M.D.; WALDROP, J.G. Biosecurity issues associated with current and emerging embryo technologies. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, p.93-102, 2004.

TOYODA, Y.; CHANG, M.C. Fertilization of rat eggs in vitro by epididimal spermatozoa and the development of eggs following transfer. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.31, p. 9-22, 1974.

TSUBOI, T., BIELANSKI, A. Resistance of immature bovine oocytes to non-cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus in vitro. **Veterinary Records**, v.156, p.546-548, 2005.

TSUBOI, T., IMADA, T. Susceptibility of bovine naked 2- and 4-cell embryos and hatched blastocysts produced in vitro to infection with noncytopathogenic bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Veterinary Medicine**, v.61, p.943-945, 1999.

TSUBOI, T., IMADA, T. Bovine viral diarrhoea virus replication in bovine follicular epithelial cells derived from persistently infected heifers. **Journal of Veterinary Science**, v.60, p.569-572, 1998.

TSUBOI T, IMADA K, KATSUDA K, EGUCHI M. Prevention of bovine viral diarrhoea virus transmission during *in vitro* fertilization including oocytes with follicular epithelial cells from a persistently infected heifer. **Theriogenology**, v.49, p.253, 1988 [Abstract]

VAN SOOM, A.; NAUWYNCK, H.; WRATHALL, A. Scientific foundations for the epidemiological safety of embryo transfer. In : STRINGFELLOW, D.A.; GIVENS, M.D. (Ed). **Manual of the International Embryo Transfer Society**, 4th ed. IETS, Champaign, IL. 2010. p.13-40.

VAN SOON, A.; VAN VLAENDEREM, I.; MAHMODZADEH, A.R.; DELEUYER, H.; KRUIF, A. Comparison rate of *in vitro* fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. **Theriogenology**, v.38, p.905-915, 1992.

VIANA, J.H.M.; SIQUEIRA, L.G.B.; PALHÃO, M.P.; CAMARGO, L.S.A. Use of *in vitro* fertilization technique in the last decade and its effect on Brazilian embryo industry and animal production. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.38, p.661-674, 2010.

VILCEK, S.; HERRING, A.J.; HERRING, J.A.; NETTLETON, P.F.; LOWINGS, J.P.; PATON, D.J. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. **Archives of Virology**, v.136, p.309–323, 1994.

WALDROP, J.G.; STRINGFELLOW, D.A.; RIDDELL, K.P.; GALIK, P.K.; RIDDELL, M.G.; GIVENS, M.D.; CARSON, R.L.; BROCK, K.V. Different strains of noncytopathic bovine viral diarrhea virus (BVDV) vary in their affinity for in vivo-derived bovine embryos. **Theriogenology**, v.62, p.45-55, 2009.

WALZ, P.H.; GIVENS, M.D.; COCHRAN, A.; NAVARRE, C.B. Effect of dexamethasone administration on bulls with a localized testicular infection with bovine viral diarrhea virus. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v.72, p.56-62, 2008.

WHEELER, M.B.; MONACO, E.; BIONAZ, M.; TETSUYA, T. The role of existing and emergin biotechnologies for livestock production: toward holism. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.38, p.463-484, 2010.

WHITTINGHAM, D.G. Fertilization of mouse eggs in vitro. **Nature**, v.220, p.592-593, 1968.

WRATHALL, A.E.; SIMMONS, H.A.; VAN SOOM, A. Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilization with virus-infected semen. **Theriogenology**, v.65, p.247-274, 2006.

WRATHALL, A.; SUTMÖLLER, P. Potencial da transferência de embriões para controlar a transmissão de doenças. In: STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. (Ed.). **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3. ed. Jaboticabal: SBTE. 1998. p. 17-46.

WRIGHT, R.W.; ELLINGTON, J. Morphological and physiological differences between in vivo and *in vitro* produced preimplantation embryos from livestock species. **Theriogenology**, v.44, p.1167-1189, 1995.

APÊNDICES

APÊNDICE A: CLASSIFICAÇÃO DE PATÓGENOS QUANTO AO SEU RISCO DE TRANSMISSÃO TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

Tabela 1: Risco de transmissão de patógenos por transferência de embriões.

| Categoria | Definição | Doenças ou Agentes |
|-----------|---|--|
| 1 | Doenças ou agentes da doença para a qual foi levantada suficiente evidência para mostrar que o risco de transmissão é desprezível, desde que os embriões sejam manipulados adequadamente entre a coleta e a transferência | Leucose bovina enzoótica, Febre aftosa (gado), Bluetongue – língua azul (gado), <i>Brucella abortus</i> (gado), Rinotraqueíte infecciosa bovina (exigido tratamento com tripsina), Pseudorraiva (suínos – exigido tratamento com tripsina) |
| 2 | Doenças para as quais foi acumulada evidência substancial para mostrar que o risco de transmissão é desprezível, desde que os embriões sejam manipulados adequadamente entre a coleta e a transferência, mas para as quais são requeridas transferências adicionais, para verificação dos dados existentes | Cólera dos leitões – Hog cholera (Peste suína clássica) |
| 3 | Doenças ou agentes de doenças para os quais a evidência preliminar indica que o risco de transmissão é desprezível se os embriões forem manipulados adequadamente entre a coleta e a transferência, para os quais dados experimentais <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> são necessários para consubstanciar os achados preliminares. | Rinderpest (gado), Diarréia viral bovina a vírus , Bluetongue – língua azul (ovelhas), <i>Campylobacter fetus</i> (ovelhas), Febre aftosa (suíno, ovelhas e cabras), Doença vesicular dos suínos, Peste suína africana, “Scrapie” (ovinos), <i>Haemophilus somnus</i> |

Continuação da Tabela 1

| Categoria | Definição | Doenças ou Agentes |
|-----------|--|---|
| 4 | Doenças ou agentes de doenças sobre os quais foi realizado um trabalho preliminar ou está em progresso | Akabane (gado), Estomatite vesicular (gado e suíno), <i>Chlamydia psittaci</i> (gado), Ureaplasma – <i>Mycoplasma spp</i> (gado e caprinos), Maedi-visna (ovelhas), Adenomatose pulmonar (ovelhas), “Scrapie” (ovelhas), Bluetongue – língua azul (ovelhas), Artrite encefalite caprina, Parvovírus (suíno), Enterovírus (gado e suíno), Leptospirose (suíno), Herpesvirus bovino-4, <i>Mycobacterium paratuberculosis</i> (gado), <i>Brucella ovis</i> (ovelhas), Doença da fronteira – border disease (ovelhas), Vírus da parainfluenza-3 (gado), Agente da encefalopatia espongiforme bovina |

Fonte: Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões, Apêndice C, p.171, 1998.

APÊNDICE B: PARÂMETROS UTILIZADOS PARA SELEÇÃO DOS COCs

Tabela 1: Classificação morfológica dos COCs.

| Categoria | Características |
|------------------|---|
| I | oócitos com citoplasma homogêneo e às vezes granuloso, envolto por 3 ou + camadas de células do cúmulus (compactas). |
| II | oócitos com menos que 3 camadas de células do cúmulus ou desnudos em parte, com citoplasma homogêneo ou às vezes granulosa. |
| III | oócitos apenas com as células da coroa radiata |
| IV | oócitos desnudos |
| Degenerados | degenerados ou com cúmulus escuro e degenerado |

Fonte: GONÇALVES *et al.* (2002).

APÊNDICE C: FOTOS DOS RESULTADOS APRESENTADOS NOS ARTIGOS 1 E

2

Artigo 1 – Efficiency evaluation of sperm separatory techniques for bovine viral diarrhoea virus removal from frozen bovine semen samples

- Experimento 1: Teste do Cometa

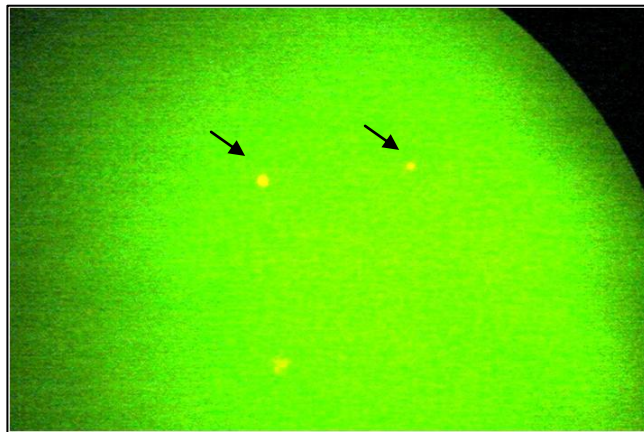


Figura 7: Foto de espermatozóides classificados como cometa nível 0 (seta). (x1000)

- Experimento 3: Blastocistos bovinos produzidos a partir de amostras de sêmen infectadas com o BVDV e processadas com o processamento seminal combinado

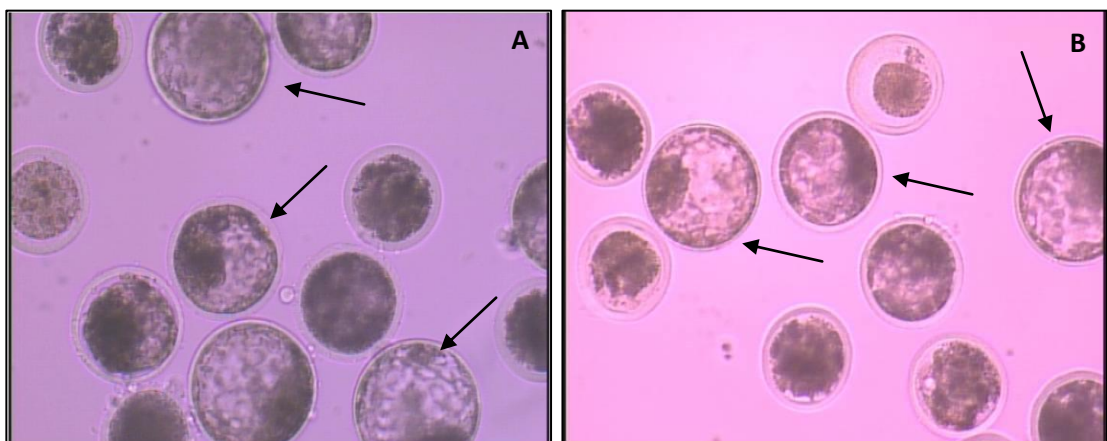


Figura 8: Blastocistos (dia 7, setas) do grupo controle – Swim up (A) e formados a partir de amostras de sêmen infectadas com o BVDV e processadas com o processamento seminal combinado (B) (x400)

Artigo 2: Bovine *in vitro* nuclear maturation and blastocyst development rates of cumuli-oophorus complexes experimentally infected with BVDV

- Experimento 1: Medida dos COCs

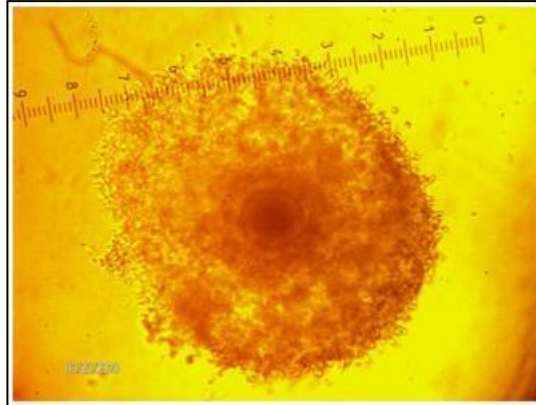


Figura 9: Imagem mostrando o micrometro utilizado para a medida dos COCs (x100)

- Experimento 2: Maturação *in vitro* e Blastocistos produzidos

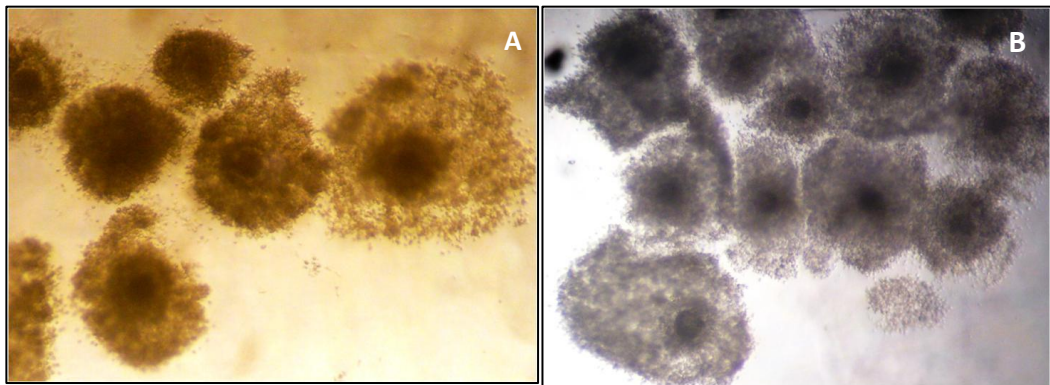


Figura 10: Ausência de efeito citopático visível nos COCs após 24h de MIV tanto no grupo controle (A) quanto no grupo infectado com BVDV (B) (x45)

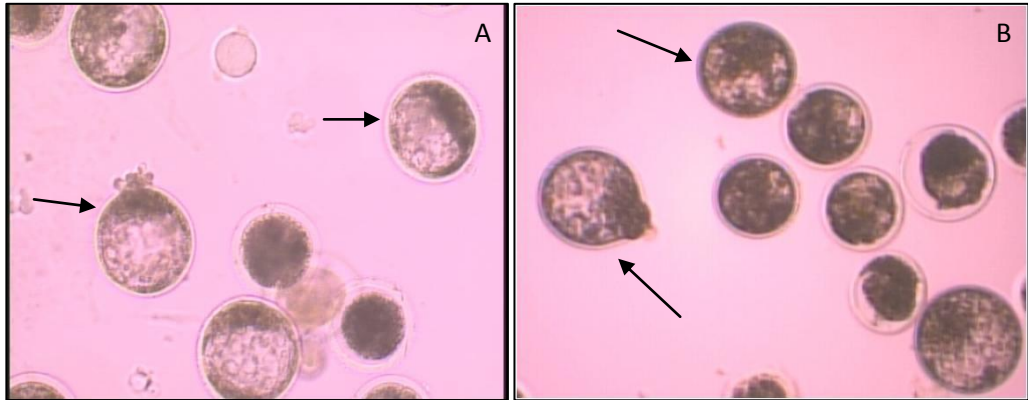


Figura 11: Blastocistos (7 dias, setas) do grupo controle (A) e após infecção pelo BVDV na MIV (B) (x400)

- Experimento 3: Cultivo de células do cumulus pós MIV

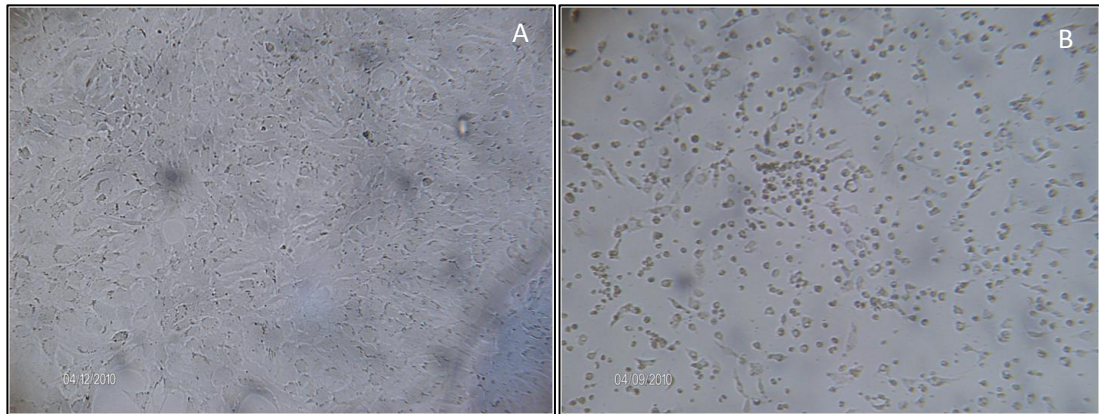


Figura 12: Cultivo de células do cumulus (48h) do grupo controle (A) e efeito citopático no grupo infectado pelo BVDV (B) durante a MIV (x100)

APENDICE D: RESUMOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

XXII RAIB - Reunião Anual Do Instituto Biológico**9 a 12 de novembro de 2009**UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DO COMETA PARA AVALIAÇÃO DA AÇÃO
CLASTOGÊNICA EM ESPERMATOZÓIDES BOVINOS PÓS-PROCESSAMENTO(Clastogenic action evaluation in bovine semen after separatory techniques by
COMETE assay)***¹GALUPPO, A.G.; *²PAVÃO, D.L.; **²BATISTA, M.L.; ²ALVES, M.F;
¹RODRIGUES, J.L.; ²D'ANGELO, M.**

¹Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9090, CEP91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil. Email: andreagalupo@yahoo.com.br; ²Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, Instituto Biológico, São Paulo, SP, Brasil.

Com o crescente uso das técnicas de reprodução animal assistida torna-se importante determinar se a manipulação de gametas pode causar alterações no material genético dessas células. O objetivo desse trabalho foi avaliar se as técnicas de processamento seminal causam dano no DNA dos espermatozóides bovinos. As técnicas avaliadas foram o gradiente de Percoll, o Swim up, e as duas técnicas combinadas. A análise estatística foi feita pelo teste do qui-quadrado. O Percoll foi preparado com 0.5mL da solução 90% e 0,5mL da solução 45%, centrifugado por 10min à 1200rpm. O pellet foi lavado em meio de cultura. O Swim-up foi preparado com 1mL de meio de cultura e 200µL de sêmen, mantido à 37°C, a 45° por 1h. O sobrenadante foi centrifugado por 10min à 1200rpm para recuperação dos espermatozóides. O processamento combinado foi realizado inicialmente com o Swim up, e os espermatozóides obtidos foram submetidos ao Percoll, como descrito anteriormente. Ao final o pellet de cada processamento foi avaliado quanto à concentração e submetido ao teste do COMETA. Para o ensaio do COMETA foram preparadas lâminas com agarose "normal melting", onde foram depositadas as amostras diluídas em agarose "low melting". As lâminas

foram tratadas com solução de lise (2h) e submetidas à eletroforese (30min a 4°C), coradas com 50µL de brometo de etídeo e examinadas sob microscópio de fluorescência. A avaliação nuclear foi realizada pela categoria de dano (N0 sem dano à N4 dano intenso). Para o processamento com Percoll foi obtida em média uma concentração de 22,6 milhões epz/mL ($\pm 4,6$), para o grupo processado por Swim up 14,4 milhões epz/mL ($\pm 6,3$), e para a combinação das técnicas 17 milhões epz/mL ($\pm 6,8$). Não houve diferença estatística entre as concentrações. Em relação aos resultados do ensaio do COMETA para o grupo processado com Percoll foram obtidos 95,3%N0 e 4,7%N1. Para o grupo submetido ao Swim up foram obtidos 98,6%N0 e 1,4%N1, para o processamento combinado 94%N0, 4,5%N1 e 1,5%N2. Foi também analisada uma amostra de sêmen denominada “in natura”, a qual não sofreu nenhum tipo de processamento, e foram encontrados 96%N0 e 4%N1. Não foi verificada diferença estatística significativa entre os grupos, com exceção do grupo de processamento combinado que foi o único a apresentar COMETAS N2. Considerando os resultados pode-se concluir que as técnicas disponíveis para processamento seminal não causam danos significativos no núcleo das células espermáticas, mesmo quando utilizadas em conjunto, podendo ser utilizadas sem prejuízo aos resultados das técnicas de reprodução assistida.

Reproduction, Fertility and Development, v.22(1): 292, 2010

Proceedings of the Annual Conference of the International Embryo Transfer Society -9-12 January 2010

ABSTRACT 270

EFFICIENCY OF SPERM SEPARATOR TECHNIQUES FOR BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS REMOVAL FROM FROZEN BOVINE SEMEN SAMPLES

A. G. Galuppo^A, L. L. Almeida^B, B. Meyrer^B, N. S. Arruda^A, O. Sicco^A, L. S. Arruda^A, D. S. Silva^A, Z. M. G. Cheuiche^A, C.W. Canal^B, and J. L. Rodrigues^A

^ALaboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução, Faculdade de Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil; ^BLaboratório de

Virologia, Faculdade de Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Porto Alegre, RS, Brazil

It has been recognized that systemic and local infections of the reproductive tract, as well as the inadvertent introduction of microorganisms during processing, may potentially contribute to the contamination of semen (Bielanski 2007 *Theriogenology* 68, 1–22). A number of viral pathogens have been identified in association with semen, such as bovine viral diarrhoea virus (BVDV). The aim of the study was evaluate the capacity of sperm separation procedures Percoll gradient and swim-up, as proposed by Bielanski *et al.* (1992 *Reprod. Domest. Anim.* 27, 303–306) and also a combination of swim-up and Percoll, to reduce or eliminate BVDV from experimentally infected semen samples. We used frozen semen straws (0.5 mL) and the virus sample was cytopathic type BVDV (106.68 TCID₅₀ mL⁻¹). The experimental infection was performed immediately after semen thawing in a 1 : 1 volume proportion semen/viral suspension. The experimental groups were Percoll control (Pc); swim-up control (Sc); Swim up followed by Percoll control (SPc); Percoll and virus (Pv); swim-up and virus (Sv); and swim-up followed by a Percoll and virus (SPv). The Percoll gradient was prepared with 0.5mL 90% under 0.5 mL 45% Percoll solution, centrifuged at 200×g for 10 min; the pellet was collected and washed with Sperm-TALP. The swim-up was prepared with 0.3mL of semen under 1mL of Sperm-TALP. After 60 min of incubation at 38.5°C, 0.8 mL of the supernatant was collected and centrifuged at 200×g for 10 min. The combination of techniques was prepared first with swim-up, and then the swim-up pellet was submitted to a Percoll, as previous described. The final pellet of each separation procedure was evaluated for sperm motility, sperm concentration, and virus isolation in cell culture. We used Student's *t*-test for statistical analysis (*P* <0.05). Preliminary results showed no significant statistical difference between groups of the same sperm separation techniques when analyzing sperm motility (Pc=90%; Sc=90%; SPc=90%; Pv=80%; Sv=90%, SPv=90%) and sperm concentration (million mL⁻¹; Pc=28; Sc=11; SPc=3; Pv=18, Sv=11, SPv=4). The virus isolation in cell culture presented the following results (3 replicates): Pv=10^{3.92a}, 10^{3.8b}, 10^{2.46c} TCID₅₀ mL⁻¹; Sv=10^{3.62}, 10^{3.13}, 10² TCID₅₀ mL⁻¹; and SPv=undetected, undetected, 10^{2.92f} TCID₅₀ mL⁻¹ (different letters for means indicate statistical significance). The control groups of all techniques presented a cytotoxic effect probably because of the contact with sperm, Percoll, and sperm-TALP residues in the analyzed sample. Because of those cytotoxic

effects in the cell culture, molecular biology techniques such as RT-PCR will be used as a complementary test to confirm the presence of BVDV in the samples. A large number of repetitions will be performed for a better statistical analysis. However, these preliminary results showed that the combination of swim-up followed by Percoll promoted a significant reduction in the number of viral particles in the semen samples compared with Percoll alone, considering that in 2 of the 3 repetitions it was not possible to detect the virus in cell culture. CNPq, CAPES.

**XXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE)
– 19 a 21 de agosto de 2010**

RESUMO 171 (PAG 393)

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO BVDV NA EXPANSÃO DAS CÉLULAS DO
CUMULUS DE OÓCITOS BOVINOS DURANTE A MIV**

Galuppo, A.G.^{1*}; Beuter Jr., N.²; Arruda, N.S.¹; Silva, D.S.¹; Cheuiche, Z.¹; Arruda, L.S.¹; Sicco, O.P.¹; Ruggeri, R.R.¹; Marques, L.S.¹; Canal, C.W.²; Rodrigues, J.L.¹

¹Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução; ²Laboratório de Virologia da Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS - Brasil; *Bolsista CNPq, E-mail: andreagalupo@yahoo.com.br

O vírus da diarréia viral bovina (BVDV) está amplamente distribuído entre a população mundial de bovinos e deve-se considerar que fluídos, gametas e células somáticas de animais infectados podem apresentar-se contaminadas com o vírus (Gard *et al.*, 2007 Theriogenology 434-442). Tendo isso em vista, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do BVDV na expansão das células do cumulus de oócitos bovinos maturados *in vitro*. Ovários bovinos foram coletados após o abate e lavados em solução salina tamponada modificada (PBSm). Os complexos cumuli-oócito (COCs) foram aspirados dos folículos ovarianos que possuíam entre 2-8 mm de diâmetro. Foram selecionados aqueles COCs com múltiplas camadas de células compactas, os quais foram separados em dois grupos, controle (C) e experimentalmente infectado durante o período de maturação (V). O grupo V recebeu 10 µL da suspensão do BVDV (NADL, título 10^{5,8}

TCID₅₀/mL), e o grupo C 10 µL de meio de cultura (DMEM). Ambos os grupos foram maturados em gotas de 100 µL de meio de maturação *in vitro* (MIV), com cerca de 15 oócitos por gota, mantidos a 38,5°C, 5% CO₂ em ar com 100% de umidade por 24 h. Após a MIV, para avaliação da expansão das células do cumulus (CC), os diâmetros máximo (d_{max}) e mínimo (d_{min}) dos COCs foram medidos (100X) com o auxílio de um micrometro ocular acoplado em um microscópio invertido (Carl Zeiss, Axiovert 135, Germany), e sua área foi estimada (COC área_{mm}² = $\pi \times d_{min} \times d_{max} / 4 \times 10^6$). Na seqüência, as CC foram mecanicamente removidas para observação do corpúsculo polar (45x) para cálculo da taxa de maturação (tMIV). As CC removidas foram mantidas em cultivo (37,5°C, 5% CO₂) para verificação da presença de efeito citopático (ECP), a fim de confirmar a infecção dessas células pelo BVDV. Os dados foram analisados pela comparação das médias das áreas (µ) dos grupos C e V pelo teste de hipóteses (H1- µ_C=µ_V e H2- µ_C≠µ_V) de acordo com a distribuição T-Student, e cálculo da variância (s²). Valores obtidos de t>1,96 foram considerados significativos, com 95% de confiança. No total foram feitas 8 repetições, e medidos 404 oócitos (n_C=201, n_V=203). Para o grupo C a µ_C foi de 0,32 mm² com s²=0,19 e para o grupo V µ_V foi de 0,36 mm² com s²=0,35. Considerando o valor de T obtido (t=2,84) é possível afirmar que os dois grupos possuem comportamentos diferentes, onde o grupo C, apesar de possuir menor µ (µ_C=0,32mm²) se apresenta mais homogêneo (s²=0,19) quanto à expansão das CC do que o grupo V (µ_V=0,36 mm²; s²=0,35). A tMIV para o grupo C foi de 68,32% (69/101) e para o grupo V 48,35% (44/91). Foi verificado ECP nas CC após 48h de cultivo, confirmando a infecção dessas células pelo BVDV. Portanto, os dados indicam que o BVDV durante o período de MIV infecta as CC e altera seu padrão de expansão, o que provavelmente está relacionado com a redução na taxa de maturação.

**XXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE) –
18 a 20 de agosto de 2011**

RESUMO 238 (PAG449)

DETECÇÃO DE BVDV PELA REACÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE EM
AMOSTRAS DE LÍQUIDO FOLICULAR BOVINO

Andrea Giannotti Galuppo¹; Matheus Nunes Weber²; Renata Fontoura Budaszewski³;
Angela Oliveira Corbellini⁴; Lis Santos Marques⁵; José Luis Rigo Rodrigues⁶; Claudio
W Canal⁷

^{1,2,3,4,5,6,7} UFRGS, PORTO ALEGRE, RS, BRASIL

Devido a sua ampla distribuição entre as populações de bovinos, e também, a sua associação com células e fluidos de animais infectados, o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) representa um problema em potencial para a aplicação das técnicas de reprodução animal (Gard *et al.* Theriogenology 68: 434-442, 2007). A utilização de ovários e ovidutos colhidos em abatedouros provenientes de animais com estado sanitário desconhecido já é uma prática estabelecida na produção de embriões *in vitro*. O objetivo desse trabalho foi detectar o BVDV através do uso da RT-PCR em amostras de fluido folicular (FF) obtidas em processo de produção de embriões *in vitro* bovinos. As coletas foram realizadas no período de fevereiro a dezembro de 2010. Os ovários bovinos foram coletados após abate e lavados em solução salina tamponada modificada (PBSm). O FF foi aspirado dos folículos ovarianos que possuíam entre 2-8 mm de diâmetro e uma amostra de 2 mL de cada pool de FF foi armazenada a -80°C até o momento do uso. No total foram analisados 22 pools de FF, provenientes de 1844 animais (variando de 43-136 animais/pool). O RNA das amostras foi extraído utilizando-se o reagente TRIzol® LS (Invitrogen, CA, EUA) segundo orientação do fabricante. O cDNA foi sintetizado utilizando-se o kit SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen, CA, EUA) conforme orientação do fabricante. A PCR foi realizada utilizando os iniciadores 324 e 326 (Vilcek *et al.* Archives of Virology 136: 309–323, 1994). A separação dos produtos de amplificação foi realizada por eletroforese em gel de agarose 2% corado com Blue green loading dye I (LGC Biotecnologia, Brasil). A visualização dos produtos de amplificação foi realizada sob luz UV. Foram obtidos 3 pools de FF positivos para BVDV (13,63%). É conhecido que a presença de BVDV em sistemas de cultivo é prejudicial, causando redução nas taxas de maturação, fecundação e/ou desenvolvimento. Tendo isto em vista, pode-se considerar o uso da PCR para diagnóstico de BVDV em fluido folicular como uma importante ferramenta para auxiliar na garantia de qualidade da produção *in vitro* de embriões.