

EL rol de las biotécnicas de reproducción asistida en la transmisión del virus de la diarrea viral bovina

Role of assisted reproduction biotechniques in the transmission of bovine viral diarrhoea virus

GONZÁLEZ ALTAMIRANDA, EA^{1,3}., KAISER, GG²., ODEÓN, AC³.

¹Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), ²Grupo de Biotecnología de la Reproducción. Área de Producción Animal. INTA EEA Balcarce, ³Grupo de Sanidad Animal. Área de Producción Animal. INTA EEA Balcarce. Ruta 226 Km 73.5 (1420) Balcarce.

RESUMEN

Las biotécnicas de reproducción asistida han adquirido importancia comercial en los últimos años. Asociado a estas técnicas surge el interrogante sobre su rol en la posible transmisión de agentes infecciosos vía semen y ovocitos utilizados como material de partida. La elevada prevalencia y capacidad de causar infecciones reproductivas del virus de la Diarrea Viral Bovina (vDVB) lo ha convertido en un problema potencial en la producción *in vitro* de embriones. La presente revisión aborda los antecedentes previos sobre la temática y muestra resultados propios sobre las vías de infección del virus de la Diarrea Viral Bovina (vDVB) asociadas a las técnicas de producción *in vitro* (PIV) y su impacto en la reproducción bovina. Los resultados obtenidos demuestran alteraciones en el desarrollo folicular ovárico asociadas a infecciones persistentes por vDVB. Estas alteraciones fueron reflejadas en la baja eficiencia obtenida en la fecundación *in vitro* (FIV) como resultado de la interacción temprana entre el virus y la línea germinal del ovario. Por otra parte, se determinó que el vDVB-no citopático (vDVB-ncp) puede atravesar la zona pelúcida de ovocitos bovinos infectados al inicio de la etapa de maduración *in vitro* (MIV). Este hallazgo pone en evidencia la importancia de controles sanitarios en los sistemas de producción *in vitro* basados en la comprensión de los riesgos de transmisión del virus a partir de semen y ovocitos. Asimismo, la asociación del vDVB con gametas fue demostrada cuando la FIV se realizó tanto con ovocitos como con semen de animales persistentemente infectados (PI), donde se observó una disminución en las tasas de división y desarrollo de embriones. La información presentada en este artículo de revisión aporta al conocimiento sobre las implicancias de infecciones por vDVB en los sistemas de PIV y su efecto en el desarrollo embrionario, como así también al impacto de la transmisión de la infección en el ganado bovino mediante técnicas de reproducción asistida.

Palabras clave: (virus de la Diarrea Viral Bovina), (fecundación *in vitro*), (ovocitos), (semen).

Correspondencia e-mail: Erika A. González Altamiranda galtamiranda.erika@inta.gov.ar

Recibido: 01-06-2014

Aceptado: 16-01-2015

SUMMARY

Biotechnical of assisted reproduction have become commercially important in recent years. Associated with these techniques the question about his possible role in the transmission of infectious agents via semen and oocytes used as starting material arises. The high prevalence and ability to cause reproductive infections of the bovine viral diarrhea virus (BVDV) has become a potential problem in the *in vitro* production embryos. This update addresses the previous data on the subject and shows own results on the ways of infection with bovine viral diarrhea (BVDV) associated with *in vitro* production techniques and their impact on the reproduction bovine. The results demonstrate changes in the ovarian follicular development associated with persistent BVDV infection. These changes were reflected in the low efficiency obtained in the *in vitro* fertilization as a result of early interaction between the virus and ovarian germ line. Moreover, it was determined that non-cytopathic BVDV can cross the zona pellucida of bovine oocytes infected at the beginning of the stage of *in vitro* maturation. This finding highlights the importance of to understand fully the risks of transmission of virus via semen and oocytes and appropriate quality assurances are used in *in vitro* production embryos systems (IVP). Likewise, the association of BVDV was demonstrated with gametes when IVF was performed with both types from animals infected persistent, where a decrease was observed in cleavage rates and embryo development. The information obtained in this review article contributes to knowledge about the implications of BVDV infections in IVP systems and its effect on embryonic development, as well as the impact of the transmission of infection in cattle by breeding techniques assisted.

Key words: (Bovine Viral Diarrhea Virus), (*in vitro* fertilization), (oocytes), (semen).

1. Relevancia de las biotécnicas de reproducción asistida en la producción comercial de ganado

En los últimos años el desarrollo y la implementación de biotécnicas de reproducción asistida en la producción animal de ganado bovino han crecido considerablemente⁵⁵. La inseminación artificial (IA) y posteriormente el desarrollo de las tres tecnologías de generación de embriones: obtención *in vivo*, producción *in vitro* y transferencia nuclear de células somáticas^{57, 19}, han representado un cambio potencialmente significativo en la producción comercial de ganado bovino con la posibilidad de incrementar o disminuir la propagación de agentes infecciosos dentro y entre rodeos²⁴.

Teniendo en cuenta el alto nivel de aplicación de las técnicas de reproducción asistida en los últimos años, la difusión de distintos agentes infecciosos vía el material de partida requerido para su desarrollo como

semen, ovocitos o embriones, podría verse facilitada. Surge entonces, con creciente interés, determinar el rol que tiene la aplicación de estas técnicas como factor de riesgo en la transmisión de enfermedades^{7, 4, 3, 11}. Para ello es necesario considerar la combinación de factores propios del agente, el huésped y el ambiente que se combinan para determinar si una enfermedad prevalecerá, o no, en una población de individuos⁵¹. Por lo tanto, cuando estas tecnologías son aplicadas y sus resultados son trasladados a campo, es sumamente relevante la implementación de normas de bioseguridad basadas en la investigación básica y experimental.

2. Aspectos generales del vDVB

Considerando los datos de seroprevalencia del virus de la Diarrea Viral Bovina (vDVB) en nuestro país⁴⁶ y su potencial interacción en la producción *in vitro* (PIV) de embriones bovinos, es de sumo interés conocer los mecanismos

involucrados en la interacción del vDVB con las gametas y embriones resultantes de los procedimientos de fecundación *in vitro* (FIV).

Desde su identificación como un virus emergente en 1946, hasta el presente, los distintos cuadros clínicos - patológicos a partir de los cuales el vDVB ha sido aislado demuestran su capacidad de adaptación al ganado bovino y su compleja patogenicidad¹⁵. Los trastornos digestivos, los cuadros respiratorios y principalmente, los trastornos reproductivos, son la causa más importante de pérdidas económicas causadas por el vDVB. Para ello, el virus utiliza múltiples estrategias para asegurar su supervivencia y propagación exitosa en huéspedes mamíferos; esto incluye la supresión del sistema inmune del hospedador, la transmisión por rutas directas e indirectas y quizá lo más importante, la capacidad de establecer infecciones congénitas que generan animales persistentemente infectados (PI). Los bovinos con esta característica excretan y transmiten el virus en forma mucho más eficiente que animales con infecciones agudas⁶⁶.

El vDVB es un miembro del género pestivirus perteneciente a la familia *Flaviviridae*. Los pestivirus se dividen actualmente en 4 especies, el virus de la peste porcina clásica (vPPC), el virus de la enfermedad de la frontera en ovinos (vEF), y dos genotipos del vDVB (genotipo 1 y genotipo 2)^{47,50}. Debido a que el vDVB es un virus ARN, las mutaciones genéticas ocurren con relativa frecuencia durante su replicación, lo que conlleva a variaciones genéticas, antigénicas y de virulencia entre las distintas cepas. Según su comportamiento y efecto en cultivos celulares, los pestivirus se dividen en dos biotipos: citopáticos, o citopatogénico, (cp) y no-citopáticos, o no-citopatogénico (ncp). Los virus cp inducen muerte celular mediada por apoptosis, ocasionando vacuolización citoplasmática; mientras que los virus ncp no causan cambios visibles en el cultivo celular, manteniendo su aspecto y crecimiento normal. Este comportamiento *in vitro* no implica que los biotipos ncp sean no patogénicos; por el

contrario, además de ser el biotipo predominante en la naturaleza, y capaz de originar infección persistente, también se lo puede asociar a la mayoría de las formas clínicas²¹. El biotipo cp se aísla únicamente de animales con Enfermedad de las Mucosas (una forma letal de presentación de la enfermedad) y se origina por mutación del biotipo ncp, ya sea por depleción de fragmentos del genoma viral, inserción de fragmentos de ARN celular o duplicación y reordenamiento del ARN viral³⁶.

El genoma del vDVB consiste en una sola cadena de ARN, de sentido positivo, de aproximadamente 12.300 bases de longitud en cepas ncp. Las diferencias entre cepas del vDVB no están restringidas a una única región, sino que se encuentran a través de todo el genoma⁴⁹. Sin embargo, algunas regiones son altamente conservadas y se utilizan para la identificación de género, o tienen mayor relevancia biológica entre los genotipos 1 y 2. La región no traducible en el extremo 5' (5'-UTR) es una región altamente conservada y por ende la más comúnmente utilizada para la detección y caracterización de cepas del vDVB. Este segmento genómico, resulta en una región adecuada para su amplificación por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)¹⁴.

2.1. Replicación y propagación

El virus es internalizado por un mecanismo dependiente de Clathrina dentro del lisosoma de la célula^{31,40}. El ARN genómico es liberado dentro del citoplasma de la célula donde la traducción de las proteínas virales tiene lugar. A pesar de los numerosos estudios sobre la biología del vDVB es muy poco lo que se conoce sobre el mecanismo de ensamblaje y posterior liberación de la célula hospedadora. Se ha podido establecer que las partículas virales son ensambladas en el retículo endoplásmico (RE) con modificaciones transcripcionales del tipo glicosilaciones durante el paso de elongación final^{33,42}.

3. El vDVB en los sistemas de producción *in vitro* de embriones bovinos

Los embriones obtenidos *in vivo* o producidos *in vitro* pueden contaminarse durante los diferentes pasos de producción y transferencia por la incorporación de agentes infecciosos a través del semen u ovocitos⁶⁴. Por consiguiente, la implementación de estas tecnologías requiere de un permanente control sanitario, tanto de las gametas como de los embriones resultantes, con el objetivo de reducir y/o eliminar la potencial transmisión de microorganismos patógenos^{53,52}.

Durante los últimos 25 años, numerosos agentes infecciosos del ganado bovino han sido estudiados en el contexto de la producción de embriones *in vivo* y su transferencia, para determinar si las técnicas reproductivas podían tener impacto disminuyendo, o incrementando la propagación de diferentes patógenos^{35, 68, 55}. El vDVB es uno de los 12 agentes infecciosos que afectan la ganadería comercial, incluidos en la "Categoría 3", determinada por la *World Organization for Animal Health (OIE)* 2008. Esta categoría comprende aquellos agentes para los cuales la evidencia preliminar indica bajo riesgo de transmisión, si los embriones son correctamente manipulados, conforme lo dispone el Manual de procedimientos de la *International Embryo Transfer Society (IETS)* (4th Edition *IETS Manual*). Sin embargo, aún se requieren investigaciones adicionales para establecer con precisión los mecanismos de acción y por ende, la posibilidad de que el vDVB pueda ser transmitido mediante tales técnicas reproductivas^{23, 24}.

La amplia distribución del vDVB en la población bovina y su tropismo por el tracto reproductivo, ha recibido la mayor atención por parte de la comunidad científica⁵⁶. Es así que se ha demostrado que la mayoría de los productos de origen animal que se emplean en la PIV de embriones bovinos pueden estar contaminados con vDVB, o con herpesvirus bovino (otro agente capaz de causar infecciones genitales), cuando proceden de animales infectados (Tabla 1), aún en las formas asintomáticas de

infección^{17, 37}. Tal es el caso de los animales persistentemente infectados (PI) con vDVB que además de cursar con una infección asintomática, son los principales reservorios y transmisores de la infección viral³⁷. Cabe destacar que una potencial vía de ingreso de agentes infecciosos en los sistemas de producción *in vitro* son las gametas y los fluidos asociados, como así también en las células somáticas usadas durante la maduración, fecundación o cultivo *in vitro*. Además no dejan de tener relevancia los insumos de origen animal contaminados que se emplean, como suero fetal bovino, seroalbúmina bovina, u hormona folículo estimulante¹⁰.

3.1. El rol de la zona pelúcida

Un aspecto relevante sobre los riesgos de transmisión de patógenos virales es el rol de la zona pelúcida (ZP). La ZP es una cubierta acelular que recubre inicialmente a los ovocitos y de la cual eclosiona el blastocisto alrededor del día 8 luego de la fecundación. En general, se ha considerado que una ZP intacta protege al embrión temprano de agentes infecciosos en el bovino^{61, 63, 65}. Sin embargo, una diferencia fundamental entre los embriones obtenidos *in vivo* y los producidos *in vitro* es la estructura de la misma. Existen evidencias que indican que características a nivel estructural, propias de los embriones producidos *in vitro*, modularían su interacción con el (vDVB) de manera diferente a lo que ocurre en embriones obtenidos *in vivo*⁵⁵. Estas diferencias tendrían efecto tanto en la capacidad como en la persistencia de la infección. Por lo tanto, las distintas etapas de los sistemas de PIV de embriones son puntos críticos para el monitoreo de infecciones virales²⁷. Está establecido que los ovocitos de mamíferos son competentes a nivel transcripcional y traduccional a lo largo de su desarrollo y por lo tanto, podrían favorecer la replicación del vDVB luego de una infección inicial^{18, 51}. Este proceso podría ocurrir durante la maduración de los ovocitos dentro del folículo en desarrollo, ya sea antes de la formación o una vez desarrollada la ZP mediante proyecciones citoplasmáticas de las células del cúmulo, las cuales penetran la ZP

entrando en contacto directo con la membrana del ovocito (oolema)²⁵.

Si bien un factor de resistencia a las infecciones virales de ovocitos bovinos, ha sido atribuido a la barrera física que representa la ZP, algunos antecedentes demuestran que una ZP intacta no garantiza que ovocitos bovinos se encuentren libres del virus luego de la infección con vDVB^{20, 30}.

Debido a estas diferencias en sus propiedades entre embriones obtenidos *in vivo* y producidos *in vitro*, es necesario ampliar las investigaciones en tal sentido⁶². Con el advenimiento de técnicas como, la PIV de embriones bovinos, surgieron nuevos interrogantes sobre el rol de la ZP en la prevención y/o transmisión de agentes infecciosos, de acuerdo a sus propiedades. Es así que algunos virus, que se consideraban de bajo o insignificante riesgo de transmisión mediante la transferencia de embriones *in vivo*, no pudieron ser eliminados mediante los lavados convencionales sugeridos para embriones producidos *in vitro* (Tabla 2)⁵⁵.

3.2. Semen bovino como fuente de infección

Por otra parte, hay evidencias discutibles sobre si la replicación del vDVB puede ocurrir dentro de la gameta masculina como resultado

de una infección gonadal en la vida prenatal en machos persistentemente infectados⁶⁹. Mientras esta situación en bovinos aún es motivo de estudio, trabajos realizados en cerdos salvajes inoculados experimentalmente con el virus de la fiebre porcina clásica (CSFV), un pestivirus estrechamente relacionado con el vDVB, mostraron la localización del ARN viral en tejido testicular mediante hibridación *in situ*, específicamente dentro de espermatogonias, espermatozoides y espermátidas, indicando la capacidad de los espermatozoides para transportar el virus¹². En lo que respecta a la asociación del vDVB con el espermatozoide bovino, continúa siendo tema abierto de investigación si el virus se adhiere a la membrana acrosomal (externa o interna) o es adsorbido a algún receptor de membrana. Mediante la exposición de espermatozoides bovinos a tres diferentes virus envueltos, no patógenos de bovinos (Sendai, Influenza y Forest Semliki), se demostró la fusión de estos con las células espermáticas cuando se realizaron ajustes apropiados de pH. Sin embargo, la fusión no se produjo cuando la envoltura viral fue removida por tratamiento con neuraminidasa, demostrando que los espermatozoides pueden servir como portadores de partículas virales, especialmente de virus envueltos⁴⁵. A pesar de

Tabla 1. Nivel de contaminación reportado en materiales de origen animal provenientes de matadero utilizados en múltiples laboratorios de fecundación *in vitro* de embriones bovinos. Datos recopilados de Stringfellow *et al.*, 2004.

Contaminante	Rango de muestras positivas (%)
Bacteria	13–68
Herpesvirus bovino-1	0–12
Virus Diarrea Viral Bovina	1–12

Tabla 2. Materiales de origen animal de los que se han aislado virus de la Diarrea Viral Bovina y Herpesvirus Bovino-1. Datos recopilados de Stringfellow and Givens (2000b)

Producto animal	Aislamiento de HVBo-1	Aislamiento de vDVB
Ovario	Si	Si
Fluido folicular	Si	Si
Células cúmulus	Si	Si
Ovocito	No	Si
Células tubo uterino	Si	Si
Suero	Si	Si

estos hallazgos, quedan puntos relevantes por dilucidar en los mecanismos de interacción de la partícula viral con el espermatozoide.

El análisis de semen proveniente de toros PI con vDVB ha mostrado títulos virales del orden de $1 \times 10^{4.06}$ TCID/mL en plasma seminal²⁷. Por otra parte, el acondicionamiento de estas muestras para procedimientos de FIV mediante técnicas de separación espermática (Percoll® y Swim up), mostraron que las mismas no son completamente eficientes en la remoción del vDVB^{5, 29, 22}. Estos resultados soportan la teoría que el virus se encuentra asociado a la fracción espermática y no puede ser separado de la misma mediante la aplicación de estas técnicas de preacondicionamiento, lo que permite sugerir que las partículas virales permanecen asociadas al espermatozoide por mecanismos de adhesión y/o adsorción a la membrana acrosomal. Para que alguno de estos mecanismos ocurra, es necesario el reconocimiento entre glicoproteínas de la superficie viral y receptores específicos de la membrana celular⁷⁰. Tal es el caso de las glicoproteínas gp 48 y gp 53, presentes en la envoltura del vDVB, las cuales han sido propuestas como responsables de la fijación del virus a células bovinas^{16, 9}.

En lo que respecta al uso de semen contaminado con vDVB en procedimientos de FIV, hay numerosos reportes que muestran el impacto negativo en las tasas de división y desarrollo embrionario^{5, 40, 39, 29, 2}. Otros autores también han observado que el virus no solo afecta negativamente la eficiencia de los procedimientos de FIV, sino que también postulan que la mortalidad embrionaria temprana podría estar asociada con determinadas cepas virales⁶⁷. Por lo tanto, el semen es una vía de entrada directa del vDVB a los sistemas de producción *in vitro* y pone de relieve el impacto negativo del virus sobre las tasas de división y desarrollo de los embriones resultantes, al menos cuando se tratan de cepas no citopáticas de vDVB. Por consiguiente el uso del mismo, ya sea que provenga de toros PI en servicio natural o de semen congelado de toros PI, conlleva un alto riesgo de transmisión de la infección

viral cuando se implementan las biotécnicas de reproducción asistida que se desarrollan actualmente.

4. Impacto del vDVB durante la implementación de biotécnicas de reproducción asistida

Los bovinos persistentemente infectados como consecuencia de una infección congénita (durante el primer trimestre de gestación) son la principal fuente de infección y reservorio del vDVB en la naturaleza³⁸. Estos animales eliminan constantemente grandes cantidades del virus en secreciones nasales, oculares, saliva, orina, materia fecal, semen y leche. Si bien los bovinos con infecciones agudas también son una fuente de infección; esta es menos eficiente ya que eliminan el virus en periodos más cortos y en menor cantidad que los PI³⁷. La posibilidad de que el semen y/u ovocitos de bovinos PI resulten portadores del virus es un tema relevante en la PIV de embriones, dado que en esta técnica se utilizan ovocitos de hembras enviadas a faena de las que se desconoce su estatus sanitario y generalmente, semen críopreservado. Ello conlleva un alto riesgo de que células y tejidos utilizados en PIV provengan de animales PI y sean portadores del vDVB¹.

Trabajos previos han dilucidado parcialmente los mecanismos de acción del vDVB en la fecundación y en los estadios iniciales del desarrollo embrionario. Sin embargo, estos trabajos han mostrado resultados contradictorios respecto a la infección proveniente del uso de semen^{34, 35, 39} fluido folicular, células de la granulosa y del cúmulus, incluso parte del estroma ovárico contaminados con vDVB⁸. Otros trabajos proponen que el virus puede estar adherido a la zona pelúcida, lo que facilitaría su penetración a los ovocitos durante la fecundación^{34, 35}.

Como se ha planteado, las vías de transmisión del vDVB son múltiples. Si a ello se le agrega la dinámica de los sistemas de PIV de embriones bovinos, se pueden establecer cinco posibles vías de ingreso para el vDVB⁴⁸:

1. ovocitos,
2. semen,
3. células del oviducto o de la granulosa,
4. suero fetal bovino,
5. seroalbúmina bovina.

4.1. Riesgo del uso de material biológico proveniente de animales persistentemente infectados como material de partida en las biotécnicas de reproducción asistida

En la producción comercial de embriones bovinos se utiliza habitualmente semen criopreservado obtenido de un toro donante, proveniente de un centro habilitado de recolección de semen. Esto proporciona una garantía del estatus sanitario general del toro, de la correcta manipulación del semen durante su obtención y del cumplimiento de los niveles de calidad requeridos en cuanto a motilidad y normalidad, asegurándose además, un germoplasma de valor genético superior. Sin embargo, existen casos de infecciones persistentes testiculares, o toros PI que no son detectados por los análisis de rutina de detección del vDVB (ej. ELISA de captura, aislamiento viral, etc) y por lo tanto ingresan en un centro de IA. El análisis del semen por pruebas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), permite la detección de tales casos mejorando la sensibilidad y el tiempo de detección^{48, 29}.

Por otra parte, la principal fuente de ovocitos para los procedimientos de FIV proviene de ovarios de hembras enviadas a faena, sin ningún tipo de control sanitario de los ovarios recolectados. Como resultado cada pool de complejos cúmulo-ovocito CCOs sólo es evaluado desde el punto de vista morfológico según los criterios de calidad asignados por de Loos *et al.*,¹³.

Considerando que tanto en infecciones agudas como persistentes del vDVB se han determinado disfunciones en la actividad ovárica^{31, 20}, se ha establecido que existe una asociación entre el virus y cambios en la dinámica folicular. Estudios *in vitro* e *in vivo* demostraron que las alteraciones, tanto en

el desarrollo folicular como en la maduración del ovocito, resultaron en un incremento significativo en las fallas de fecundación durante los procedimientos de FIV, como también en la muerte embrionaria temprana⁴³. Estudios recientes han demostrado una disminución significativa en la población total de folículos y en el número de folículos primordiales y terciarios en ovarios provenientes de vaquillonas PI, indicando que el desarrollo folicular podría haber sido alterado por la presencia del vDVB. Estas alteraciones fueron, en parte, reflejadas en la baja eficiencia obtenida cuando los ovocitos recuperados de estos ovarios fueron utilizados para FIV mostrando una tendencia menor en las tasas de división y desarrollo de embriones al día 7²⁸.

En conclusión, tanto el semen comercial contaminado con vDVB, como ovocitos de ovarios provenientes de vacas enviadas a faena, representan los primeros puntos de entrada de la infección en los sistemas de PIV⁴⁸.

5. Conclusiones y Perspectivas

Diferentes autores han informado la facilidad con la cual los sistemas de producción *in vitro* de embriones pueden contaminarse con el vDVB y han expresado su preocupación por los riesgos de transmisión de la enfermedad, enfatizando la necesidad de una vigilancia constante en los laboratorios de PIV de embriones^{5, 26, 57, 48}. Los aspectos abordados en este artículo de revisión destacan el riesgo de contaminación existente y aportan nuevas evidencias sobre los riesgos potenciales cuando se utilizan materiales (ovocitos y semen) provenientes de animales infectados, aguda o persistentemente, con el vDVB. A pesar de las normas recomendadas por la IETS (*International Embryo Transfer Society*) para el ingreso de reproductores a centros de IA y transferencia embrionaria, la utilización de animales infectados, ya sea debido a una falla o falta de diagnóstico, podría ser la principal fuente de contaminación viral.

En el caso de los sistemas de PIV de embriones bovinos, la dinámica particular del vDVB dentro de los mismos, es un aspecto relevante que debe ser considerado al momento

de implementar alguna de las biotécnicas de reproducción asistida disponibles en pos de mejorar la producción comercial de ganado bovino.

Como ha quedado demostrado a lo largo de este artículo, han ocurrido grandes avances en los últimos años respecto a la comprensión de la dinámica del vDVB durante la implementación de las diferentes técnicas de reproducción asistida. Estos avances han permitido dilucidar de manera parcial algunos de los aspectos más controversiales desarrollados en este artículo. Sin embargo, aún existen puntos claves que investigar, tales como la susceptibilidad de ovocitos y embriones frente a diferentes cepas del vDVB con diferente grado de virulencia y la/s ruta/s implicadas en la interacción gameta-virus junto con la determinación de los receptores involucrados en la interacción vDVB-gametas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bielanski, A. A review on disease transmission studies in relationship to production of embryos by *in vitro* fertilization and to related new reproductive technologies. *Biotechnol Adv.* 1997; 3/4:633-656.
2. Bielanski, A.; Algire, J.; Lalonde, A.; Garceac, A. Embryos produced from fertilization with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) - infected semen and the risk of disease transmission to embryo transfer (ET) recipients and offspring. *Theriogenology.* 2013; 80(5):451-455.
3. Bielanski, A.; Dubuc, C. In vitro fertilization of bovine oocytes exposed to bovine herpesvirus 1 (BHV1). *Reprod Dom Anim.* 1993; 28:285-288.
4. Bielanski, A.; Dubuc, C.; Hare, WCD. Failure to remove bovine diarrhoea virus (BVDV) from bull semen by swim up and other separatory sperm techniques associated with in vitro fertilization. *Reprod Dom Anim.* 1992; 27:303-6.
5. Bielanski, A.; Jordan L. Washing or washing and trypsin treatment is ineffective for removal of noncytotoxic bovine viral diarrhoea virus from bovine oocytes or embryos after experimental viral contamination of an in vitro fertilization system. *Theriogenology.* 1996; 46:1467-76.
6. Bielanski, A.; Loewen, K. In vitro fertilization of bovine oocytes with semen from bulls persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Anim Reprod Sci.* 1994; 183-189.
7. Bielanski, A.; Hare, WCD. Effect *in vitro* of BVDV on bovine embryos with the zona pelúcida intact damaged or removed. *Vet Res Com.* 1988; 12:19-24.
8. Booth, PJ.; Collins, ME.; Jenner, L.; Prentice, H.; Ross, J.; Badsberg, JH.; Brownlie, J. Association of non-cytopathogenic BVDV with bovine blastocysts: effects of washing, duration of viral exposure and degree of blastocyst expansion. *Vet Rec* 1999; 144:150-152.
9. Boulanger D, Waxweiler S, Karelle L, Loncar M, Mignon B, Dubuisson J, Thiry E, Pastoret PP. Characterization of monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus: evidence of a neutralizing activity against gp48 in the presence of goat anti-mouse immunoglobulin serum. *J Gen Virol.* 1991; 72 (Pt 5):1195-8.
10. Brock, KV.; Lapin, DR.; Skrade, DR. Embryo transfer from donor cattle persistently infected with BVDV. *Theriogenology.* 1997; 47:837-844.
11. Chen, Shisong.; Wrathall, EA. The importance of the *zona pelúcida* for disease control in livestock by embryo transfer. *Br Vet J.* 1989; 145 :129-139.
12. Choi, C.; Chae C. Localization of classical swine fever virus in male gonads during subclinical infection. *J Gen Virol.* 2002; 83(Pt 11):2717-21.
13. de Loos, FA.; Bevers, MM.; Dieleman, SJ.; Kruip, TA. Morphology of preovulatory bovine follicles as related to oocytes maturation. *Theriogenology.* 1991; 35(3):527-35.
14. De Mia, GM.; Greiser-Wilke, I.; Feliziani, F.; *et al.* Genetic characterization of a caprine pestivirus as the first member of a putative novel pestivirus subgroup. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2005; 52:206-210.

15. Deregt D, Loewen KG. Bovine viral Diarrhea virus: Biotypes and disease. *Canadian Vet J.* 1995; 36:371-378.
16. Donis, RO.; Dubovi EJ. Glycoproteins of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus in infected bovine cells. *J Gen Virol.* 1987; 68(Pt 6):1607-16.
17. Engels, M.; Ackermann, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Vet Microbiol.* 1996; 53:3-15.
18. Fair, T.; Hyttel, P.; Greve, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev.* 1995; 42(4):437-42.
19. Foote, RH. Artificial insemination to cloning. Ithaca, NY: Cornell University Resource Center; 1998.
20. Fray, MD.; Prentice, H.; Clarke, MC.; Charleston, B. Immunohistochemical evidence for the localization of bovine viral diarrhoea virus, a single stranded RNA virus, in ovarian oocytes in the cow. *Vet Pathol.* 1998; 35:253-9.
21. Fulton, RW.; Ridpath, JF.; Ore, S.; Confer, AW.; Saliki, JT.; Burge, LJ.; Payton, ME. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subgenotypes in diagnostic laboratory accessions: distribution of BVDV 1a, 1b and 2a subgenotypes. *Vet Microbiol.* 2005; 111(1-2):35-40.
22. Galuppo, AG.; Junior, NB.; Arruda, NS.; Corbellini, AO.; Chiappetta, CM.; Pavão, DL.; D'Angelo, M.; Canal, CW.; Rodrigues, JL. Evaluation of the effectiveness of semen processing techniques to remove bovine viral diarrhoea virus from experimentally contaminated semen samples. *J Virol Methods.* 2013; 187(2):443-8.
23. Gard, JA.; Givens, MD.; Riddell, KP.; Galik, PK.; Zhang, Y.; Stringfellow, DA.; Marley, MS. Detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in single or small groups of pre-implantation bovine embryos. *Theriogenology.* 2007a; 67(9):1415-23.
24. Gard, JA.; Givens, MD.; Stringfellow, DA. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV): Epidemiologic concerns relative to semen and embryos. *Theriogenology.* 2007b; 68:434-442.
25. Gilula, NB.; Epstein.; ML.; Beers, WH. Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. *J Cell Biol.* 1978; 78(1):58-75.
26. Givens, MD.; Galik, PK.; Riddell, KP.; Brock, KV.; Stringfellow, DA. Replication and persistence of different strains of bovine viral diarrhoea virus in an in vitro embryo production. *Theriogenology.* 2000; 54(7):1093-107.
27. Givens, MD.; Waldrop, JG. Bovine viral diarrhoea virus in embryo and semen production system. *Vet Clin Food Anim.* 2004; 20:21-38.
28. González Altamiranda, E.; Kaiser, GG.; Mucci, NC.; Verna, AE.; Campero, CM.; Odeón, AC. Effect of Bovine Viral Diarrhoea virus on the ovarian functionality and in vitro reproductive performance of persistently infected heifers. *Vet Microbiol.* 2013; 165: 326-332.
29. González Altamiranda, E.; Kaiser, GG.; Weber, N.; Leunda, MR.; Pecora, A.; Malacari, DA.; Morán, O.; Campero, CM.; Odeón, AC. Clinical and reproductive consequences of using BVDV contaminated semen in artificial insemination in a beef herd in Argentina. *Anim Reprod Sci.* 2012; 133(3-4):146-152.
30. González Altamiranda, EA.; Verna, AE.; Kaiser, GG.; Leunda, MR.; Campero, CM.; Odeón, AC. Aislamiento del virus de la Diarrea viral bovina (vDVb) en ovocitos bovinos madurados e infectados *in vitro.* 14th International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians. Madrid, España. 2009; Pp 208.
31. Grooms DL, Brock KV, Ward LA (1998). Detection of bovine viral diarrhoea virus in the ovaries of cattle acutely infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Vet Diagn Invest* 10:125-9.
32. Grummer, B.; Beer, M.; Liebler-Tenorio, E.; Greiser-Wilke, I. Localization of viral proteins in cells infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Gen Virol.* 2001; 82:2597-605.
33. Grummer, B.; Grotha, S.; Greiser-Wilke, I. Bovine viral diarrhoea virus is internalized by clathrin-

- dependent receptor-mediated endocytosis. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2004; 51:427-32.
34. Guérin, B.; Chaffaux, S.; Marquant-Leguienne, B.; Allietta, M.; Thibier, M. IVF and IV culture of bovine embryos using semen from a bull persistently infected with BVD (Abstract). *Theriogenology* 1992; 37:217.
 35. Guérin, B.; Nibart, M.; Marquant-Leguienne, B.; Humblot, P. Sanitary risks related to embryo transfert in domestic species. *Theriogenology*. 1997; 47:33-42.
 36. Harding, MJ.; Cao, X.; Shams, H.; Johnson, AE.; Vassilev, VB.; Gil, LH.; Wheeler DW.; Haines, D.; Sibert, GJ.; Nelson, LD.; Campos, M.; Donis, RO. Role of bovine viral diarrhoea virus biotype in the establishment of fetal infections. *Am J Vet Res*. 2002; 63:1455-1463.
 37. Houe, H. Epidemiological features and economic importance of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Microbiol*. 1999; 64:89-107.
 38. Houe, H. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 1995; 11(3):521-547.
 39. Kirkland PD, McGowan MR, Mackintosh SG, Moyle A. Insemination of cattle with semen from a bull transiently infected with pestivirus. *Vet Rec*. 1997; 140:124-127.
 40. Kirkland, PD.; Mackintosh, SG.; Moyle, A. The outcome of widespread use of semen from a bull persistently infected with pestivirus. *Vet Rec*. 1994; 135:527-529.
 41. Macovei, A.; Zitzmann, N.; Lazar, C.; Dwek, RA.; Branza-Nichita, N. Brefeldin A inhibits pestivirus release from infected cells, without affecting its assembly and infectivity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 346:1083-90.
 42. Mathapati, BS.; Mishra, N.; Rajukumar, K.; Nema, RK.; Behera, SP.; Dubey, SC. Entry of bovine viral diarrhoea virus into ovine cells occurs through clathrin-dependent endocytosis and low pH-dependent fusion. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2010; 46(5):403-7.
 43. McGowan MR, Kafi M, Kirkland PD, Kelly R, Bielefeldt-Ohmann H, Occhio MD, Jillella D (2003). Studies of the pathogenesis of bovine pestivirus-induced ovarian dysfunction in superovulated dairy cattle. *Theriogenology* 59:1051-66.
 44. Meyling, A.; Jensen, AM. Transmission of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) by artificial insemination (AI) with semen from a persistently-infected bull. *Vet Microbiol*. 1988; 17(2):97-105.
 45. Nussbaum, O.; Laster, J.; Loyter, A. Fusion of enveloped viruses with sperm cells: interaction of Sendai, influenza, and Semliki Forest viruses with bull spermatozoa. *Exp Cell Res*. 1993; 206(1):11-5.
 46. Odeón AC., Spath EJA., Paloma EJ., Leunda MR., Fernández Sainz IJ., Pérez SE., Kaiser GG., Draghi MG., Cetra BM., Cano A. seroprevalencia de la diarrea viral bovina, herpesvirus bovino y virus sincicial respiratorio en Argentina. *Rev. Med. Vet*. 2000; 82: 216-220.
 47. Pellerin, C.; van den Hurk, J.; Lecomte, J.; Tussen, P. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology* 1994; 203:260-8.
 48. Perry, G. Risk assessment of transmission of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in abattoir-derived in vitro produced embryos. *Theriogenology*. 2007; 68:38-55.
 49. Ridpath, JF; Bolin, SR. The genomic sequence of a virulent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) from the type 2 genotype: Detection of a large genomic insertion in a noncytopathic BVDV. *Virology*. 1995; 212:39-46.
 50. Ridpath, JF; Bolin, SR.; Dubovi, EJ. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology*. 1994; 205:66-74.
 51. Schultz, RM.; Letourneau, GE.; Wassarman, PM. Program of early development in the mammal: changes in the patterns and absolute rates of tubulin and total protein synthesis during oocyte growth in the mouse. *Dev Biol*. 1979; 73(1):120-33

52. Singh, EL. The disease control potential of embryos. *Theriogenology*. 1987; 27:9–20.
53. Singh, EL.; Eaglesome, MD.; Thomas, FC.; Papp-Vid, G.; Hare, WCD. Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. I. The *in vitro* exposure of preimplantation bovine embryos to akabane, bluetongue and bovine viral diarrhoea viruses. *Theriogenology*. 1982; 17:437–444.
54. Smith, RD. 'Veterinary Clinical Epidemiology.' 1995; (CRC Press: Boca Raton, FL.).
55. Stringfellow, DA.; Givens, MD. Epidemiologic concerns relative to *in vivo* and *in vitro* production of livestock embryos. *Anim Reprod Sci*. 2000a; 60–61:629–642.
56. Stringfellow, DA.; Givens, MD. Infectious agents in bovine embryo production: hazards and solutions. *Theriogenology*. 2000b; 53:85–94.
57. Stringfellow, DA.; Givens, MD.; Waldrop, JG. Biosecurity issues associated with current and emerging embryo technologies. *Reprod Fertil and Develop* 2004; 16: 1-10.
58. Stroud, B. Statistics and Data Retrieval Committee Report. The year 2010 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. 2011. www.iets.org.
59. Thibier, M. New biotechnologies in cattle production. In: *Proceedings of the 7th congress of the Federation of Asian Veterinary Associations*; 1990. P. 513-24.
60. Thibier, M. The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: Current methods and perspectives. *Reprod Nutr Dev*. 2005; 45(3):235-42.
61. 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. *J Vet Med Sci*. 1999; 61(8):943-945.
62. Van Soom, A.; Wrathall, AE.; Herrler, A.; Nauwynck HJ. Is the zona pellucida an efficient barrier to viral infection? *Reproduction, Fertility and Development*. 2010; 22:21–31.
63. Vanroose G., Nauwynck H., Van Soom A., Vanopdenbosch E., de Kruif A. Replication of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus in zona-free and zona-intact *in vitro*-produced bovine embryos and the effect on embryo quality. *Biol Reprod*. 1998; 58(3):857-66.
64. 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 Dev*. 1999 ; 54:255–263.
65. Vanroose, G.; Nauwynck, H.; Van Soom, A.; Ysebaert, MT.; Charlier, G.; Van Oostveldt, P.; de Kruif, A. Structural Aspects of the Zona Pellucida of *In Vitro*-Produced Bovine Embryos: A Scanning Electron and Confocal Laser Scanning Microscopic Study. *Biol Reprod*. 2000; 62:463–469.
66. Walz, PH.; Grooms, DL.; Passler, T.; Ridpath, JF.; Tremblay, R.; Step, DL.; Callan, RJ.; Givens, MD. Control of Bovine Viral Diarrhoea Virus in Ruminants. *J Vet Intern Med*. 2010; 24:476–486.
67. Wentink, GH.; Remmen, JL.; van Exsel, AC. Pregnancy rate of heifers bred by an immunotolerant bull persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Q*. 1989; 11:171-174.
68. Wrathall, AE.; Suttmoller, P. Potential of embryo transfer to control transmission of disease. In '*Manual of the International Embryo Transfer Society*'. (Eds D.A. Stringfellow and S. M. Seidel.) 1998; pp. 17–44. (IETS: Savoy, IL.)
69. Wrathall, AE.; Simmons, HA.; Van Soom, A. Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilisation with virus-infected semen. *Theriogenology*. 2006; 20:65(2):247-74.
70. Zea-Mazo, JW.; Negrette-Mejía, YA.; Cardona-Maya, W. Virus of sexual transmission: semen and virus relationship. *Actas Urol Esp*. 2010; 34(10):845-53.

