

## ESTUDO MORFOLÓGICO DE EMBRIÕES BOVINOS FERTILIZADOS *IN VITRO* EXPOSTOS EXPERIMENTALMENTE À *NEOSPORA CANINUM*

**M. D'Angelo, A.G. Galuppo, N.M.C. Zerio, G.M. Melo, E.M. Pituco, L.H. Okuda**

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

### RESUMO

Durante a última década, a infecção por *Neospora caninum* tem emergido como uma importante doença reprodutiva em bovinos e, em vários países, tem sido diagnosticada como principal causa de aborto. Tendo em vista a importância dessa doença esse trabalho teve como objetivo avaliar morfológicamente embriões bovinos produzidos *in vitro* infectados experimentalmente por *N. caninum*. Os embriões foram produzidos *in vitro* a partir de oócitos colhidos de ovários de bovinos provenientes de abatedouro. Foram separados em grupo controle, mantido somente com meio HTF e grupo infectado com 10 mL de *N. caninum*. Os embriões foram avaliados após 48 e 96h em microscópio óptico invertido. Os embriões do grupo controle não apresentaram alterações morfológicas. No grupo infectado foi verificado o aparecimento de grânulos escuros no citoplasma, bloqueio da clivagem e ruptura da zona pelúcida (ZP). Em alguns casos, observou-se estruturas semelhantes a taquizoitos de *N. caninum* no interior da ZP. Esses resultados sugerem que, de alguma maneira há a interação do patógeno com o embrião, talvez em um processo inicial de ligação com a ZP, promovendo posteriormente sua entrada. Esses estudos tornam-se relevantes quando se leva em consideração a possível transmissão da *N. caninum* por técnicas concepcionais artificiais.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Neospora caninum*, FIV, embriões.

### ABSTRACT

MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF *IN VITRO* FERTILIZED BOVINE EMBRYOS EXPERIMENTALLY EXPOSED TO *NEOSPORA CANINUM*. During the last ten years the *Neospora caninum* infection have emerged as an important reproductive disease in cattle, and in several countries has been the main cause of abortion. Considering the importance of the disease our aim was to perform a morphological analysis of *in vitro* fertilized bovine embryos experimentally exposed to *Neospora caninum*. The embryos were produced from oocytes harvested from ovaries collected in slaughterhouse. They were divided in 2 groups: control, kept with HTF medium, and infected with 10µL of *N. caninum*. The embryos were kept in CO<sub>2</sub> incubator during 48 and 96h. The observations were performed under inverted optical microscope. There were no morphological changes in the control group. The infected group presented cytoplasm with dark granulation, cleavage blockage and pelucide zone (ZP) rupture. In some cases, taquizoite like structures were visualized under the ZP. Those results showed that there is an interaction between the embryo and the pathogen, probably by means of an initial process of binding with the ZP, which eventually allows its entrance under the ZP. The current study becomes relevant when we take into account the possibility of *Neospora caninum* transmission via animal reproduction techniques.

**KEY WORDS:** *Neospora caninum*, IVF, embryos.

### INTRODUÇÃO

Durante a última década, a infecção por *Neospora caninum* tem emergido como uma importante doença reprodutiva em bovinos, e em vários países tem sido diagnosticada como principal causa de aborto (MELO *et al.*, 2004; MAINAR-JAIME *et al.*, 1999). Em relação às

perdas econômicas associadas a neosporose em bovinos, alguns dados são encontrados para os EUA, onde na Califórnia verifica-se que 20% a 43% dos abortos são causados por este protozoário. Na Austrália foi estimado que a neosporose custa para a indústria leiteira cerca de 85 milhões de dólares e para os produtores de gado de corte 25 milhões de dólares

anualmente. Calcula-se que as perdas econômicas diretamente associadas à infecção por *Neospora* sp. sejam de aproximadamente 35 milhões de dólares por ano (DUBEY, 1999).

A multiplicação dos parasitas pode ocorrer em uma grande variedade de hospedeiros intermediários, incluindo bovinos e outros animais de criação (DUBEY, 2003; WOUUDA, 2000). A neosporose tem sido observada tanto em rebanhos de gado de corte quanto de exploração leiteira (ANDERSON *et al.*, 2000). Estudos feitos nos EUA e Inglaterra tem mostrado que existe alta probabilidade (81-100%) de ocorrer transmissão da mãe para o feto durante a gestação (DAVISON *et al.*, 2001). PARÉ *et al.* (1996) demonstraram que a transmissão congênita pode alcançar a taxa de 80% em alguns criatórios. Esses mesmos autores observaram que vacas que apresentavam altos níveis séricos de anticorpos durante o final da prenhez ou um aumento na sua quantidade entre o 3º e o 8º mês de gestação tinham maior probabilidade de transmitirem neosporose congenitamente, quando comparadas com aqueles animais com baixos níveis de anticorpos ou com níveis decrescentes (PARÉ *et al.*, 1996). A maioria dos bezerros infectados congenitamente são clinicamente normais (PARÉ *et al.*, 1996). Esses animais aparentemente saudáveis, porém portadores da doença, são extremamente importantes na manutenção da infecção no rebanho.

Portanto, como aparentemente, a via de transmissão mais importante é a vertical, deve-se ter uma atenção especial em relação às técnicas concepitivas artificiais animais, como a transferência de embriões (TE) e a fecundação *in vitro* (FIV), uma vez que oócitos e embriões podem estar contaminados com o protozoário e ao serem transferidos para receptoras saudáveis podem ser uma fonte de infecção (ANDERSON *et al.*, 2000). Levando em consideração que um constante aprimoramento dos métodos de controle sanitário em técnicas de reprodução animal assistida é necessário, a fim de se prevenir à transmissão de doenças, assim como, evitar transtornos relacionados a prejuízos na produção animal e em saúde pública, esse trabalho teve como objetivo avaliar morfologicamente embriões bovinos produzidos *in vitro* infectados experimentalmente por *N. caninum*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Cultivo celular

As células VERO CCL-81 foram mantidas em meio de cultura Mínimo Essencial de Eagle (MEM) acrescido de soro fetal bovino 10%, e incubadas a 37° C em garrafas de 25 cm<sup>2</sup>.

### Protozoário

Foram utilizados taquizoítos de *N. caninum* (cepa padrão NC-1) fornecida pelo Laboratório de Viroses de Bovídeos do Instituto Biológico. Para o cultivo e manutenção dos taquizoítos de *N. caninum*, utilizou-se células VERO CCL-81, acrescidas de 2% de soro eqüino (SE). A suspensão utilizada para infecção dos embriões foi preparada na concentração de 3 x 10<sup>6</sup> taquizoítos/mL. A suspensão foi utilizada imediatamente após o preparo.

### Manutenção de *Neospora caninum* em cultivo celular

Taquizoítos de *N. caninum* (cepa NC-1) foram mantidos por passagens contínuas em cultura de células VERO CCL-81, no Laboratório de Viroses de Bovídeos do Instituto Biológico de São Paulo.

A inoculação de *N. caninum* foi realizada em uma monocamada pré-formada de células VERO, e os repiques sucessivos foram realizados quando 80% ou mais do tapete celular estava rompido. Com o auxílio de um raspador de células, o restante da monocamada celular foi liberado da garrafa, e todo o seu conteúdo, aproximadamente 8,0 mL, foi homogeneizado por uma agulha de calibre 27G, com a finalidade de romper células que ainda abrigassem taquizoítos. Meio mililitro desse material foi inoculado em uma nova garrafa de células pré-formada acrescidas de 7,5 mL de meio MEM contendo 2% de soro eqüino e 1% de antibiótico (penicilina [0,7 g] + estreptomicina [1,0 g] + gentamicina [1,0 g] + L-glutamina [2,92 g] + anfotericina [0,05 g] + água deionizada [100 mL]). O volume restante foi centrifugado a 1.500 rotações por minuto (rpm) por 10min, o sobrenadante descartado e os taquizoítos ressuspensos em solução salina tamponada (PBS pH 7,2). Em seguida, realizou-se a contagem dos taquizoítos em câmara de Neubauer (hematocitômetro), de modo que mantivesse a concentração de 3 x 10<sup>6</sup> taquizoítos/mL, o qual foi encaminhado para o Laboratório de Biologia Celular para infecção do oócito.

### Produção dos embriões *in vitro*

Para a obtenção dos embriões, os ovários foram colhidos em abatedouros de bovinos e os oócitos obtidos por meio de aspiração folicular em laboratório. Foram maturados *in vitro* em meio de maturação (TCM199, LH, FSH, estradiol, piruvato, SFB e antibiótico) por 24h em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> à 39° C. Ao final dessa etapa os oócitos foram lavados em meio HTF suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) e colocados na placa de fecundação junto com os espermatozoides. A amostra de sêmen foi previamente

descongelada em banho-maria à 35° C/20s, e então processada pela técnica de gradiente descontínuo de Percoll, por 30min/800rpm. A seguir o pellet foi lavado por centrifugação em meio de cultura HTF suplementado com 10% SFB por 10min/800 rpm. A concentração espermática foi ajustada (aproximadamente 100 mil espermatozoides/oócito) e a suspensão de espermatozoides foi incubada por 30min em solução de heparina sódica, antes de ser colocada na placa de fecundação. Após 22-24h da fecundação os oócitos foram desnudados mecanicamente. A avaliação da clivagem foi realizada após 72h.

### Infecção dos embriões *in vitro*

Os embriões foram separados em grupo controle, mantido somente com meio HTF suplementado com 10% SFB e grupo infectado com adição de 10 mL da suspensão de *N. caninum*. Os embriões foram cultivados por 96h, em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> a 39° C e 90% de umidade. A observação de alterações no desenvolvimento embrionário foi realizada por 48 e 96h sob microscópio óptico invertido no aumento de 100X.

### RESULTADOS

Os embriões do grupo controle não apresentaram alterações morfológicas em nenhum dos perí-

odos de incubação (Figs. 1 e 3). Porém, no grupo infectado foi verificado inicialmente, após 48h de infecção, o aparecimento de grânulos escuros no citoplasma, bloqueio da clivagem no estágio de duas células e aumento do espaço perivitelinico (Fig. 2). Após 96h de infecção foi verificada, além das alterações já descritas (Fig. 4), a ruptura da zona pelúcida em alguns embriões, em alguns casos observou-se ainda estruturas semelhantes a taquizoitos de *N. caninum* no interior da zona pelúcida.

### DISCUSSÃO

Existem poucas informações disponíveis a respeito da transmissão da *N. caninum* por técnicas de reprodução animal, como por exemplo, a transferência de embriões (TE), a inseminação artificial e a fertilização *in vitro* (FIV). Entretanto, sabe-se que se essas técnicas forem realizadas corretamente, podem, ao invés de servirem como via de transmissão, oferecerem oportunidade de minimizar o risco de disseminação da neosporose (CAMPERO *et al.*, 2003). CAMPERO *et al.* (2003) trabalharam com TE em receptoras de um rebanho infectado por *N. caninum*, e estas apresentaram sorologia negativa após o procedimento, que minimizou a transmissão vertical do patógeno.

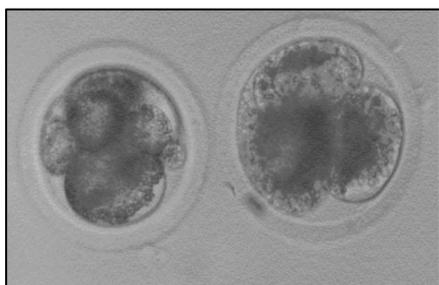


Fig. 1 - Embriões bovinos do grupo controle após 48h de cultura.

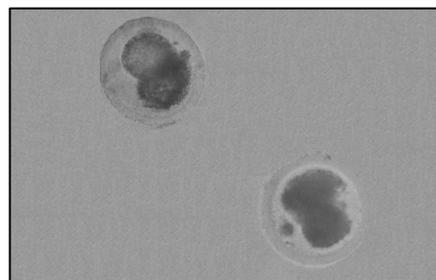


Fig. 2 - Embriões bovinos do grupo infectado após 48h de cultura.

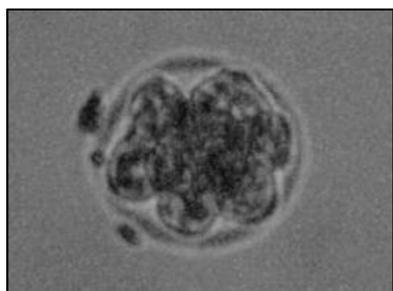


Fig. 3 - Mórula bovina do grupo controle após 96h de cultura.

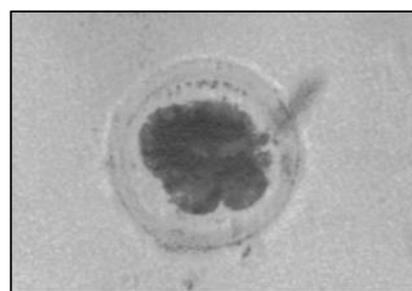


Fig. 4 - Embrião bovino do grupo infectado após 96h de cultura.

A fim de aumentar a segurança do procedimento de TE foram realizados alguns estudos a respeito da eficiência das lavagens seqüenciais e do tratamento com tripsina, padronizados pela International Embryo Transfer Society (IETS), como métodos de remoção e/ou inativação de microrganismos em embriões (STRINGFELLOW, 1998). BIELANSKI *et al.* (2002) verificaram que as lavagens seqüenciais e o tratamento com tripsina foram eficientes na remoção do coccídio. BAILLARGEON *et al.* (2001) encontraram resultados semelhantes trabalhando com transferência de embriões bovinos, colhidos de doadoras com sorologias positiva e negativa para *N. caninum*, e lavados antes da transferência conforme recomendação da International Embryo Transfer Society (IETS). Esses autores demonstraram que as lavagens seqüenciais e o tratamento com tripsina podem ser uma forma eficiente de prevenir a transmissão vertical de *N. caninum*, uma vez que nenhuma receptora sabidamente soronegativa apresentou soroconversão após a TE (BAILLARGEON *et al.*, 2001). Portanto, aparentemente, as técnicas padronizadas pela IETS são eficientes na remoção e/ou inativação do patógeno de embriões bovinos.

Entretanto, esse mesmo consenso não foi obtido quanto à observação de alterações morfológicas em embriões infectados experimentalmente à *N. caninum*. Em um trabalho realizado por BIELANSKI *et al.* (2002) foi avaliada a sensibilidade de embriões bovinos a *N. caninum*. Esses autores não observaram alterações morfológicas nos embriões infectados experimentalmente. Porém, nesse trabalho, após o período de exposição, foram verificados no grupo infectado, o aparecimento de grânulos escuros no citoplasma, bloqueio da clivagem no estágio de duas células e até ruptura da zona pelúcida. Em alguns embriões estruturas semelhantes a taquizoítos de *N. caninum* foram visualizadas no interior da zona pelúcida. Provavelmente esses resultados indicam que, de alguma maneira exista a interação do protozoário com o embrião, talvez em um processo inicial de ligação com a zona pelúcida, posteriormente promovendo a sua entrada, ou que apenas a presença do patógeno no meio seja capaz de promover um ambiente desfavorável ao desenvolvimento dos embriões. Essa última hipótese já foi descrita para infecção de embriões bovinos com *Brucella abortus*, nos quais foram verificadas alterações morfológicas após 18h de infecção, devido a mudanças nas características do meio como pH e disponibilidade de nutrientes (STRINGFELLOW *et al.*, 1986).

Em casos de transferência de embriões e inseminação artificial os animais doadores podem se apresentar aparentemente saudáveis e, entretanto, serem portadores da doença. Sendo assim, estudos a respeito da sensibilidade, com base principalmente em morfologia de gametas e embriões ao patógeno são extremamente importantes como forma de prevenir a disseminação da doença.

## AGRADECIMENTOS

### EMBRIOCARE-CULTILAB.

#### REFERÊNCIAS

- ANDERSON, M.L.; ANDRIANARIVO, A.G.; CONRAD, P.A. Neosporosis in cattle. *Animal Reproduction Science*, v.60-61, p.417-431, 2000.
- BAILLARGEON, P.; FECTEAU, G.; PARE, J.; LAMOTHE, P.; SAUVE, R. Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo Transfer Society as a method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.218, n.11, p.1803-1806, 2001.
- BIELANSKI, A.; ROBINSON, J.; PHIPPS-TODD, B. Effect of *Neospora caninum* on in vitro development of preimplantation stage bovine embryos and adherence to the zona pellucida. *Veterinary Record*, v.150, p.316-318, 2002.
- CAMPERO, C.M.; MOORE, D.P.; LAGOMARSINO, H.; ODEON, A.C.; CASTRO, M.; VISCA, H. Serological status and abortion rate in progeny obtained by natural service or embryo transfer from *Neospora caninum*-seropositive cows. *Journal of Veterinary Medicine Bulletin of Infective Disease Veterinary Public Health*, v.50, n.9, p.453-460, 2003.
- DAVISON, H.C.; GUY, C.S.; MCGARRY, J.W.; GUY, F.; WILLIAMS, D.J.L.; KELLY, D.F.; TREES, A.J. Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. *Research in Veterinary Science*, v.70, p.163-168, 2001.
- DUBEY, J.P. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Veterinary Parasitology*, v.84, p.349-367, 1999.
- DUBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean Journal of Parasitology*, v.41, n.1, p.1-16, 2003.
- MAINAR-JAIME, R.C.; THURMOND, M.C.; BERZAL-HERRANZ, B.; HIETALA, S.K. Seroprevalence of *Neospora caninum* and abortion in dairy cows in northern Spain. *Veterinary Record*, v.145, p.72-75, 1999.
- MELO, C.B. DE; LEITE, R.C.; LOBATO, Z.I.; LEITE, R.C. Infection by *Neospora caninum* associated with bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea virus in cattle from Minas Gerais state, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.119, n.2-3, p.97-105, 2004.
- PARE, J.; THURMOND, M.C.; HIETALA, S.K. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v.60, p.133-139, 1996.
- STRINGFELLOW, D.A.; WOLFE, D.F.; LAUERMAN, L.H.; SPARLING, P.H. Resistance of preimplantation bovine embryos to infection with *B. abortus*. *American Journal of Veterinary Research*, v.47, n.9, p.1924-1927, 1986.
- STRINGFELLOW, D.A. Recomendações para o manuseio sanitário de embriões obtidos in vivo. In: STRINGFELLOW, D.A. & S EIDEL, S.M. (Eds.). *Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões*. Jaboticabal: SBTE, 1998. p.83-96.
- WOUDE, W. Diagnosis and epidemiology of bovine neosporosis: a review. *Veterinary Quarterly*, v.22, p.71-74, 2000.

Recebido em 30/6/05

Aceito em 28/4/06