

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(CLÍNICA E REPRODUÇÃO ANIMAL)

PAULO VICTOR DOS SANTOS PEREIRA

IMPACTO DA PRESENÇA DE *LEPTOSPIRA* SPP. NO FLUIDO FOLICULAR DE
VACAS SOBRE A COMPETÊNCIA AO DESENVOLVIMENTO DO OÓCITO

NITERÓI, RJ

2023

Ficha catalográfica automática - SDC/BFV
Gerada com informações fornecidas pelo autor

P436i Pereira, Paulo Victor dos Santos
IMPACTO DA PRESENÇA DE LEPTOSPIRA SPP. NO FLUIDO FOLICULAR
DE VACAS SOBRE A COMPETÊNCIA AO DESENVOLVIMENTO DO OÓCITO /
Paulo Victor dos Santos Pereira. - 2023.
86 f.: il.

Orientador: Joanna Maria Gonçalves de Souza-Fabjan.
Coorientador: Maria Isabel Nogueira Di Azevedo.
Dissertação (mestrado)-Universidade Federal Fluminense,
Faculdade de Veterinária, Niterói, 2023.

1. Leptospirose. 2. Produção IN VITRO de Embriões. 3. OVUM
PICK-UP. 4. Caracterização molecular. 5. Produção
intelectual. I. Souza-Fabjan, Joanna Maria Gonçalves de,
orientadora. II. Di Azevedo, Maria Isabel Nogueira,
coorientadora. III. Universidade Federal Fluminense. Faculdade
de Veterinária. IV. Título.

CDD - XXX

PAULO VICTOR DOS SANTOS PEREIRA

IMPACTO DA PRESENÇA DE *LEPTOSPIRA* SPP. NO FLUIDO FOLICULAR DE
VACAS SOBRE A COMPETÊNCIA AO DESENVOLVIMENTO DO OÓCITO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Clínica e Reprodução Animal) da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para aprovação a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Área de Concentração: Clínica e Reprodução Animal.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Joanna Maria Gonçalves de Souza-Fabjan

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Isabel Nogueira Di Azevedo

NITERÓI, RJ

2023

PAULO VICTOR DOS SANTOS PEREIRA

**IMPACTO DA PRESENÇA DE *LEPTOSPIRA* SPP. NO FLUIDO FOLICULAR DE
VACAS SOBRE A COMPETÊNCIA AO DESENVOLVIMENTO DO OÓCITO**

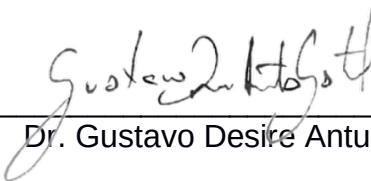
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Clínica e Reprodução Animal) da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para aprovação a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Área de Concentração: Clínica e Reprodução Animal.

Aprovado em 16 de fevereiro de 2023

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Joanna Gonçalves de Souza-Fabjan - UFF
Orientadora



Dr. Gustavo Desire Antunes Gastal - INIA

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota - UFRPE

Niterói, RJ

2023

À memória de Geraldo Gomes Pereira.

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial aos meus pais, Silvana e Paulo Sérgio, pelo apoio fornecido durante todos esses anos e por ter tornado esses últimos dois anos possíveis. Ao meu avô Geraldo, que apesar de não compreender muito bem o que eu fazia, sempre teve orgulho do que me tornei. À minha namorada Júlia, pela compreensão durante o mestrado e todo suporte emocional nessa caminhada.

A todos os meus irmãos de outras espécies que já passaram pela minha vida, em especial Pretinha e Falcão. À Pretinha, por ter estado literalmente junto de mim na maior parte do meu processo de escrita, e por ter me aturado ensaiar sozinho em voz alta todas as apresentações desses últimos anos. Ao Falcão, por ter passado a sua vida inteira comigo e por tudo que vivemos juntos. Obrigado por tudo.

Gostaria de agradecer à Joanna pela confiança depositada em mim para executar esse projeto e por toda a ajuda fornecida durante esses anos. Creio que nenhum outro projeto teria tanto a minha cara como o “Emergentes” teve, e por isso eu sou grato.

À Isabel agradeço por ter aceitado ser a minha coorientadora, pela ajuda na execução dos experimentos e na escrita dos artigos, assim como ideias sempre relevantes.

Ao Prof. Walter, pela oportunidade que me foi oferecida lá em 2016, quando eu não sabia nem a diferença entre uma bactéria Gram positiva e Gram negativa. O Laboratório de Bacteriologia Veterinária me ensinou, não só a parte científica, mas também a ser mais organizado e responsável.

À Ana Paula, obrigado pela convivência no LaBV, por todos os ensinamentos e por ter feito parte da minha trajetória até agora.

Ao Gabriel, muito obrigado por ter me dado o voto de confiança com a minha primeira bolsa de “ic”, que foi o pontapé inicial nisso tudo.

Ao Arashiro, por toda a ajuda desde a época da graduação coletando urina de vacas até hoje, sendo fundamental para a execução desse projeto.

Ao Dr. Rodolfo Ungerfeld e Paulo Sérgio Rangel, por todas as ideias e socorro estatístico nas horas de dificuldade.

As amizades construídas durante a graduação, especialmente a Panela.

Aos colegas que fiz no GEPECO e LaBV durante a graduação, especialmente à Thaís, por todo o conhecimento e amizade.

A todos os colegas e amigos do LPMPIVE, em especial à Nathalia pela ajuda nas primeiras coletas, que tornaram tudo isso possível. Ao Lucas, por todos os ensinamentos e ideias durante esses anos. À Ana Maia, por toda a ajuda com a parte ética deste mestrado.

Aos amigos que encontrei ao longo do caminho.

A todas as empresas e profissionais que aceitaram participar deste projeto e que me ajudaram nas coletas das amostras e dos dados.

A todos os cientistas e profissionais da saúde que participaram no combate à pandemia de COVID-19.

As demais pessoas que mesmo sem saber, influenciaram a minha jornada durante todos esses anos.

À camarada Alexandra Elbakyan, pela luta para que o conhecimento seja acessível a todos.

A agência de fomento CAPES (código 001) pela minha bolsa durante o primeiro ano de mestrado e a FAPERJ pela verba para a execução deste projeto e pela bolsa de mestrado nota 10.

Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser descoberta.

Carl Sagan

RESUMO

Apesar do notório envolvimento da leptospirose na morte embrionária precoce em bovinos, a relação entre infecção por *Leptospira* e falha reprodutiva, bem como os mecanismos que levam a ela, ainda não foram estabelecidos. Com base nisso, o presente estudo teve como objetivo determinar o efeito da infecção natural por *Leptospira* spp. na competência ao desenvolvimento do oócito e eficiência global da produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE). Foram utilizadas um total de 251 vacas leiteiras, mestiças e multíparas para a detecção de DNA de *Leptospira* spp., sendo 244 destas utilizadas na PIVE. Essas fêmeas eram pertencentes a 20 fazendas diferentes e regularmente eram submetidas a rotina comercial de PIVE. Foi investigada a presença de leptospiros no fluido folicular (FF) através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), e realizada caracterização molecular nas amostras positivas por meio de sequenciamento e análise filogenética. Esses resultados foram então associados com a qualidade dos oócitos e a sua competência ao desenvolvimento até o estágio de embrião com o intuito de inferir se este microrganismo tem efeito sob a eficiência desta biotécnica reprodutiva. Foi possível detectar a bactéria em 27% amostras coletadas. Destas, nove estirpes foram identificadas, todas como *L. interrogans* pertencentes ao sorogrupo Sejroe. Destaca-se que 65% das fazendas tinham pelo menos uma vaca positiva para *Leptospira* no rebanho. Apesar da morfologia dos complexos *cumulus*-oócito e a sua maturação nuclear não ter sido influenciada pela presença de *Leptospira* spp., essa bactéria foi capaz de diminuir a competência ao desenvolvimento do oócito, diminuindo a eficiência da técnica de produção *in vitro* de embriões. Ainda é preciso estabelecer se o efeito causado por *Leptospira* spp. é direto, indireto ou ambos; isso irá auxiliar na implementação de medidas de controle específicas.

Palavras-chave: Leptospirose. PIVE. *Ovum Pick-up*. Caracterização molecular. Bovinos.

ABSTRACT

Despite the notorious involvement of leptospirosis in early embryonic death in cattle, the relationship between *Leptospira* infection and reproductive failure, as well as the mechanisms that lead to it, have not yet been established. Based on this, the present study aimed to determine the effect of natural infection by *Leptospira* spp. on competence to oocyte development and overall efficiency of *in vitro* production of bovine embryos (IVEP). A total of 251 crossbred and multiparous dairy cows were used for the detection of *Leptospira* spp. DNA, 244 of which were used in IVEP. These females belonged to 20 different farms and were regularly submitted to commercial IVEP routine. The presence of leptospires in follicular fluid (FF) was investigated using the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique, and molecular characterization was carried out in positive samples through sequencing and phylogenetic analysis. These results were then associated with the quality of the oocytes and their development competence up to the embryo stage in order to infer whether this microorganism has an effect on the efficiency of this reproductive biotechnology. It was possible to detect the bacteria in 27% of the collected samples. Of these, nine strains were identified, all as *L. interrogans* belonging to serogroup Sejroe. It is noteworthy that 65% of the farms had at least one positive cow for *Leptospira* in the herd. Although the morphology of COCs and their nuclear evolution were not influenced by the presence of *Leptospira* spp., this bacterium was able to reduce the competence for oocyte development, decreasing the efficiency of the IVEP technique. It remains to be established whether the effect caused by *Leptospira* spp. is direct, indirect, or both; this will assist in the implementation of specific control measures.

Key words: Leptospirosis. IVEP. *Ovum* Pick-up. molecular characterization. Bovines.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO, p. 18
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA, p. 20
 - 2.1 *LEPTOSPIRA* E LEPTOSPIROSE, p. 20
 - 2.2 LEPTOSPIROSE BOVINA, p. 21
 - 2.3 *LEPTOSPIRA* SPP. NO TRATO GENITAL E GAMETAS DE FÊMEAS BOVINAS, p. 24
 - 2.4 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO EM LEPTOSPIROSE BOVINA, p. 27
 - 2.5 TRATAMENTO DE GAMETAS E EMBRIÕES, p. 28
 - 2.6 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (PIVE) BOVINOS, p. 30
3. HIPÓTESES CIENTÍFICAS, p. 34
4. OBJETIVOS, p. 35
 - 4.1 OBJETIVO GERAL, p. 35
 - 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS, p. 35
5. MATERIAL E MÉTODOS, p. 36
 - 5.1 ÉTICA, p. 36
 - 5.2 LOCAIS DO ESTUDO, p. 36
 - 5.3 DESENHO EXPERIMENTAL, p. 36
 - 5.4 COLETA DO COC E FLUIDO FOLICULAR, p. 37
 - 5.5 PIVE BOVINA, p. 37
 - 5.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE, p. 39
 - 5.7 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA, p. 40
 - 5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA, p. 40
6. CAPÍTULO I – BOVINE GENITAL LEPTOSPIROSIS: EVIDENCE OF OVARIAN INFECTION BY *LEPTOSPIRA INTERROGANS*, p. 41
 - 6.1 ABSTRACT, p. 43

6.2 INTRODUCTION, p. 44

6.3 METHODS, p. 44

6.4 RESULTS, p. 46

6.5 DISCUSSION, p. 46

6.6 CONCLUSION, p. 48

6.7 REFERENCES, p. 49

7. CAPÍTULO II – THE PRESENCE OF *LEPTOSPIRA* SPP. IN THE FOLLICULAR FLUID CAN AFFECT THE OOCYTE DEVELOPMENTAL COMPETENCE DURING *IN VITRO* EMBRYO PRODUCTION, p. 53

7.1. ABSTRACT, p. 55

7.2. INTRODUCTION, p. 56

7.3. MATERIAL AND METHODS, p. 58

7.3.1. ETHICS, LOCATION, AND EXPERIMENTAL CONDITIONS, p. 58

7.3.2. COLLECTION OF COCS AND FF, p. 58

7.3.3. IVEP, p. 59

7.3.3.1. SCREENING AND CLASSIFICATION, p. 59

7.3.3.2. IVM OF OOCYTES, p. 59

7.3.3.3. IVF OF EMBRYOS, p. 60

7.3.3.4. IVC OF EMBRYOS, p. 60

7.3.4. MOLECULAR DIAGNOSIS AND GENETIC ANALYSIS OF *LEPTOSPIRA* SPP., p. 61

7.3.5. ENDPOINTS AND STATISTICAL ANALYSIS, p. 61

7.4. RESULTS, p. 61

7.5. DISCUSSION, p. 62

7.6. CONCLUSION, p. 65

7.7. REFERENCES, p. 66

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS, p. 74

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 75

10. ANEXOS, p. 85

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Maximum likelihood phylogenetic tree inferred from partial *secY* gene sequences (410 bp) from the present study (bold and underlined) and GenBank sequences from *Leptospira* spp. most common identified in bovine (serovars, strains and accession numbers are shown). Gray rectangle with Brazilian flag represents sequences from *L. interrogans* serogroup Sejroe from the same geographical region. *Leptospira biflexa* strain Patoc is the outgroup taxa, p. 52

LISTA DE TABELAS E QUADROS

- Table 1. *In vitro* embryo production outcomes of *cumulus*-oocyte complexes (COCs) derived from follicles with either presence (+) or absence (-) of *Leptospira* spp. detected by PCR in the follicular fluid of naturally infected crossbred donor dairy cows according to the laboratory (Lab), p. 73

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcento
±	Mais ou menos
°	Grau
°C	Grau Celsius
°GL	Grau Gay Lussac
μL	Microlitro
μM	Micrometro
μg	Micrograma
BGL	Leptospirose genital bovina
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
ATP	Adenosina trifosfato
CO ₂	Dióxido de carbono
COC	Complexo <i>cumulus</i> -oócito
DFM	Microscopia de Campo Escuro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FBS	Soro fetal bovino
FF	Fluido folicular
FIV	Fertilização in vitro
FSH	Hormônio folículo estimulante
F-TALP	<i>Fertilization Tyrode's albumin lactate pyruvate</i>
FV	Fluido Vaginal
g	Grama
GI	Grau um

GII	Grau dois
GIII	Grau três
h	Hora
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
LH	Hormônio luteinizante
FSH	Hormônio folículo estimulante
LPS	Lipopolissacarídeo
MAT	Teste de aglutinação microscópica
MCV	Muco cérvico-vaginal
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MHz	Megahertz
min	Minuto
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmHg	Milímetro de mercúrio
NEG-FF	Negativo para <i>Leptospira</i> spp. no fluido folicular
OPU	<i>Ovum pick-up</i>
pb	Pares de base
POS-FF	Positivo para <i>Leptospira</i> spp. no fluido folicular
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
RNA	Ácido ribonucleico

SOF	Fluido de oviduto sintético
spp.	Espécies
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCM-199	<i>Tissue culture medium 199</i>
UFF	Universidade Federal Fluminense
UI	Unidade internacional
ZP	Zona Pelúcida

1 1 INTRODUÇÃO

2 No ano de 2021 o Brasil continuou a apresentar o maior rebanho comercial
3 do mundo com aproximadamente 200 milhões de cabeças bovinas (ABIEC, 2022).
4 Devido a demanda de proteína animal, existe a necessidade de acréscimo na
5 eficiência da produção animal por meio do melhoramento genético e aumento da
6 eficiência reprodutiva alcançada pelas biotecnologias da reprodução (ZHU et al.,
7 2018). As perdas econômicas associadas à morte embrionária são de grande
8 preocupação, não apenas para a indústria bovina brasileira, mas também para o
9 mundo. Aproximadamente 37% das vacas leiteiras no estado do Rio de Janeiro
10 apresentam problemas reprodutivos, entre estes a repetição de estro e
11 abortamento, que podem ser associadas às doenças infecciosas (ARASHIRO et
12 al., 2017).

13 A infecção por *Leptospira* em bovinos ocorre no mundo todo e é
14 determinada por uma grande variedade de sorovares (ZARANTONELLI et al.,
15 2018). Os aspectos clínicos da leptospirose bovina, claramente indicam esta como
16 uma doença reprodutiva. Paradoxalmente, as pesquisas ainda têm como foco
17 principal a detecção de carreadores renais em urina, sendo a detecção de
18 carreadores genitais negligenciada. Poucos estudos foram conduzidos na esfera
19 reprodutiva, incluindo pesquisa de leptospirose em ovários e tubas uterinas
20 (BIELANSKY et al., 1998a); no útero (PIRES et al., 2018; DI AZEVEDO et al.,
21 2020); secreção vaginal (LOUREIRO et al., 2017); fluido folicular (FF) (DI
22 AZEVEDO et al., 2021) e sêmen (VINODH et al., 2008), que confirmam o trato
23 genital como um importante sítio extra renal de infecção. A eficiência reprodutiva é
24 a chave para a rentabilidade da produção animal, e as biotecnologias da
25 reprodução podem contribuir para o seu desenvolvimento. Devido à capacidade
26 de ser uma doença silenciosa, os animais infectados podem ser assintomáticos e
27 a implementação de biotecnologias pode ser prejudicada devido ao
28 comprometimento do sistema reprodutor, gerando prejuízo econômico. Apesar do
29 notório envolvimento da *Leptospira* na morte embrionária precoce em bovinos, a

30 patogênese da infecção de oócitos e embriões até o seu desfecho ainda
31 permanece sem elucidação. Diante dos fatos apresentados, o presente estudo se
32 propõe a avançar na compreensão dos mecanismos de infecção e avaliar os
33 danos gerados a oócitos e embriões infectados, bem como identificar
34 geneticamente as estirpes relacionadas à infecção genital.

35 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

36 2.1 *LEPTOSPIRA* E LEPTOSPIROSE

37 A leptospirose é uma enfermidade causada por espiroquetas do gênero
38 *Leptospira* spp., organismos cosmopolitas notificados em diversos locais no
39 mundo, sendo um clássico exemplo de zoonose, responsáveis por doença em
40 animais e seres humanos (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). São
41 bactérias móveis e o seu tamanho varia entre 6 a 20 µm de comprimento e 0,1 µm
42 de diâmetro, além de apresentarem morfologia helicoidal e flagelo periplasmático
43 (RISTOW; LILENBAUM, 2010). O gênero *Leptospira* pode ser dividido em dois
44 grandes grupos: as patogênicas, comprovadamente capazes de causar infecção,
45 e não patogênicas, organismos saprófitos encontrados no ambiente cujo potencial
46 infectante ainda não foi comprovado. Geneticamente são classificadas em
47 genomoespécies (VINCENT et al., 2019), enquanto para fins epidemiológicos, são
48 classificadas sorologicamente, com definição de sorovares. Sorovares que
49 possuem relação antigênica entre si são agrupados em sorogrupos. É importante
50 ressaltar que não existe associação entre os dois sistemas de classificação
51 utilizados atualmente.

52 Apesar de negligenciada, essa zoonose se encaixa perfeitamente no
53 conceito de Saúde única, devido a sua complexa e dinâmica epidemiologia
54 envolvendo humanos, animais e o ecossistema (LOUREIRO; LILENBAUM, 2020).
55 Com relação à infecção humana, por ano, mundialmente mais de um milhão de
56 pessoas são afetadas, sendo responsável por cerca de 60 mil mortes (THIBEAUX
57 et al., 2018). Alguns grupos estão associados ao risco ocupacional da doença,
58 como trabalhadores rurais, jardineiros, médicos-veterinários e outras pessoas que
59 trabalham diretamente com animais (KARPAGAM; GANESH, 2020). Devido a
60 características climáticas como a alta frequência de chuvas, temperaturas
61 elevadas e o pH do solo, a *Leptospira* spp. é capaz de sobreviver e manter sua

patogenicidade por longos períodos, tornando a leptospirose endêmica em países tropicais (MARTINS; LILENBAUM, 2015).

2.2 LEPTOSPIROSE BOVINA

A leptospirose pode apresentar diferentes aspectos clínicos dependendo da interação entre o hospedeiro afetado e a estirpe infectante. A infecção causada por sorogrupos incidentais resulta na forma clínica sistêmica aguda e grave da doença; enquanto a infecção por sorogrupos adaptados causa uma enfermidade crônica e silenciosa, com pouco ou nenhum sintoma aos seus hospedeiros (ELLIS, 2015). Quando presentes, os principais sinais clínicos em ruminantes são os abortamentos, aumento da natimortalidade, nascimentos de produtos fracos, queda na produção de leite, infertilidade, aumento no intervalo entre partos e no número de serviços, gerando perdas econômicas (LILENBAUM; MARTINS, 2015). Além disso, a repetição irregular de estro e a morte embrionária precoce também foram relatadas (LIBONATI et al., 2018).

Em bovinos, o sorogrupo Sejroe é de grande importância, possuindo dois principais sorovares: Hardjo e Guaricura. No sorovar Hardjo, as duas principais espécies que acometem bovinos são a *Leptospira interrogans* genótipo Hardjoprajitno e a *Leptospira borgpetersenii* genótipo Hardjobovis (ADLER, 2015). O genótipo Hardjoprajitno foi principalmente isolado na Europa e o Hardjobovis tem sido isolado em diversas áreas do mundo (RINEHART et al., 2012). A *Leptospira santarosai* tem como principal representante o sorovar Guaricura, que tem sido isolado principalmente nas Américas (LOUREIRO et al., 2016).

Ao longo dos anos, tem sido detectada a presença de *Leptospira* spp. do sorogrupo Sejroe no trato genital feminino em diferentes espécies como: equinos (DIRECTOR et al., 2014), hamsters (BARBOSA et al., 2019), humanos (SHAKED et al., 1993), ovinos (ROCHA et al., 2018) e bovinos (LOUREIRO et al., 2017). Estas evidências indicam que estas estirpes possuem tropismo pelo trato genital feminino. Devido a essa preferência pelo trato genital feminino e a associação dos

bovinos como principais reservatórios para as estirpes do sorogrupo Sejroe, estas têm sido associadas a forma reprodutiva crônica e silenciosa da doença, que recentemente foi denominada leptospirose genital bovina (LGB) (LOUREIRO; LILENBAUM, 2020). Por ser silenciosa, esta doença pode passar despercebida e não ser diagnosticada, comprometendo a eficiência reprodutiva com uma consequente diminuição da produtividade dos rebanhos por longos períodos (LOUREIRO; LILENBAUM, 2020). A infecção do trato genital por estirpes adaptadas pode ser considerada um efeito secundário da infecção renal com a suposição de que as leptospirosas são encontradas no trato genital devido à bacteremia causada pela colonização renal (MONAHAN et al., 2009). Em contraste com essa hipótese, existem algumas evidências na literatura que sugerem que a leptospirose genital deve ser considerada uma síndrome específica dissociada de doença renal/sistêmica.

Alguns estudos recentes apresentam a epidemiologia da leptospirose bovina no Brasil. Na região Norte foi possível detectar 47% (97/208) de vacas com aptidão a produção de carne criadas extensivamente reativas à sorologia, sendo o sorogrupo Sejroe o mais prevalente. Neste estudo, o DNA bacteriano foi detectado por PCR em 6% (12/208) das amostras de rim e 15% (31/208) em amostras urinárias (GUEDES et al., 2019). Na região Nordeste, após realizada a sorologia de 253 bovinos, foi possível evidenciar 50% de animais positivos, sendo o sorovar Hardjo o mais comum. Alguns fatores de risco associados à doença foram um rebanho maior que 35 animais, a criação de animais de corte, sistema de criação extensiva e a presença de açudes ou córregos como fonte de água e ausência de serviços de médicos veterinários (CAMPOS et al., 2017). Em estudo posterior realizado em 22 fazendas do mesmo estado, porém em outra microrregião, foi detectado soropositividade em 35% dos animais, sendo 33% (136/414) fêmeas e 2% (7/414) em machos, de forma que todas as fazendas tinham pelo menos um animal positivo, não importando a aptidão do animal e o sistema de criação adotado. A ausência de quarentena, vacinação e isolamento de bovinos doentes

foram fatores de risco para a detecção de animais positivos (FERREIRA et al., 2017).

Na região Sul foram avaliados rebanhos de leite, em grande maioria criadas em sistema semiextensivo, para a presença de anticorpos anti-*Leptospira*. Em uma avaliação onde somente vacas foram testadas, 6% (80/1242) foram positivas por meio de sorologia para a infecção, sendo os fatores de risco associados o acesso de cães ao pasto e de roedores ao alimento suplementar fornecido. Por análise de causa-efeito, a ocorrência de desordens reprodutivas esteve diretamente ligada a leptospirose (FÁVERO et al., 2017). Já no Sudeste, após a avaliação em 11 rebanhos bovinos destinados a reprodução, criados de forma extensiva, com histórico de falhas reprodutivas e ausência de vacinação para leptospirose, 66% (264/400) dos animais foram reativos em sorologia a pelo menos um de 19 sorovares de *Leptospira* spp. (SÁNCHEZ et al., 2018). Comparando a soropositividade em um rebanho bovino que continha animais para produção de leite ou carne, criados de forma semi-intensiva e extensiva respectivamente, 82% (170/206) das vacas leiteiras apresentaram positividade em sorologia, enquanto 36% (82/226) dos bovinos de corte foram soropositivos. O sorovar Hardjo foi mais comum nos animais leiteiros, enquanto sorovares incidentais como Wolffi e Bratislava foram mais frequentes nos bovinos de corte (MARTINS et al., 2012). Esses dados corroboram com uma investigação realizada previamente (LILENBAUM; SOUZA, 2003). Na mesma região, amostras de vacas clinicamente assintomáticas antes do abate foram analisadas por sorologia e PCR. Por sorologia, foi possível detectar 37% (77/208) de animais reativos, sendo o sorovar Sejroe o mais frequente (62%). A partir da PCR urinária, 34% (67/199) dos animais foram positivos para a presença do microrganismo, o que sugere a contaminação do ambiente por bovinos assintomáticos (HAMOND et al., 2014).

A soropositividade e casos clínicos da leptospirose estão associados a fatores de risco como chuvas e alagamentos (DESVARS et al., 2011), sendo que a chuva influencia de forma diferente a prevalência de sorovares incidentais e

adaptados (SALGADO et al., 2014). Investigando o efeito da chuva na epidemiologia da leptospirose, amostras de soro e urina foram coletadas de animais de abatedouro em períodos secos ou chuvosos. Na sorologia durante os períodos chuvosos 43% (158/362) dos animais foram reativos, enquanto nos períodos secos 32% (70/220), sendo o sorogrupo Sejroe o mais frequente 55% (125/228). Por PCR, 42% (153/362) e 33% (73/220) foram positivos em períodos chuvosos e secos, respectivamente. Os autores concluíram que os períodos chuvosos afetam a infecção por sorovares incidentais e adaptados de formas diferentes, pois enquanto a infecção por sorovares incidentais foi aumentada de forma significativa durante as épocas chuvosas, os sorovares adaptados não foram afetados por condições ambientais (CORREIA et al., 2017). Apesar desses fatores, no contexto da LGB a possibilidade de transmissão sexual pode ser mais relevante para essa doença silenciosa e crônica provocadas por sorogrupos adaptados, como o Sejroe (LOUREIRO et al., 2017; LOUREIRO; LILENBAUM, 2020).

2.3 *LEPTOSPIRA* SPP. NO TRATO GENITAL E GAMETAS DE FÊMEAS BOVINAS

Investigando a colonização do trato genital feminino, fragmentos do canal vaginal de fêmeas bovinas provenientes de abatedouros foram avaliados por imunohistoquímica e histologia. Primeiramente, os animais naturalmente infectados foram identificados a partir da PCR de fluido vaginal (FV), urina e rim (OLIVEIRA et al., 2016). Das 147 amostras de FV analisadas, 28% (41/147) foram positivas em PCR. Destas amostras, 83% (34/41) apresentaram também positividade na urina e/ou rim. Apesar disso, não foi identificada a presença de *Leptospira* spp. ou alterações patológicas compatíveis no tecido vaginal, o que pode ser justificado pela origem uterina do FV (OLIVEIRA et al., 2016). Avaliando a presença do patógeno em FV e urina de vacas provenientes de abatedouro, o DNA bacteriano foi detectado em 50% (128/254) das amostras de FV e 31% (81/254) das amostras de urina. Correlacionando os dados, 29% (75/254) dos animais foram

positivos apenas em amostras de urina, enquanto 11% (28/254) apenas no FV (LOUREIRO et al., 2017).

Além do FV e do tecido vaginal, o tecido uterino foi outro sítio avaliado para a colonização de *Leptospira* spp.. Em amostras de tecido uterino de animais provenientes de abatedouro, foi possível detectar o DNA bacteriano por PCR. Das amostras de vacas não-prenhas, 18% (9/50) foram positivas, sendo que duas delas apresentaram material genético com qualidade suficiente para realizar o sequenciamento, sendo ambas 100% similares com *L. interrogans* (PIRES et al., 2018). Posteriormente, Di Azevedo et al., (2020) evidenciaram 26 % (11/42) de amostras uterinas positivas para *Leptospira* sp., sendo possível identificar nove destas como *L. interrogans*, com alta identidade com o sorovar Hardjo (DI AZEVEDO et al., 2021). Utilizando essa espécie para infectar experimentalmente cadelas, foi possível evidenciar dano ao endométrio, estimulando uma resposta inflamatória e uma expressão anormal de proteínas da matriz extracelular, que poderia causar danos ao desenvolvimento embrionário (WANG et al., 2014).

Avaliando a presença de anticorpos anti-leptospira em descargas genitais de vacas naturalmente infectadas, foi possível detectar imunoglobulinas G (IgG) e imunoglobulinas A (IgA) por meio da técnica de Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), com prevalência significativamente maior do que a obtida por meio do Teste de aglutinação microscópica (MAT) feito com o soro (DHALIWAL et al., 1996). Já em fêmeas experimentalmente infectadas por via intrauterina e inseminadas no estro subsequente, a taxa de gestação foi menor no grupo infectado, porém não estatisticamente significativa. Houve evidência de leptospiros na urina e no muco cérvico-vaginal (MCV) por meio de imunofluorescência direta e de microscopia de campo escuro em 6 de 8 fêmeas infectadas. Frequentemente ocorreu a detecção de anticorpos no MCV durante os estros subsequentes, no período total de 15 semanas, sendo a titulação de IgA usualmente maior que IgG (DHALIWAL et al., 1996).

A associação entre a *Leptospira* spp., oócitos e embriões foi avaliada por diferentes autores. Utilizando o sorovar Hardjo na concentração de 10^8 bactérias/mL para infectar experimentalmente oócitos durante a maturação *in vitro*, embriões bovinos não sofreram efeitos deletérios nas taxas de fertilização e no desenvolvimento embrionário (BIELANSKI; SURUJBALLI, 1996). No mesmo estudo, fêmeas bovinas foram infectadas utilizando a mesma concentração por via conjuntival e endovenosa utilizando o sorovar Hardjo tipo Hardjobovis, abatendo os animais no dia quatro ou 11 pós-infecção. Os autores detectaram, por meio de microscopia de campo escuro, microrganismos semelhantes a *Leptospira* em amostras de FF e COCs de animais abatidos quatro dias após infecção experimental (3/9 animais). Esse achado se repetiu em animais abatidos 11 dias após a infecção (5/10 animais positivos).

Utilizando a mesma concentração bacteriana descrita acima, embriões produzidos *in vitro* foram infectados durante o estágio de mórula com *Leptospira borgpetersenii* sorovar Hardjobovis. Foi possível confirmar a aderência da bactéria na superfície e a entrada nos poros da zona pelúcida (ZP). Cortes longitudinais e transversais realizados nos embriões evidenciaram o microrganismo na matriz da ZP, no espaço perivitelíneo, nos espaços intercelulares e nas células embrionárias, confirmando que não ocorre somente a aderência no embrião, mas também a penetração nas células (BIELANSKI; SURUJBALLI, 1998). Após a inseminação artificial de vacas superovuladas com sêmen infectado os autores detectaram, por meio de microscopia, a presença de *Leptospira borgpetersenii* sorovar Hardjobovis em 100% (63/63) dos embriões obtidos, bem como em fluido do oviduto e lavados uterinos (n=10). Em outro experimento, duas semanas após terem sido infectadas terem sido infectadas por via conjuntival, intranasal e intracervical, com a concentração de 5×10^4 bactérias em cada via, fêmeas foram superovuladas e inseminadas. Como resultado, quatro de 14 embriões obtidos foram positivos. Ressalta-se, porém, que 100% (21/21) dos oócitos obtidos foram negativos, ambos analisados pela técnica de PCR (BIELANSKI et al., 1998a).

2.4 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO EM LEPTOSPIROSE BOVINA

Devido ao caráter silencioso que a forma reprodutiva da leptospirose bovina pode apresentar, o diagnóstico da doença é um desafio (LOUREIRO; LILENBAUM, 2020). Quando presentes, os sintomas não permitem o diagnóstico clínico preciso, devido a sintomatologia comum a diversos patógenos (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2010). O diagnóstico laboratorial pode ser dividido em métodos indiretos, com a detecção de anticorpos, ou métodos diretos, com a detecção do agente (ADLER, 2015).

O Teste de Aglutinação Microscópica (MAT) é o teste de diagnóstico referência para humanos (WHO, 2010) e animais (OIE, 2012). Apesar de útil como teste de triagem para rebanhos com problemas reprodutivos, o MAT deve sempre ser interpretado como um teste coletivo, nunca individual (DI AZEVEDO; LILENBAUM, 2020). É uma técnica pouco precisa, devido a avaliação subjetiva, a falta de um valor de *cut off* preciso e os resultados falso-positivos que podem ser gerados devido a reações cruzadas (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2010). Além disso, esta técnica apresenta custo elevado e só pode ser realizada por laboratórios de referência, devido a necessidade de manutenção de uma grande variedade de sorovares (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2010). Já o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) é uma técnica sorológica alternativa, com vantagem em relação ao MAT devido a possibilidade de execução com treinamento e equipamento laboratorial mínimos, fornecendo resultados geralmente em 4h. Ademais, outro fator importante é que essa técnica dispensa a manutenção de culturas vivas, tornando o procedimento menos laborioso e seguro para a equipe laboratorial (PENNA et al., 2017).

O cultivo bacteriano foi por muito tempo a técnica de eleição para o diagnóstico de leptospirose, porém tem sido substituída por técnicas mais baratas e menos laboriosas (OIE, 2012). Esse método pode contribuir para o melhor entendimento da epidemiologia local da doença (CHAPPEL; SMYTHE, 2012), bem como o aumento da sensibilidade do diagnóstico sorológico devido a utilização de

262 cepas locais (SARMENTO et al., 2012), mas é preciso considerar que as
263 leptospiros são extremamente fastidiosas, e o isolamento além de difícil pode
264 demorar semanas. A Microscopia de Campo Escuro (DFM) é baseado na
265 observação direta do microrganismo sob microscopia, sendo necessário
266 aproximadamente 10^4 leptospiros/mL para a detecção visual. O resultado dessa
267 metodologia pode ser influenciado pela habilidade do operador, além da presença
268 de fibrina e outros artefatos que podem estar presentes na amostra (LOUREIRO
269 et al., 2013).

270 A PCR tem como vantagem a alta sensibilidade e especificidade para a
271 detecção de DNA leptospírico em amostras clínicas (HAMOND et al., 2014a),
272 porém, por não possibilitar a identificação dos organismos a nível de sorovar não é
273 indicada para estudos que envolvam epidemiologia (BOURHY et al., 2013). O
274 teste não requer a presença de microrganismos vivos e o diagnóstico precoce
275 pode ser realizado, uma vez que o DNA bacteriano pode ser detectado antes que
276 o hospedeiro desenvolva uma resposta imunológica à infecção (WAGGONER;
277 PINSKY, 2016). O gene *LipL32* é atualmente o alvo mais usado para a detecção
278 de *Leptospira*. Ele codifica uma lipoproteína de membrana externa que está
279 presente nas espécies patogênicas e ausente nas não patogênicas (STODDARD
280 et al. 2009). Após o diagnóstico, se o sequenciamento do DNA detectado puder ser
281 realizado, o gene *secY* é um ótimo marcador genético, pois além de uma boa
282 resolução taxonômica a nível de espécie, o banco de dados sobre esse gene é
283 extenso, incluindo diferentes espécies e sorogrupos, a identificação e o
284 estabelecimento de inferências filogenéticas (DI AZEVEDO; LILENBAUM, 2020).

285 2.5 TRATAMENTO DE GAMETAS E EMBRIÕES

286 Uma importante característica de embriões produzidos *in vitro* é a menor
287 rigidez e maior elasticidade da ZP, se comparadas a embriões produzidos *in vivo*,
288 devido principalmente a exposição a glicoproteínas presentes no fluido do oviduto
289 (HOLM et al., 2002). A ZP consiste em uma camada de matriz extracelular,
290 que circunda oócitos a partir do estágio pré-ovulatório e embriões. Para que um

patógeno seja capaz de causar infecção em oócitos e embriões é necessário, primeiramente, que alcance a membrana celular seja diretamente, quando se encontrar danificada e/ou removida ou penetrando a ZP, ou seus poros. Outro requisito importante é a capacidade de aderência dos patógenos a ZP, sendo que estes tendem a aderir de forma mais fixa a ZP de embriões produzidos *in vitro* (VAN SOOM, et al., 2010).

Utilizando *Leptospira interrogans* sorovar Grippotyphosa, oócitos bovinos foram experimentalmente infectados e submetidos a tratamentos com lavagens sequenciais contendo antimicrobianos (penicilina 10.000 UI/mL e estreptomicina 10 mg/mL), tripsina por 2 min ou somente o meio utilizado para a maturação dos oócitos (TCM-199). Foram utilizadas duas cepas sendo uma virulenta, na concentração $4,7 \times 10^5 \mu\text{L}^{-1}$ e outra avirulenta, na concentração de $6,3 \times 10^5 \mu\text{L}^{-1}$, ambas em volumes de 5, 10 ou 30 μL . Por meio de microscopia de campo escuro, foi possível avaliar que nos grupos submetidos a cepas virulentas e lavagens com antimicrobianos a efetividade foi de 50% (100/200) para o grupo exposto a 5 μL , 40% (80/200) para o exposto a 10 μL , e 22,5% (45/200) para os expostos a 30 μL . Em grupos tratados com tripsina, os resultados foram os mesmos. Após as lavagens sequenciais com TCM-199, os grupos infectados com 5 e 10 μL apresentaram 100% de efetividade, porém em grupos com 30 μL não houve eficiência. Com a cepa avirulenta, após o tratamento com antimicrobianos ou tripsina, não houve resultados efetivos em nenhum dos grupos. Apesar de que com a lavagem sequencial de TCM-199 o grupo exposto a 5 μL apresentou 28% (57/200) de efetividade, o exposto as concentrações de 10 e 30 μL não foram efetivos (GÓES et al., 2009). Os autores sugeriram que novas técnicas sejam utilizadas para a obtenção de resultados mais confiáveis, como exemplo a detecção do agente por PCR. O mesmo autor utilizou o volume de 30 μL para infectar oócitos bovinos, submetidos aos mesmos tratamentos. Com a concentração de $4,7 \times 10^5 \mu\text{L}^{-1}$, os tratamentos apresentaram, para os grupos tratados com tripsina e antibióticos, 22% de eficácia (39/180), e para o grupo lavado sequencialmente com

TCM-199, 33% de eficácia (60/180). Para os oócitos expostos à cepa avirulenta, os tratamentos não foram eficazes para nenhum dos grupos contaminados, em 160 oócitos de cada grupo (GÓES et al., 2012).

2.6 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (PIVE) BOVINOS

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem como principal objetivo o aumento da produção de prenhez de uma determinada fêmea com genética superior, diminuindo o intervalo de gerações e aumentando a pressão de seleção (YANG et al., 2013). A técnica apresenta como vantagens poder ser utilizada em fêmeas compatologias que a impeçam de se reproduzir naturalmente, em animais senis, novilhas pré-púberes, ou mesmo em fêmeas gestantes, além da facilidade de importar e exportar material genético (SCANAVEZ et al., 2013). Mundialmente, em bovinos, o número de embriões produzidos *in vitro* alcançou mais de um milhão e meio de registros em 2021, sendo aproximadamente 450 mil destes produzidos no Brasil (VIANA, 2022). Apesar desses fatores, a qualidade e a quantidade dos embriões produzidos *in vitro* podem ser reduzidas devido à da presença de agentes infecciosos no trato reprodutivo dos bovinos, podendo resultar em doenças nas receptoras e nos animais nascidos (STRINGFELLOW; GIVENS, 2000).

Para a obtenção de oócitos *in vivo*, um dos primeiros métodos utilizados em bovinos foi a laparotomia ventral mediana, porém o trauma cirúrgico causado pelo procedimento levou ao desenvolvimento de técnicas mais sofisticadas (DE SOUZA; ABADE, 2019). A biotécnica de aspiração folicular guiada por ultrassom ou *Ovum Pick-up* (OPU) é utilizada para a coleta do complexo *cumulus*-oócito (COC) de uma forma menos invasiva na espécie bovina (LUSTOSA et al., 2017). As biotecnologias da reprodução apresentam como vantagem a diminuição do risco de transmissão de doenças sexualmente transmissíveis (BONDURANT, 2005). Além dos agentes infecciosos em oócitos e sêmen, existe risco de infecção por meios e materiais de origem animal utilizados no processo de produção de embriões. Alguns suplementos de origem animal utilizados na PIVE são o soro

fetal bovino, tripsina e células utilizadas em co-cultivo, células da tuba uterina e células do *cumulus*-oócitos (BROCK, 1998). Outra importante fonte de contaminação é a exposição direta, durante a criopreservação ou quando são armazenadas em embalagens inapropriadas e expostas a nitrogênio líquido contaminado (BIELANSKI, 2010). A obtenção dos oócitos é seguida da maturação (MIV), fertilização (FIV), cultivo e posterior inovulação em fêmeas receptoras (LUEDKE et al., 2019).

A técnica de OPU é realizada de acordo com Loiola et al. (2015). Após a anestesia epidural sacra para o bloqueio da região perianal, de forma que o animal não sinta a punção folicular. Por meio de palpação retal ocorre o posicionamento do ovário próximo a região do fundo de saco vaginal, sendo utilizado um equipamento de ultrassonografia com transdutor microconvexo intra-vaginal, acoplado a uma guia de biópsia e agulha. Uma bomba a vácuo gera pressão negativa o suficiente para o FF seja aspirado pelo sistema e armazenado. O aspirado então é passado por um filtro, onde os COCs ficam retidos, para posterior triagem, classificação e maturação.

A classificação dos oócitos é feita baseada na morfologia, sendo os principais componentes a quantidade e adesão das células do *cumulus*-oócitos e a disposição do citoplasma (DEMETRIO e BARFIELD, 2021). Os oócitos de grau I possuem mais de 3 camadas compactas de células do *cumulus*, enquanto o citoplasma apresenta granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida. Os oócitos de grau II possuem células do *cumulus* de forma parcial, não revestindo completamente o oócito ou com menos de três camadas de células do *cumulus*, enquanto o citoplasma apresenta granulações distribuídas de forma heterogênea. O grau III é composto por oócitos com células do *cumulus* presente, porém menos compacto. O citoplasma se encontra degenerado, vacuolizado ou fragmentado e concentrado em uma determinada área, sendo possível observar espaços entre a membrana celular e a zona pelúcida. Já os oócitos de grau IV são aqueles desnudos e sem células do *cumulus*, enquanto o citoplasma possui cor e

granulações anormais, com células expandidas de aparência apoptótica. A etapa de maturação *in vitro* é necessária, pois quando os oócitos são aspirados do interior dos folículos ainda não estão aptos para a fecundação, devido a imaturidade do núcleo e do citoplasma (VARAGO et al., 2008). Durante o desenvolvimento oocitário, este se encontra no estágio de prófase I. O reinício da meiose é sinalizado *in vivo* pelo pico pré-ovulatório de LH, enquanto *in vitro* a retirada do oócito dos folículos é a sinalização para retomada da maturação nuclear, até a fase de metáfase II (GONÇALVES et al., 2007). Para que a maturação ocorra, são necessárias condições que mimetizem a ambiente *in vivo* (SANGILD, 2000). Comumente são adotados protocolos com a utilização de soro fetal bovino e hormônios gonadotróficos como o Hormônio Folículo Estimulante (FSH), Hormônio Luteinizante (LH) e Estradiol, além de ambiente com temperatura e atmosfera controladas (RODRIGUES et al., 2000). Além da temperatura e a concentração de gases, outros fatores como a osmolaridade e o pH do meio de maturação influenciam na taxa de maturação (SANGILD, 2000). Ao final da maturação, é possível observar a extrusão do primeiro corpúsculo polar, indicando que o oócito está hábil para a fecundação (AVELINO et al., 2002).

A FIV consiste na utilização de sêmen incubado juntamente aos oócitos maturados. Geralmente o sêmen é descongelado e passa por tratamento para a seleção de espermatozoides vivos, como exemplo o gradiente de Percoll e a técnica de *Swim-up* (BUENO; BELTRAN, 2008). O tempo de incubação e a concentração espermática são importantes para evitar a diminuição do potencial de desenvolvimento do oócito e fecundações anormais (RAMOS et al., 2000). A taxa de poliespermia e o maior tempo de contato dos oócitos com substâncias tóxicas liberadas pelos espermatozoides prejudicam o desenvolvimento embrionário (DIAS et al., 2006). O cultivo *in vitro* é a etapa de desenvolvimento do presumido zigoto ao estágio de embrião (DE SOUZA; ABADE, 2018). De acordo com o estágio de desenvolvimento os embriões podem ser classificados em Mórula, Mórula compacta, Blastocisto inicial, Blastocisto, Blastocisto expandido e Blastocisto eclodido (BÓ; MAPLETOFT, 2013). É durante esse período que ocorrem a

408 ativação do genoma embrionário, processo da divisão celular, compactação dos
409 blastômeros e início da diferenciação embrionária com formação da blastocele
410 (LIMA; SOUZA, 2009).

411

3 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

❖ CAPÍTULO I

A presença de *Leptospira* spp. em fluido folicular de vacas assintomáticas está relacionada a estirpes previamente identificadas como causadoras da leptospirose genital bovina.

❖ CAPÍTULO II

A presença de *Leptospira* no fluido folicular de vacas naturalmente infectadas pode prejudicar a competência ao desenvolvimento dos oócitos e a técnica de produção *in vitro* de embriões pode ser uma ferramenta confiável para confirmar essa hipótese.

431

432 4 OBJETIVOS

433 4.1 OBJETIVO GERAL

434 Investigar os impactos da infecção genital em vacas naturalmente
435 infectadas por *Leptospira* spp. na produção *in vitro* de embriões, bem como
436 caracterizar genotipicamente as estirpes relacionadas.

437

438 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

439

- 440 I- Identificar a prevalência de leptospirose genital bovina em vacas
441 naturalmente infectadas (Experimento 1);
- 442 II- Caracterizar genotipicamente as estirpes de *Leptospira* spp. identificadas
443 no FF de vacas naturalmente infectadas (Experimento 1);
- 444 III- Correlacionar a presença de *Leptospira* spp. no FF com a qualidade de
445 COCs obtidos pela técnica de *Ovum pick-up* (Experimento 2);
- 446 IV- Correlacionar a presença de *Leptospira* spp. no FF com a taxa de clivagem e
447 quantidade de blastocistos produzidos *in vitro* (Experimento 2).

448

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ÉTICA

Este estudo foi realizado conforme as orientações do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Fluminense (CEUA/UFF), sendo aprovado sob o número 8688190919 (Anexos). As amostras obtidas foram provenientes de laboratórios comerciais de produção *in vitro* de embriões que firmaram parceria com a nossa equipe de pesquisa.

5.2 LOCAIS DO ESTUDO

As coletas das amostras de FF foram realizadas em parceria com centrais de produção *in vitro* de embriões bovinos localizadas nos estados de Minas Gerais e São Paulo. Após a coleta dos COCs, os embriões foram produzidos nos respectivos laboratórios. As amostras coletadas foram processadas para detecção e cultivo de *Leptospira* spp. pelo Laboratório de Bacteriologia Veterinária, da Universidade Federal Fluminense (LaBV-UFF). O sequenciamento genético foi realizado em parceria com o Laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular da Fundação Oswaldo Cruz, através da plataforma do Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde (PDTIS Fiocruz).

5.3 DESENHO EXPERIMENTAL

A aspiração folicular guiada por ultrassonografia para coleta de fluido folicular (FF) e oócitos foi executada conforme descrito por Arashiro et al. (2013). O FF recuperado foi filtrado e uma alíquota mantida congelada a -20 °C até posterior análise. As amostras passaram por uma caracterização quanto a presença ou ausência de DNA de *Leptospira* spp. no FF por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (HAMOND et al., 2014), o que definiu os grupos: amostras positivas (POS-FF) ou amostras negativas (NEG-FF). A qualidade morfológica dos oócitos coletados foi avaliada e posteriormente submetida ao processo de maturação, fertilização (com sêmen adquirido de central idônea e touro sabidamente saudável) e cultivo *in vitro*. A competência ao

desenvolvimento dos oócitos foi avaliada por meio da taxa de clivagem e taxa de blastocistos (em função do número inicial de oócitos e do número de clivados) (SOUZA-FABJAN et al., 2014). Estas avaliações foram então comparadas entre aqueles oócitos e embriões provenientes de POS-FF e NEG-FF.

5.4 COLETA DO COC E FLUIDO FOLICULAR

Primeiramente, ocorreu a lavagem da vulva e da região perianal com água corrente e posterior antissepsia da região sacrococcígea utilizando álcool 70° GL. Sucedeu-se então realizada a anestesia epidural sacra, entre a quinta vértebra sacral e a primeira vértebra coccígea, utilizando 4,5 mL de cloridrato de lidocaína a 2% sem vaso constritor (Lidovet[®] - Bravet, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

A OPU foi realizada utilizando um equipamento portátil de ultrassonografia (Prosound 2[®] – Aloka-Hitachi, Twinsburg, Ohio, EUA) equipado com um transdutor microconvexo intra-vaginal (7,5 MHz) acoplado ao guia da agulha (WTA, Cravinhos, São Paulo, Brasil). É importante ressaltar que o transdutor foi protegido com uma bainha higiênica trocada a cada aspiração, para evitar a contaminação cruzada entre os animais. Foram utilizadas agulhas descartáveis 20G, próprias para aspiração folicular (WTA, Cravinhos, São Paulo, Brasil) conectadas a um circuito de teflon de 1,20 m de comprimento (WTA, Cravinhos, São Paulo, Brasil). Este circuito foi limpo entre aspirações de diferentes vacas usando meio PBS+ATB. O sistema conectado a uma bomba a vácuo (BV-003 WTA, Cravinhos, SP, Brasil) que gera uma pressão negativa (-80 mmHg e -100mmHg). O aspirado obtido foi então depositado em um tubo cônico e direcionado ao laboratório, onde o seu conteúdo foi vertido em um filtro para oócitos (WTA, Cravinhos, São Paulo, Brasil). Após a filtração, 2 mL foram armazenados em microtubo cônico e congelados a 25 °C até o processamento.

5.5 PIVE BOVINA

Quando da chegada do tubo cônico ao laboratório, o seu conteúdo foi lentamente vertido em um filtro de 75 µm (WTA, Cravinhos, São Paulo, Brasil) para eliminação de outras células e debris celulares, facilitando a visualização dos COCs. Houve uma lavagem suave do filtro utilizando solução de PBS aquecida a 37,5 °C, para que os COCs retidos no filtro fossem recuperados. Ocorreu então a deposição do lavado do filtro em uma placa de Petri plástica de 60 x 15 mm, sendo esta levada a um microscópio estereoscópio (NSZ 405[®] – Coleman, Santo André, São Paulo, Brasil) para o rastreamento e classificação dos COCs, seguindo o modelo descrito por Demetrio & Barfield (2021).

A MIV foi realizada em média por 24 h, e ocorreu em gotas de 70 µL de meio TCM-199 suplementado, aquecidas a 38 °C e sob 5% de CO₂. Cada gota contendo no máximo 30 estruturas depositadas em placas de Petri plásticas de 35 x 10 mm.

A MIV foi seguida pela lavagem dos oócitos maturados em 50 µL de meio F-TALP utilizado para a FIV, sendo transferidas para gotas de 60 µL. O sêmen congelado utilizado foi obtido de centrais de reprodução, provenientes de touros certificados. O descongelamento ocorreu em um descongelador (Descongelador de Sêmen e Embriões[®] – WTA, Cravinhos, São Paulo, Brasil) sob 35 °C durante 30 segundos, ocorrendo então a sua submissão a um gradiente de Percoll. O sêmen é adicionado a 250 µL de solução de Percoll a 38 °C, ocorrendo a centrifugação em 200 x *g* por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante é retirado e acrescido 400 µL de meio para FIV, ocorrendo nova centrifugação a 200 x *g* por 2 minutos, e então retirada o sobrenadante, sendo a solução restante homogeneizada e 6 µL utilizados na inseminação da gota. A FIV ocorreu em média durante 24 h em incubadora a 38,5 °C com 5 % de CO₂.

O cultivo foi realizado em meio SOF distribuído em gotas de 70 µL com no máximo 30 estruturas cada gota, em estufa sob as mesmas condições da FIV. Foram realizados dois *feedings*, o primeiro no quarto dia após o início da MIV, e o

segundo no sexto dia. A cada *feeding* é trocado 40 µL do meio de cultivo pela mesma quantidade de meio novo. No oitavo dia após o início da maturação ocorreu a passagem dos embriões que chegaram ao estágio de blastocisto para o meio H-SOF, e neste envasados em palhetas de 0,25 mL. As palhetas então foram lacradas e alocadas em transportador de oócitos e embriões a 38,5 °C, até a sua inovulação em receptoras. As taxas de PIVE foram correlacionados com a presença de *Leptospira* spp. no fluido folicular, de modo a investigar se esse microrganismo pode influenciar negativamente na qualidade dos oócitos e consequentemente prejudicar a viabilidade dessa técnica reprodutiva.

5.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A extração do DNA bacteriano do FF ocorreu utilizando-se o Kit DNeasy[®] Blood & Tissue (Promega Madison, USA), utilizado de acordo com as recomendações do fabricante. Para identificação do gene *lipL32*, presente em *Leptospira* spp. patogênicas (STODDARD et al., 2009), foram utilizados *primers* *lipL32_45F* (5' - AAGCATTACCGCTTGTGGTG - 3') e *lipL32_286R* (5' - GAACTCCCATTTCAGCGATT - 3'), que geram fragmentos de 242 pb, apresentando sensibilidade e especificidade próxima de 100% (STODDARD et al., 2009).

Os *primers* foram utilizados na concentração de 0,6 µM, 1,0 U Taq polimerase, 2,4 µM MgCl₂, 03 mM dNTP em um volume final de 25 µL. Foi feito um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 53 °C por 30 segundos e extensão por 1 minuto a 72 °C e por fim um ciclo de extensão a 72 °C por 5 minutos. Como controle positivo, utilizou-se uma cepa de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni, Fiocruz L1-130 (ATCC BAA-1198).

As amostras *lipL32* positivas foram submetidos a *nested-PCR* com alvo em uma região parcial do gene *secY* (410 pb), como descrito por Di Azevedo et al.

(2021). Para cada conjunto de amostras, água ultrapura foi usada como controle negativo, enquanto o DNA extraído de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni str. Fiocruz L1-130 foi utilizado como controle positivo. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% e visualizados sob luz ultravioleta após coloração com *gel red*.

5.7 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA

Os amplicons *secY* foram sequenciados usando um *Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)* em um 3100 *Automated DNA Sequencer* de acordo com as instruções do fabricante. Em relação à análise filogenética, foram utilizados os *softwares* Pairwise/ Blast/NCBI, SeqMan v. 7.0, ClustalX v 2.09 e BioEdit v. 7.0.1 para a edição e análise da sequência. Uma árvore de máxima verossimilhança foi construída usando o modelo Tamura-Nei (TN92) no *software* MEGA 11, pois foi determinado como modelo de substituição de DNA de melhor ajuste, pelo critério de informação Bayesiano.

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os parâmetros avaliados foram: taxas de COCs de boa qualidade (n de Grau 1 e 2 COCs $\times 100$ / n de oócitos totais recuperados por vaca); COCs viáveis (n de COCs Graus 1, 2 e 3 $\times 100$ / n de oócitos totais recuperados por vaca); clivagem (n de estruturas clivadas $\times 100$ / n de COCs viáveis); blastocisto/COCs viáveis (n de blastocistos $\times 100$ / n de COCs viáveis); e blastocisto/clivado (n de blastocistos $\times 100$ / n de estruturas clivadas); média de COCs de boa qualidade e blastocistos produzidos por fêmea.

6 CAPÍTULO I

Bovine genital leptospirosis: evidence of ovarian infection by *Leptospira interrogans*

*Leptospirose genital bovina: evidência de infecção ovariana por
Leptospira interrogans*

Artigo publicado no periódico: Veterinary Microbiology

Em: 17 de novembro de 2021

Qualis: A1 – Medicina Veterinária

Bovine genital leptospirosis: evidence of ovarian infection by *Leptospira interrogans*

Paulo Victor dos Santos Pereira^a, Maria Isabel Nogueira Di Azevedo^b, Ana Luiza dos Santos Baptista Borges^b, Ana Paula Loureiro^b, Gabriel Martins^b, Filipe Anibal Carvalho-Costa^c, Joanna Maria Gonçalves Souza-Fabjan^a, Walter Lilenbaum^b

^a Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rua Vital Brasil Filho, 64, Niterói, RJ CEP: 24320-340, Brazil.

^b Laboratório de Bacteriologia Veterinária, Instituto Biomédico, Niterói, Universidade Federal Fluminense, Alameda Barros Terra, 57, Niterói, RJ CEP: 24020-150, Brazil.

^c Laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.

Funding Information

Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro; Financiadora do Projeto.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; Financiadora de Estudos.

6.1 ABSTRACT

Leptospirosis in ruminants causes reproductive failures leading to important economic losses. This study assessed the occurrence and genetically identified *Leptospira* spp. in the follicular fluid (FF) of naturally infected live cows. A total of 251 asymptomatic cows from different commercial dairy herds were subjected to ovum-pick up technique for follicular fluid sampling. PCR was performed for *Leptospira* spp. detection and phylogenetic analysis was later implemented for sequencing. From 251 samples analyzed, 67 (26.7 %) were *lipL32*-PCR positive, confirming the presence of leptospiral DNA on FF. Furthermore, it was possible to amplify and sequence nine strains after *secY* nested-PCR. All of them were identified as *L. interrogans*, with 100 % of identity with strains belonging to Sejroe serogroup. Our findings reveal a high occurrence of infection of *Leptospira* in the ovarium of asymptomatic cows, highlighting the importance of considering the silent leptospirosis syndrome when screening animals for assisted reproductive biotechniques.

Keywords: Reproductive biotechniques; *lipL32*; *secY*; Sejroe serogroup.

6.2 INTRODUCTION

Leptospirosis is a worldwide zoonotic disease caused by pathogenic bacteria of the genus *Leptospira* (Ellis, 2015). Bovine leptospirosis can be clinically defined by a reproductive disease (Loureiro and Lilenbaum, 2020), leading to important economic losses. In addition to disorders such as stillbirth, birth of weak products (Ellis, 2015) and irregular estrus recurrence, early embryonic death is one of the consequences observed in infection by *Leptospira* spp. (Libonati et al., 2018; Oliveira et al., 2021). The mechanisms that lead to this result are still poorly understood, being of vital importance for the establishment of health management measures. Loureiro and Lilenbaum (2020), named this chronic, silent, and restricted to the genital tract as bovine genital leptospirosis (BGL).

In slaughterhouse-derived reproductive tissues, leptospiral infection has been detected in uteri, in 18 % of paraffined samples (Pires et al., 2018) and 26 % of fresh tissues (Di Azevedo et al., 2020) of cows, as well as, for the first time, in follicular fluid (FF), in 11 % of cows (Di Azevedo et al., 2021). However, these data could be biased/overestimated due to their slaughterhouse origin, since reproductive failure is a common cause of slaughter. Due to these intriguing results, we designed the present study, with a larger number of samples obtained from asymptomatic live cows of different herds subjected to *in vitro* embryo production routines. Based on this, the present study aimed to investigate the possibility of *Leptospira* spp. infection in ovaries of naturally infected live cows.

6.3 METHODS

This study was carried out after approval of the Animal Ethics Committee of the Universidade Federal Fluminense (protocol #8688190919). A total of 251 crossbred pluriparous cows from different commercial dairy herds of medium to a high degree of technification and with no apparent clinical signs of leptospirosis were used.

The sampling of FF was performed using the ultrasound-guided follicular aspiration technique or *ovum* pick-up (OPU) (Arashiro et al., 2013). OPU was performed using a portable ultrasound apparatus (Prosound 2® - Aloka-Hitachi, Twinsburg, Ohio, USA) equipped with an intra-vaginal microconvex transducer (7.5 MHz) attached to the needle guide (WTA, Cravinhos, SP, Brazil). Aiming to preserve the health status of oocyte donors as well as the quality of the future embryos, the needle guide system was wrapped in a sanitary sheath, avoiding the contact of the needle with urine and vaginal microbiota. During collection, the sanitary sheath was broken after passing the urinary ostium, allowing the needle to be exposed only in the region of the vaginal fornix. After the OPU of each animal, the sanitary sheath and the needle were replaced to avoid cross-contamination. This procedure prevented contamination of the follicular aspirate with *Leptospira* from a site other than the ovary. The aspirate was poured into an embryo collection cup (WTA) and, after filtration, 2 mL were frozen at - 25 °C, until molecular analysis.

DNA was extracted using a DNeasy® Blood & Tissue Kit (Promega, Madison, EUA), following the manufacturer's instructions. PCR was first performed targeting the *lipL32* gene for *Leptospira* spp. detection (Hamond et al., 2015). Afterwards, *lipL32* positive samples were subjected to a nested PCR targeting a partial region of the *secY* gene (410 bp) – a genetic marker with a good taxonomic resolution for *Leptospira* species definition and for establishing relationships with related strains (Di Azevedo and Lilenbaum, 2021; Lam et al., 2020) - as described by Grillová et al. (2020). For each set of samples, ultrapure water was used as a negative control, while DNA extracted from *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni str. Fiocruz L1-130 was used as a positive control. PCR products were analyzed by electrophoresis in 2 % agarose gel and visualized under UV light after gel red staining. *SecY* amplicons were directly sequenced using a Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) in a 3100 Automated DNA Sequencer according to the manufacturer's instructions.

Regarding phylogenetic analysis, Pairwise/Blast/NCBI, SeqMan v. 7.0, ClustalX v 2.0 (Larkin et al., 2007) and BioEdit v. 7.0.1 (Hall, 1999) software were used for the editing and sequence analysis. A maximum likelihood tree was constructed using the Tamura-Nei model (TN92) in MEGA X software (Kumar et al., 2018), as it was determined to be the best-fitting model of DNA substitution, by the Bayesian information criterion.

6.4. RESULTS

From 251 samples analyzed, 67 (26.7 %) were *lipL32*-PCR positive, confirming the presence of leptospiral DNA in FF of cows. From these, it was possible to amplify and sequence nine strains after *secY* nested-PCR, producing a 410 bp fragment. Sequences were deposited on GenBank under accession nos. MZ773519 – MZ773527. Pairwise/Blast/NCBI comparisons with the GenBank *secY* gene dataset identified all of them as *L. interrogans*, with 100 % of identity with strains belonging to Sejroe serogroup, most probably genotype Hardjo. Phylogenetic analysis based on mL-TN92 tree included sequences from the present study and GenBank *secY* *Leptospira* spp. sequences from bovine, including species and serovars most commonly identified in cattle. It was possible to observe sequences from the present study clustering with maximum support (bootstrap = 100 %) with *L. interrogans* species (Fig. 1), confirming species identity. Moreover, they formed a subcluster with sequences belonging to Sejroe serogroup, serovar Hardjo, all from the same geographical location (grey rectangle on Fig. 1). Not surprisingly, this subcluster also included sequences previously deposited by our group from *L. interrogans* serogroup Sejroe from FF (FF 13) and uterine fragment (UF 24 and UF 21).

6.5. DISCUSSION

Our findings demonstrate the leptospiral infection in the ovaries of cows used on *in vitro* embryo production programs, even greater than the 11 % previously reported in slaughterhouse cows (Di Azevedo et al., 2021). Surprisingly,

encouraged by the results of the previous study, when we decided to increase the number of studied cows and tried to eliminate the possible bias of culled animals, instead of the expected lower occurrence, we have observed more than twice the rate of PCR-positive follicular fluids samples. This scenario is challenging, since the animals did not present apparent symptoms of infection, making it difficult to diagnose and control leptospirosis. In this study, due to the fact that cows are used as oocyte donors and are rarely pregnant, together with the fact that this disease is chronic and silent, signs such as early embryonic death and irregular repetition of estrus are rarely observed. This silent aspect of leptospirosis in cattle has already been described (Ellis, 2015; Libonati et al., 2018; Loureiro and Lilenbaum, 2020; Di Azevedo et al., 2020) and was reinforced by the present study. In the current study, we aimed to assess specifically the disease caused by genital infection, as our research group previously demonstrated (Loureiro et al., 2017; Libonati et al., 2018; Pires et al., 2018; Di Azevedo et al., 2020, 2021; Oliveira et al., 2021). We believe that there is enough evidence in the literature pointing to the fact that the infection affecting kidney and the reproductive tract are distinct, caused by different *Leptospira* strains, and they do lead to different diseases (Loureiro and Lilenbaum, 2020).

The present outcomes corroborate with Di Azevedo et al. (2021) that genetically identify *Leptospira* spp. in FF of naturally infected cows. Differently from this, the current study reports a large number of samples originated of cows from different herds. Interestingly, the animals were clinically healthy by veterinary evaluation and included in a program of bovine in vitro embryo production.

Molecular analyses identified the amplicons belonging to *L. interrogans* with high proximity to Hardjoprajitno type strains, belonging to Sejroe serogroup. Those strains are frequently related to reproductive infection in cows detected in uterine tissue (Ellis and Thiermann, 1986; Pires et al., 2018; Di Azevedo et al., 2020), FF (Di Azevedo et al., 2021), and aborted fetuses (Ellis et al., 1982). Members of this serogroup are related with chronic infection in ruminants (Rocha et al., 2018) and

strongly associated with uterine infection in hamsters (Pinto et al., 2020). Seroreactivity against this serogroup is often associated with reproductive problems in cows (Fávero et al., 2017), such as estrus repetition (Libonati et al., 2018; Oliveira et al., 2021). Ellis (2015) describes cattle as a maintenance host for strains of Sejroe serogroup, including strains that have preference and certain level of adaptation to genital tract.

6.6. CONCLUSION

The present study confirms the ovarian infection caused by strains of *Leptospira interrogans* belonging to Sejroe serogroup, historically associated with reproductive problems, using a large number of samples in asymptomatic cows. These findings raise the importance of considering this chronic and silent syndrome when screening animals for reproductive biotechniques, due to the high cost involved.

Declaration of Competing Interest

The authors report no declarations of interest.

Acknowledgements

The authors are grateful for the help of Arthur Almeida, Luciano Carvalheira, Nathalia Barbosa, Rodrigo Rodrigues, Rafaela Oliveira, Tamara Coelho, and Wesley Donizetti for assistance in the FF collection. We thank to the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS/FIOCRUZ for allowing us to use its facilities. We thank to Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) for partially

funding the study (Finance code 001). PVSP is a CAPES fellow, MINDA is a FAPERJ fellow; FACC, JMGS-F, and WL are FAPERJ and CNPq fellows.

6.7. REFERENCES

Arashiro, E.K., Palhao, M.P., Wohlrres-Viana, S., Siqueira, L.G., Camargo, L.S., Henry, M., Viana, J.H., 2013. *In vivo* collection of follicular fluid and granulosa cells from individual follicles of different diameters in cattle by an adapted *ovum* pick-up system. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 11 (1), 1–8.

Di Azevedo, M.I.N., Lilenbaum, W., 2021. An overview on the molecular diagnosis of animal leptospirosis. *Lett. Appl. Microbiol.* 72 (5), 496–508.

Di Azevedo, M.I.N., Pires, B.C., Libonati, H., Pinto, P.S., Barbosa, L.F.C., Carvalho-Costa, F.A., Lilenbaum, W., 2020. Extra-renal bovine leptospirosis: molecular characterization of the *Leptospira interrogans* Sejroe serogroup on the uterus of nonpregnant cows. *Vet. Microbiol.* 250, 108869.

Di Azevedo, M.I.N., Pires, B.C., Barbosa, L.F.C., Carvalho-Costa, F.A., Lilenbaum, W., 2021. Characterization of leptospiral DNA in the follicular fluid of non-pregnant cows. *Vet. Rec.* 188 (9), e134.

Ellis, W.A., O'brien, J.J., Neill, S.D., Ferguson, H.W., Hanna, J., 1982. Bovine leptospirosis: microbiological and serological findings in aborted fetuses. *Vet. Rec.* 110 (7), 147–150.

Ellis, W.A., Thiermann, A.B., 1986. Isolation of leptospires from the genital tracts of Iowa cows. *Am. J. Vet. Res.* 47, 1694–1696.

Ellis, W.A., 2015. Animal leptospirosis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 387, 99–137.

- 805 Fávero, J.F., de Araújo, H.L., Lilenbaum, W., Machado, G., Tonin, A.A.,
806 Baldissera, M.D., Stefani, L.M., Da Silva, A.S., 2017. Bovine leptospirosis:
807 prevalence, associated risk factors for infection and their cause-effect relation.
808 Microb. Pathog. 107, 149–154.
- 809 Grillová, L., Angermeier, H., Levy, M., Giard, M., Lastère, S., Picardeau, M.,
810 2020. Circulating genotypes of *Leptospira* in French Polynesia: a 9-year molecular
811 epidemiology surveillance follow-up study. PLoS Negl. Trop. Dis. 14 (9), e0008662,
812 28.
- 813 Hall, T., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor
814 and analysis program for Windows95/98/NT. Nucl. Acids Symp. 41, 95–98.
- 815 Hamond, C., Pestana, C.P., Rocha-de-Souza, C.M., Cunha, L.E.R.,
816 Brandão, F.Z., Medeiros, M.A., Lilenbaum, W., 2015. Presence of leptospires on
817 genital tract of mares with reproductive problems. Vet. Microbiol. 179, 264–269.
- 818 Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X:
819 molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Mol. Biol.
820 Evol. 35, 1547–1549.
- 821 Lam, J.Y., Low, G.K., Chee, H.Y., 2020. Diagnostic accuracy of genetic
822 markers and nucleic acid techniques for the detection of *Leptospira* in clinical
823 samples: a metaanalysis. PLoS Negl. Trop. Dis. 14, e0008074.
- 824 Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A.,
825 McWilliam, H., Valentim, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D.,
826 Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0.
827 Bioinformatics 23 (21), 2947–2948.
- 828 Libonati, H.A., Santos, G.B., Souza, G.N., Brandão, F.Z., Lilenbaum, W.,
829 2018. Leptospirosis is strongly associated to estrus repetition on cattle. Trop. Anim.
830 Health Prod. 50, 1625–1629.

Loureiro, A.P., Lilenbaum, W., 2020. Bovine genital leptospirosis: a new look for an old disease. *Theriogenology* 141, 41–47.

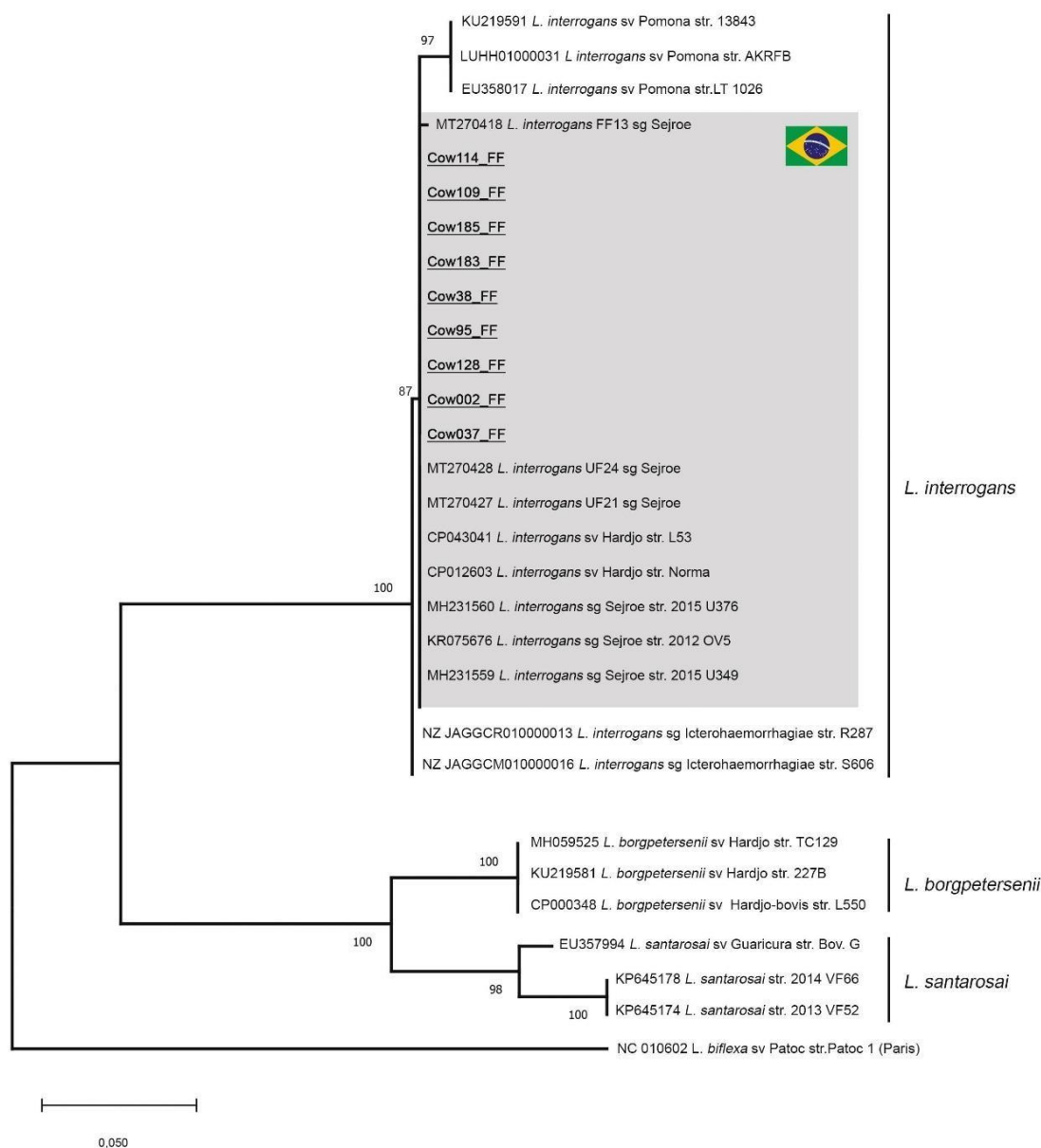
Loureiro, A.P., Pestana, C., Medeiros, M.A., Lilenbaum, W., et al., 2017. High frequency of leptospiral vaginal carriers among slaughtered cows. *Anim. Reprod. Sci.* 178, 50–54. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.01.008>.

Oliveira, G.D.M., Garcia, L.A.N., Soares, L.A.P., Lilenbaum, W., de Souza, G.N., 2021. Leptospirosis by Sejroe strains leads to embryonic death (ED) in herds with reproductive disorders. *Theriogenology* 174, 121–123.

Pinto, P.S., Barbosa, C., Ferreira, A.M.R., Lilenbaum, W., 2020. Uterine leptospiral infection is strongly associated to strains of serogroup Sejroe on experimentally infected hamsters. *Microb. Pathog.* 142, 104030.

Pires, B.C., Berzin Grapiglia, J., Moreira, L., Jaeger, L.H., Carvalho-Costa, F.A., Lilenbaum, W., 2018. Occurrence of uterine carriers for *Leptospira interrogans* on slaughtered cows. *Microb. Pathog.* 114, 163–165.

Rocha, B.R., Balaro, M., Pereira, P.V., Martins, G., Lilenbaum, W., 2018. Chronic experimental genital leptospirosis with autochthonous *Leptospira santarosai* strains of serogroup Sejroe. *Small Rumin.* 164, 28–31.



848

849 Fig. 1. Maximum likelihood phylogenetic tree inferred from partial *secY* gene
850 sequences (410 bp) from the present study (bold and underlined) and GenBank
851 sequences from *Leptospira* spp. most common identified in bovine (serovars,
852 strains and accession numbers are shown). Gray rectangle with Brazilian flag
853 represents sequences from *L. interrogans* serogroup Sejroe from the same
854 geographical region. *Leptospira biflexa* strain Patoc is the outgroup taxa.

7 CAPÍTULO II

The presence of *Leptospira* sp. in the follicular fluid affects the oocyte developmental competence during *in vitro* embryo production

A presença de Leptospira sp. no fluido folicular afeta a competência ao desenvolvimento do oócito durante a produção in vitro de embriões

Artigo em preparo para submissão

**The presence of *Leptospira* sp. in the follicular fluid affects the oocyte
developmental competence during *in vitro* embryo production**

Paulo Victor dos Santos Pereira^a, Maria Isabel Nogueira Di Azevedo^b, Eduardo
Kenji Nunes Arashiro^a, Yeda Fumie Watanabe^c, Walter Lilenbaum^b, Joanna Maria
Gonçalves Souza-Fabjan^a

^a Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rua Vital Brasil
Filho, 64, Niterói, RJ CEP: 24320-340, Brazil.

^b Laboratório de Bacteriologia Veterinária, Instituto Biomédico, Niterói,
Universidade Federal Fluminense, Alameda Barros Terra, 57, Niterói, RJ CEP:
24020-150, Brazil.

^c Watanabe Tecnologia Aplicada, Avenida Coronel José Nogueira Terra, 233,
Cravinhos, SP, CEP: 14140-000, Brazil.

Funding Information

Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de
Janeiro; Financiadora de Estudos e Projeto.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; Financiadora de
Estudos.

7.1 ABSTRACT

Leptospirosis has an important role among infectious diseases that affect reproductive efficiency. The relationship between *Leptospira* infection and reproductive failures, as well as the mechanisms that lead to it, have not yet been established. We hypothesize that the presence of *Leptospira* in the follicular fluid (FF) of naturally infected cows could impair the oocyte developmental competence. Thus, the present study evaluated the impact of the presence of *Leptospira* spp. in the FF on *in vitro* embryo production outcomes. A total of 244 multiparous crossbred donor dairy cows belonging to different farms subjected to the *ovum* pick-up were used. After PCR analysis, cows were retrospectively allocated into either: POS-FF (positive) or NEG-FF (negative) group, i.e., the bacterial DNA presence was or was not detected in the FF, respectively. Of note, 65% of farms had at least one POS-FF cow for *Leptospira* in the herd, with the POS-FF rate varying between one and 15 animals within each farm (13% to 60%). The NEG-FF and POS-FF cows presented, respectively: 88.2 ± 1.0 and $92.8 \pm 1.6\%$ of viable COCs ($P < 0.05$), 75.7 ± 1.3 and $76.0 \pm 2.5\%$ of good-quality COCs ($P > 0.05$), and of 66 ± 1.6 and $63 \pm 2.6\%$ of cleavage rate ($P > 0.05$). The blastocyst rates, however, were greater ($P < 0.05$) in the NEG-FF cows: 41 ± 2.2 vs $32 \pm 3.6\%$ for the blastocyst/cleaved embryos and 28 ± 1.7 vs $20 \pm 2.4\%$ for the blastocyst/viable COC rate. In conclusion, the presence of *Leptospira* spp. in the FF of naturally infected cows did not affect the COC morphology and its nuclear maturation; however, it impaired the oocyte developmental competence, decreasing the overall efficiency of *in vitro* embryo production technique. It remains to be elucidated if the effect of *Leptospira* spp. in the FF is either direct, indirect, or both; this definition will aid the implementation of control measurements.

Keywords: bovine genital leptospirosis, embryonic death, FIV, IVEP.

7.2 INTRODUCTION

Reproductive efficiency is the factor that mostly affects the productivity and profitability of cattle herds [1]. *In vitro* embryo production (IVEP) aims to increase the multiplication of females with greater genetic merit, including those with acquired subfertility or infertility [2], and reduce the generation interval [3]. This technology is well spread worldwide in the bovine industry, and currently is the most used technique for bovine embryo production, surpassing the number of embryos produced *in vivo* [4]. Despite the great dissemination of IVEP, it is well known that the quality and quantity of the resulting embryos can be reduced due to the presence of infectious agents in the female reproductive tract, which could also be transmitted to the recipients and progeny [5].

Among the infectious diseases that affect reproductive efficiency, leptospirosis has an important role. This zoonosis is caused by spirochetes of the genus *Leptospira*, which are cosmopolitan organisms responsible for disease in animals and humans [6]. Due to its ability to be a silent disease [7], the overall reproductive outcomes can be compromised, leading to major economic losses [8]. In addition to disorders such as fetal losses, the birth of weak offspring [9], and irregular estrus recurrence [10], embryo death is one of the consequences observed in the genital syndrome of leptospirosis [11]. The mechanisms by which the latter happens are still poorly understood, even though they are of vital importance for the establishment of appropriate health management measures.

In cows destined for slaughter, our group detected *Leptospira* spp. by PCR in 26% (11/42) of uterine fragments [12] and 11% (7/65) of FF samples [13]. Interestingly, in a different study, when using specifically cows destined for slaughter due to reproductive problems, 37% (18/48) of the females were positive for *Leptospira* spp. in genital samples [14]. Although the number of observations was low, it is interesting to note that when nine cows with a history of subfertility were examined, six of them (66%) were positive for *Leptospira* spp. [15]. To highlight the economic losses caused by the *Leptospira* spp. presence in the

reproductive tract, when the same cows were assessed monthly throughout one year, 75% of reactive animals showed a history of embryonic death, while 20% of them had miscarriages [11].

In cattle, the Sejroe serogroup is adapted and has a major role in the colonization of the reproductive tract, particularly Hardjo serovars as Hardjoprajitno and Hardjobovis [17], as well as Guaricura [14] strains. The evidence indicates that these strains have been associated with the silent and chronic reproductive form of the disease, named bovine genital leptospirosis (BGL) [18], and have been reported on cervicovaginal mucus [19], uteri [20, 12, 15, 14], and follicular fluid (FF) [13, 21]. Two main hypotheses have been considered [18] about embryonic losses and consequent estrus repetition, as a result of BGL: the first one, the bacterium infects the uterus, generating a local inflammation and altering the uterine environment, consequently compromising the implantation and survival of the embryo; while in the second hypothesis, the bacteria penetrate the embryo and directly damage the embryonic cells. Progress made by different research groups lead to a third hypothesis, in which Gram-negative bacteria present in the FF cause indirect damage to the oocyte, either by experimental infection [22, 23] or by natural infection [24, 25]. The cell and outer envelope of *Leptospira* are similar to that of Gram-negative bacteria and are composed of lipopolysaccharides (LPS) [17]. The presence of LPS in the FF may have negative consequences on fertility due to interference with ovarian steroidogenesis [24] and the developmental competence of oocytes [22, 23], causing reproductive failure [25].

The relationship between *Leptospira* infection and reproductive failures, as well as the mechanisms that lead to it, have not yet been established. We hypothesize that the presence of *Leptospira* in the FF of naturally infected cows could impair the developmental competence of the derived oocytes and we used the IVEP technique to reliably test it. Based on this, the present study aimed to determine the effect of FF natural *Leptospira* spp. infection on the oocyte developmental competence and overall efficiency of *in vitro* embryo production.

7.3 MATERIAL AND METHODS

7.3.1 ETHICS, LOCATION, AND EXPERIMENTAL CONDITIONS

This study was carried out according to the guidelines of the Ethics Committee on the Use of Animals of the Federal Fluminense University (CEUA / UFF), being approved under the number 8688190919. Sample collections and the entire IVEP procedure were both carried out in four distinct laboratories that signed partnerships. A total of 244 non-pregnant multiparous crossbreed dairy cows with no apparent clinical signs of leptospirosis, belonging to 20 different commercial herds of medium to a high degree of technification, in Minas Gerais and São Paulo States, Brazil, were used. On a random day of the estrous cycle, the collection of *cumulus*-oocyte complexes (COCs) and FF was performed in antral follicles using the *ovum* pick-up technique (OPU). Within the Laboratory of Veterinary Bacteriology of UFF, the FF obtained was subjected to PCR to identify the presence of *Leptospira* spp. DNA and the animals were further allocated into either: POS-FF (positive) or NEG-FF (negative) group. The viable COCs were submitted to the IVEP (COCs from each female were kept separately in each well/drop throughout the culture), and all the outcomes were compared in both groups, to demonstrate whether the presence of *Leptospira* spp. may decrease the overall effectiveness of IVEP.

7.3.2 COLLECTION OF COCS AND FF

Sacral epidural anesthesia was performed between the fifth sacral vertebra and the first coccygeal vertebra, using 4.5 mL of 2% lidocaine hydrochloride (Lidovet® - Bravet, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). The sampling of FF was performed by the OPU technique [26], aided by a portable ultrasound equipment (Prosound 2® - Aloka-Hitachi, Twinsburg, Ohio, USA) equipped with an intra-vaginal micro convex transducer (7.5 MHz) attached to the needle guide (WTA, Cravinhos, São Paulo, Brazil). Importantly, the transducer was protected with a sanitary sheath changed at every aspiration, to avoid cross-contamination between animals. The aspiration was performed using disposable 20G needles (WTA) connected to a

1.20 m Teflon circuit (WTA). This circuit was cleaned between aspirations from different cows using PBS+ATB medium. The system was then connected to a vacuum pump (BV-003 WTA) that generates a negative pressure (-80 mmHg and -100 mmHg). The aspirate was then deposited in a 50 mL conic tube, which was sent to the laboratory, where its contents were poured into an oocyte filter (WTA). After filtration, 2 mL of FF+aspirate medium were stored in a conical microtube and frozen at -25 °C until DNA extraction for *Leptospira* identification.

7.3.3 IVEP

7.3.3.1 SCREENING AND CLASSIFICATION

The follicular aspirate was filtered into a 75 µm filter (WTA) to eliminate other cells and cellular debris, facilitating the visualization of COCs. The filter was smoothly washed using PBS + gentamicin (IMV Technologies, Campinas, São Paulo, Brazil) solution heated to 37.5 °C so that the COCs retained in the filter are retrieved. The COCs were then deposited on a 60 x 15 mm plastic Petri dish, which was taken to a stereoscope microscope (NSZ 405® - Coleman, Santo André, São Paulo, Brazil) for classification. The classification of COCs was based on their number of *cumulus* cell layers and the appearance and texture of the ooplasm. All laboratories used the classification in four stages: Grade I (COCs with homogeneous ooplasm and multiple layers of *cumulus* cells), Grade II (COCs with granules in the ooplasm and with at least four layers of *cumulus* cells), Grade III (COCs containing at least one to three layers of *cumulus* cells or granules in the cytoplasm), and Grade IV (COCs with degeneration or absence of *cumulus* cells and heterogeneous ooplasm). Those COCs classified as Grade I and Grade II were rated as good quality; Grade I, Grade II, and Grade III were considered viable and used in the *in vitro* maturation step. Grade IV COCs were considered degenerated and discarded.

7.3.3.2 IVM OF OOCYTES

Due to the number of laboratories involved in this study, the methodology differs slightly from one laboratory to another. In general, all companies used commercial media based on TCM-199 medium supplemented with hormones and other substances, depending on each laboratory. After recovery, approximately 10 to 30 COCs were washed and transferred to four-well dishes containing 500 μ L of supplemented media. The IVM step was considered as Day 0 and occurred under mineral oil for an average of 22 to 24 h at 38.5 °C and under 5% CO₂ in humidified air.

7.3.3.3 IVF OF EMBRYOS

After the IVM, the matured oocytes were washed in 50 μ L of F-TALP medium used for IVF and transferred to 60 μ L drops on a plastic Petri dish. All semen straws used were obtained from breeding centers, from certified bulls with negative serology for *Leptospira* spp.. Thawing was performed in a defroster (Semen and Embryo®, WTA) under 35 °C for 30 s, then semen was submitted to a Percoll gradient. After centrifugation, the supernatant was removed and 400 μ L of IVF medium was added, with new centrifugation at 200 x *g* for 5 min. Then, the supernatant was removed, the remaining solution was homogenized, and 6 μ L was used to inseminate the drop. IVF occurred using a concentration of 1x10⁶ spermatozoa/mL for 24 h at 38.5 °C with 5% CO₂ in humidified air.

7.3.3.4 IVC OF EMBRYOS

After 18 h of fertilization, presumptive zygotes were gently pipette to mechanically remove the *cumulus* cell. Then, they were cultured *in vitro* in synthetic oviduct fluid (SOF) medium supplemented according to each laboratory in 70 μ L drops containing 10 to 30 structures for 8 d at 38.5 °C, in a humidified atmosphere with 5% CO₂. The culture medium was renewed on the 4th day and on the 6th day. Embryo cleavage was assessed at 48 h post-fertilization and the blastocyst rate was evaluated on the 7th day. On the 8th day after the beginning of IVM, the embryos that reached the blastocyst stage were transferred to 0.25 mL

straws with H-SOF medium. The straws were then sealed and placed in an embryo transporter (WTA) at 38 °C, until their transfer to recipients.

7.3.4 MOLECULAR DIAGNOSIS AND GENETIC ANALYSIS OF *LEPTOSPIRA* SPP.

FF samples (n=240) were submitted to DNA extraction, followed by *lipL32*-PCR, *secY* gene sequencing, and phylogenetic analysis, according to dos Santos Pereira [21]. DNA was extracted using a DNeasy® Blood & Tissue Kit (Promega, Madison, EUA), following the manufacturer's instructions. Polymerase chain reaction (PCR) was first performed targeting the *lipL32* gene for *Leptospira* spp. detection [27]. Afterward, *lipL32* positive samples were subjected to a nested PCR targeting a partial region of the *secY* gene. Regarding phylogenetic analysis, the Pairwise/Blast/NCBI, SeqMan v. 7.0, Clustal X v 2.0 [28] and BioEdit v. 7.0.1 [29] softwares were used for the editing and sequence analysis. The phylogenetic characterization of the *Leptospira* spp. detected was published in a previous study [21].

7.3.5 ENDPOINTS AND STATISTICAL ANALYSIS

Endpoints determined were: rates of good-quality COCs (nb of Grade 1 and 2 COCs $\times 100$ / nb of total oocytes recovered per cow); viable COCs (nb of Grade 1, 2 and 3 COCs $\times 100$ / nb of total oocytes recovered per cow); cleavage (nb of cleaved structures $\times 100$ / nb of viable COCs); blastocyst /viable COCs (nb of blastocysts $\times 100$ / nb of viable COCs); and blastocyst/cleaved (nb of blastocysts $\times 100$ / nb of cleaved structures). The viable COCs, cleavage, and blastocyst rates were submitted to angular transformation (arccosine) and analyzed by ANOVA, considering $P < 0.05$ as significant.

7.4 RESULTS

Of the 20 herds evaluated, 13 (65%) of them had at least one POS-FF cow for *Leptospira*, with the POS-FF rate varying between one and 15 animals within each farm (13% to 60%). Regarding the average of structures obtained from each

group, the NEG-FF group presented an average of 4.349 viable COCs used in the IVEP system, generating 2.666 cleaved structures and 1.139 blastocysts. The POS-FF group presented 1.423 viable COCs, 799 cleaved structures and 253 blastocysts. The IVEP outcomes are summarized in Table 1. The viable COCs rate was higher ($P<0.05$) in POS-FF. Nevertheless, the good-quality COCs and cleavage rates were similar ($P>0.05$) between both groups. The presence of *Leptospira* spp. negatively affected ($P<0.05$) both blastocyst rates, decreasing those by ~ 9% in the POS-FF cows.

7.5 DISCUSSION

Our study used the IVEP technique as a tool to assess the oocyte developmental competence of cows naturally infected with *Leptospira* spp. in their FF. We were able to demonstrate, for the first time, that the presence of *Leptospira* spp. in the FF significantly impairs oocyte competence, confirming our hypothesis. The number of good-quality COCs and cleavage rate were not significantly affected by the leptospiral infection. Interestingly, the presence of leptospires in the FF negatively impacted the blastocyst yield. The number of viable COCs was greater in the POS-FF group, although we believe this may be a random result since there is no plausible biological explanation for this; it could also be related to the intrinsic variation of COCs recovered among donors [30]. The COC morphology before the IVM remains to be the main strategy worldwide for its selection, even though it is known this is not a reliable parameter to predict their competence for development [31].

The exact mechanism triggered by the presence of leptospires in FF on the oocyte developmental competence is yet to be determined. It can be attributed to a direct damage to the oocytes, caused by the penetration of the bacterium into the oocyte [32], or indirect damage, which can be generated due to the presence, even in small amounts, of LPS endotoxin, which is known to be responsible for ovarian dysfunction [33, 34, 35]. The former was evidenced by the presence of leptospiral DNA in oocytes from experimentally infected cows [32] or in an *in vitro* system,

where penetration through the zona pellucida and damage to embryonic membranes and cytoplasm occurred [36]. The latter would be caused by the simple presence of this pathogen in the ovarian follicle, being triggered by LPS, negatively impacting reproductive performance and fertility [37]. The presence of this compound in FF is associated with disturbance in ovarian steroidogenesis [24] and oocyte competence [22, 23], causing reproductive failure [25]. Regarding the uterine mechanism/hypothesis previously raised for the BGL [18], we cannot rule out the possibility of simultaneous infection in the uterus, which should be tested in a further study.

In the current study, regardless of the type (direct or indirect) of damage, it is likely that the bacterium negatively influenced the cytoplasmic maturation of the oocyte, compromising its development to the blastocyst stage [35]. It is well-known that cytoplasmic maturation occurs during ovarian folliculogenesis. During this period, the oocyte undergoes gradual capacitation that involves ultrastructural changes in organelles, and in the storage of RNA and proteins [38], which together with nuclear meiotic capacitation, are responsible for the acquisition of essential cellular functions for oocyte competence [39]. This competence is essential for the oocytes to properly overcome the 8–16 cells stage, the period of bovine embryonic genome activation, reaching soon after the blastocyst stage [40].

The cleavage rate was not significantly different between both groups. This is probably related to the fact that, in addition to the sperm, an adequate nuclear maturation of the oocyte is usually enough for cleavage to occur. It is important to emphasize that the cleavage rate observed in this study (on average 65%) was similar to or slightly lower than those observed in previous studies: 74% [41] and from 70% to 85% [42]. Two aspects may be considered indeed. In this study, no hormonal stimulation was applied, an approach usually different from other countries, but commonly used in Brazilian commercial herds since, despite affecting the number of embryos produced, the cost-benefit is not always positive [43]. Moreover, the cleavage and blastocyst rates presented are taking into

consideration the use of Grade III COCs, which are usually discarded worldwide in research studies, i.e., those not performed in commercial centers. These facts may be responsible for any slight decrease in those rates compared to the literature.

The developmental competence was decreased in POS-FF cows since the rates of blastocysts calculated from either total viable COCs or cleaved embryos were both significantly lower in comparison with the NEG-FF cows. The rate of blastocyst from the initial number of viable COCs is a reflex of the entire IVEP success. On the other hand, the blastocyst rate from the cleaved embryos is of extreme importance regarding the cytoplasmic competence, since it exclusively provides information about those embryos that were able to overcome the genome activation stage [44]. Overall, our findings suggest that *Leptospira* spp. was not able to impact the nuclear maturation, but there tended to affect cytoplasmic maturation. Of note, in the current study, the blastocyst yield in all groups was within the normal rates reported in the worldwide literature [45, 46, 47, 41, 42]. This fact is somehow worrying, since animals were asymptomatic and their blastocyst yield, despite having decreased in POS-FF group, was still within the normal range. Therefore, perhaps the true production potential of a cow infected by *Leptospira* spp. has not yet been observed.

This study has some limitations: Regarding the animal status, unfortunately, we do not have much information, and since the animals came from 20 different farms, it is hard to give more details that are common to all of them. We understand this is a problem, however, we preferred to have those different farms, to make our analysis more representative and less influenced by a specific management/farm. In Brazil, it is common to use donor cows for OPU regardless of the stage of their estrous cycle, thus, assessment of the exact stage of the estrous cycle is not commercially performed. As a general procedure, all the antral follicles were aspirated, and in the laboratory, after the classification based on oocyte morphology the non-viable oocytes were discarded. As this study was carried out in partnership with private companies, our research group could not have access to

the components of the *in vitro* maturation medium. We understand that this is not an ideal scenario, but we preferred a partnership to increase the number of samples in this study and this effect was considered in the statistical analysis. The pregnancy rate was not evaluated due to the bias that would be caused in this rate, as there is an influence of the recipient on the viability of the pregnancy.

7.6 CONCLUSION

Under the conditions of the present study, the presence of *Leptospira* spp. in the FF of naturally infected cows did not affect the COC morphology and its nuclear maturation, however, it impaired the oocyte developmental competence, decreasing the overall efficiency of IVEP. These data show that it was possible to use the IVEP technique as a tool to advance the understanding of the mechanisms that lead to reproductive failures. Further studies may be performed to identify if the effect of *Leptospira* spp. in the FF is either direct, indirect, or both; this definition will aid the implementation of control measurements.

7.7 REFERENCES

- [1] Hossein-Zadeh NG. Effects of main reproductive and health problems on the performance of dairy cows: a review. *Span J Agric Res* 2013;3:718-735.
- [2] Sanches BV, Zangirolam AF, Seneda MM. Intensive use of IVF by large-scale dairy programs. *Anim Reprod* 2019;16:394-401. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2019-0058>.
- [3] Bouquet A, Juga J. Integrating genomic selection into dairy cattle breeding programmes: a review. *Animal* 2013;7(5):705. <https://doi.org/10.1017/S1751731112002248>.
- [4] Viana J. 2020 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals, *Embryo Technology Newsletter* 2021;39(4).

1210 [5] Stringfellow DA, Givens MD. Infectious agents in bovine embryo
1211 production: hazards and solutions. *Theriogenology* 2000;53(1):85-94. [https://doi.or](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00242-3)
1212 [g/10.1016/S0093-691X\(99\)00242-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00242-3).

1213 [6] Ellis WA. Animal Leptospirosis. In: Adler B. *Leptospira* and
1214 Leptospirosis, Berlin: Springer; 2015, p. 99-137. [https://doi.org/10.1007/978-3-](https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_6)
1215 [662-45059-8_6](https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_6).

1216 [7] Loureiro AP, Hamond C, Pinto P, Bremont S, Bourhy P, Lilenbaum W.
1217 Molecular analysis of leptospires from serogroup Sejroe obtained from
1218 asymptomatic cattle in Rio de Janeiro—Brazil reveals genetic proximity to serovar
1219 Guaricura. *Res Vet Sci* 2016;105:249-253. [https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.02.0](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.02.012)
1220 [12](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.02.012).

1221 [8] Rolim MBQ, Barros SEM, Silva VCL, Santana VLA, Souza MA, Harrop
1222 MHV, et al. [Leptospirosis in cattle: a review]. *Medicina Veterinária (UFRPE)*
1223 2012;6(2):26-31.

1224 [9] Lilenbaum W, Martins G. Leptospirosis in cattle: a challenging scenario
1225 for the understanding of the epidemiology. *Transbound Emerg Dis* 2014;61:63-68.
1226 <https://doi.org/10.1111/tbed.12233>.

1227 [10] Libonati HA, Santos GB, Souza GN, Brandão FZ, Lilenbaum W.
1228 Leptospirosis is strongly associated to estrus repetition on cattle. *Trop Anim Health*
1229 *Prod* 2018;50:1625-1629. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1604-9>.

1230 [11] Oliveira GDM, Garcia LAN, Soares LAP, Lilenbaum W, de Souza GN.
1231 Leptospirosis by Sejroe strains leads to embryonic death (ED) in herds with
1232 reproductive disorders. *Theriogenology* 2021;174:121-123. [https://doi.org/10.1016/j](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.08.022)
1233 [.theriogenology.2021.08.022](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.08.022).

1234 [12] Di Azevedo MIN, Pires BC, Libonati H, Pinto PS, Barbosa LFC,
1235 Carvalho-Costa FA, et al. Extra-renal bovine leptospirosis: Molecular characterizati

on of the *Leptospira interrogans* Sejroe serogroup on the uterus of non-pregnant cows. Vet Microbiol 2020;250,108869. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108869>.

[13] Di Azevedo MIN, Pires BC, Barbosa LFC, Carvalho-Costa FA, Lilenbaum W. Characterization of leptospiral DNA in the follicular fluid of non-pregnant cows. Vet Rec 2021;188(9), e143. <https://doi.org/10.1002/vetr.143>.

[14] Aymée L, Nogueira Di Azevedo MI, de Souza Pedrosa J, Loria de Melo JDS, Carvalho-Costa FA, et al. The role of *Leptospira santarosai* serovar Guaricura as agent of Bovine Genital Leptospirosis. Vet Microbiol 2022 May;268:109413. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2022.109413>. PMID: 35390628.

[15] Aymée L, Gregg WRR, Loureiro AP, Di Azevedo MIN, de Souza Pedrosa J, de Melo JD. Bovine Genital Leptospirosis and reproductive disorders of live subfertile cows under field conditions. Vet Microbiol 2021;261,109213. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109213>.

[17] Adler B. *Leptospira* and Leptospirosis. Berlin: Springer; 2015. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_1.

[18] Loureiro AP, Lilenbaum W. Bovine genital leptospirosis: A new look for an old disease. Theriogenology 2020;141:41-47. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.011>.

[19] Loureiro AP, Pestana C, Medeiros M, Lilenbaum W. High frequency of leptospiral vaginal carriers among slaughtered cows. Anim Reprod Sci 2017;178:50-54. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.01.008>.

[20] Pires BC, Berzin Grapiglia J, Moreira L, Jaeger LH, Carvalho-Costa FA, Lilenbaum W. Occurrence of uterine carriers for *Leptospira interrogans* on slaughtered cows. Microb Pathog 2018;114:163-165. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.056>.

[21] dos Santos Pereira PV, Di Azevedo MIN, Borges ALDSB, Loureiro AP, Martins G, Carvalho-Costa FA, et al. Bovine genital leptospirosis: Evidence of ovarian infection by *Leptospira interrogans*. Vet Microbiol 2022;109489. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2022.109489>.

[22] Bromfield JJ, Sheldon IM. Lipopolysaccharide initiates inflammation in bovine granulosa cells via the TLR4 pathway and perturbs oocyte meiotic progression *in vitro*. Endocrinology 2011;152(12):5029-5040. [https://doi: 10.1210/en.2011-1124](https://doi.org/10.1210/en.2011-1124).

[23] Rincón JAA, Gindri PC, Mion B, de Ávila FG, Barbosa AA, Maffi AS, et al. Early embryonic development of bovine oocytes challenged with LPS *in vitro* or *in vivo*. Reproduction 2019;158(5):453-463. [https://doi: 10.1530/REP-19-0316](https://doi.org/10.1530/REP-19-0316).

[24] Magata F, Horiuchi M, Echizenya R, Miura R, Chiba S, Matsui M, et al. Lipopolysaccharide in ovarian follicular fluid influences the steroid production in large follicles of dairy cows. Animal Reprod Sci 2014;144(1-2):6-13. [https://doi: 10.1016/j.anireprosci.2013.11.005](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.11.005).

[25] Forrest KK, Flores VV, Gurule SC, Soto-Navarro S, Shuster CB, Gifford CA, et al. Effects of lipopolysaccharide on follicular estrogen production and developmental competence in bovine oocytes. Anim Reprod Sci 2022;237:106927. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.106927>.

[26] Arashiro EK, Palhao MP, Wohlres-Viana S, Siqueira LG, Camargo LS, Henry M. et al. *In vivo* collection of follicular fluid and granulosa cells from individual follicles of different diameters in cattle by an adapted *ovum* pick-up system. Reprod Biol and Endocrinol 2013;11(1):1-8. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-11-73>.

[27] Hamond C, Pestana CP, Rocha-de-Souza CM, Cunha LER, Brandão FZ, Medeiros, MA, et al. Presence of leptospires on genital tract of mares with

1288 reproductive problems. Vet Microbiol 2015;179:264-269. [https://doi.org/10.1016/j.v](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.06.014)
1289 [etmic.2015.06.014](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.06.014).

1290 [28] Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA,
1291 McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics
1292 2007;23(21):2947-2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>.

1293 [29] Hall T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and
1294 analysis program for Windows95/98/NT. Nucl Acids Symp 1999;41:95–98.

1295 [30] Machado SA, Reichenbach HD, Weppert M, Wolf E, Gonçalves PBD.
1296 The variability of *ovum* pick-up response and *in vitro* embryo production from
1297 monozygotic twin cows. Theriogenology 2006;65(3):573-583. [https://doi.org/10.101](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.04.032)
1298 [6/j.theriogenology.2005.04.032](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.04.032).

1299 [31] Almeida KC, Pereira AF, Alcantara Neto AS, Avelar SR, Bertolini LR,
1300 Bertolini M, et al. Real-time qRT-PCR analysis of EGF receptor in cumulus-oocyte
1301 complexes recovered by laparoscopy in hormonally treated goats. Zygote
1302 2011;19:127–136. <https://doi.org/10.1017/S0967199410000225>.

1303 [32] Bielanski A, Surujballi O, Golsteyn Thomas E, Tanaka E. Sanitary
1304 status of oocytes and embryos collected from heifers experimentally exposed to
1305 *Leptospira borgpetersenii* sorovar hardjobovis. Anim Reprod Sci 1998;54:65–73.
1306 [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(98\)00145-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(98)00145-6).

1307 [33] Sheldon IM, Cronin J, Goetze L, Donofri G, Schuberth HJ. Defining
1308 postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the
1309 female reproductive tract in cattle. Biol Reprod 2009;81(6):1025-1032. [https://doi.or](https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.077370)
1310 [g/10.1095/biolreprod.109.077370](https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.077370).

1311 [34] Shimizu T, Miyauchi K, Shirasuna K, Bollwein H, Magata F, Murayama
1312 C, et al. Effects of lipopolysaccharide (LPS) and peptidoglycan (PGN) on estradiol

1313 production in bovine granulosa cells from small and large follicles. *Toxicology in*
 1314 *vitro* 2012;26(7):1134-1142. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.06.014>.

1315 [35] Magata F. Lipopolysaccharide-induced mechanisms of ovarian
 1316 dysfunction in cows with uterine inflammatory diseases. *J Reprod Dev* 2020.
 1317 <https://doi.org/10.1262/jrd.2020-021>.

1318 [36] Bielanski AB, Surujballi O. Association of *Leptospira borgpetersenii*
 1319 sorovar hardjo type hardjobovis with bovine ova and embryos produced by *in vitro*
 1320 fertilization. *Theriogenology* 1996;46:45-55. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(96\)](https://doi.org/10.1016/0093-691X(96)00140-9)
 1321 00140-9.

1322 [37] Ferranti EM, Aloqaily BH, Gifford CA, Löest CA, Wenzel JC, Hernandez
 1323 Gifford JA. Lipopolysaccharide modulation of ovarian hormonal profile. *Transl Anim*
 1324 *Sci* 2018 Sep 27;(2 Suppl 1):S31-34. [https://doi: 10.1093/tas/txy027](https://doi.org/10.1093/tas/txy027). PMID:
 1325 32704732; PMCID: PMC7200988.

1326 [38] Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. Contribution of the oocyte to
 1327 embryo quality. *Theriogenology* 2006;65:126-136. [https://doi.org/10.1016/j.therioge](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.020)
 1328 [nology.2005.09.020](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.020).

1329 [39] Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA,
 1330 Navarro, PAAS. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and
 1331 biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Therioge*
 1332 *nology* 2009;71(5):836-848. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.10.023>.

1333 [40] Meirelles FV, Caetano AR, Watanabe YF, Ripamonte P, Carambula SF,
 1334 Merighe GK, Garcia SM. Genome activation and developmental block in bovine
 1335 embryos. *Anim Reprod Sci* 2004;82:13-20. [https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.200](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.05.012)
 1336 4.05.012.

1337 [41] Zullo G, De Canditiis C, Pero ME, Alberio G, Salzano A, Neglia G, et al.
 1338 Crocetin improves the quality of *in vitro*–produced bovine embryos: Implications for

blastocyst development, cryotolerance, and apoptosis. *Theriogenology* 2016;86(8):1879-1885. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.06.011>.

[42] Ferré LB, Kjelland ME, Strøbech LB, Hyttel P, Mermillod P, Ross PJ. Recent advances in bovine *in vitro* embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal* 2020;14(5):991-1004. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>.

[43] Demetrio DGB, Benedetti E, Demetrio CGB, Fonseca J, Oliveira M, Magalhaes A, et al. How can we improve embryo production and pregnancy outcomes of Holstein embryos produced *in vitro*? (12 years of practical results at a California dairy farm). *Anim Reprod* 2020;17. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2020-0053>.

[44] Souza-Fabjan JM, Correia LF, Batista RI, Locatelli Y, Freitas VJ, Mermillod P. Reproductive seasonality affects *in vitro* embryo production outcomes in adult goats. *Animals* 2021;11(3):873. <https://doi.org/10.3390/ani11030873>.

[45] Trounson A, Pushett D, Maclellan L, Lewis I, Gardner D. Current status of IVM/IVF and embryo culture in humans and farm-animals. *Theriogenology* 1994;41(1):57-66. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(05\)80049-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(05)80049-4).

[46] Niemann H, Wrenzycki C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology* 2000;53(1):21-34. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00237-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00237-X).

[47] Viana JHM, Siqueira LGB, Palhão MP, Camargo LDA. Use of *in vitro* fertilization technique in the last decade and its effect on Brazilian embryo industry and animal production. *Acta Sci Vet* 2010;38(2):661-674.

[48] Rizos D, Ward F, Duffy PAT, Boland MP, Lonergan P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro*

1365 versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. Mol Reprod
1366 Dev 2002;61(2):234-248. <https://doi.org/10.1002/mrd.1153>.

1367 Table 1. *In vitro* embryo production outcomes of *cumulus*-oocyte complexes (COCs) derived from follicles with either
 1368 presence (POS-FF) or absence (NEG-FF) of *Leptospira* spp. detected by PCR in the follicular fluid of naturally
 1369 infected crossbred donor dairy cows.

Endpoints	Viable COCs*	Good-quality COCs*	Cleavage	Blast*/cleaved	Blast*/viable COCs
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
NEG-FF (n=179)	88±1.0 ^a	76±1.3	66±1.6	41±2.2 ^a	28±1.7 ^a
POS-FF (n=65)	93±1.6 ^b	76±2.5	63±2.6	32±3.6 ^b	20±2.4 ^b
P value	0.0155	0.9134	0.5741	0.0447	0.0072

1370

1371 n: number of donor cows; Viable: GI+GII+GIII COCs; Good-quality: GI+GII COCs; Blast: Blastocyst;

1372 ^{a,b} Within a column, values with different alphabets differ significantly (P < 0.05);

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível confirmar a infecção ovariana causada por estirpes de *Leptospira interrogans* pertencentes ao sorogrupo Sejroe, historicamente associadas a problemas reprodutivos, utilizando um grande número de amostras oriundas de vacas assintomáticas. Estes achados levantam a importância da utilização de amostras provenientes do trato genital para o diagnóstico por meio de técnicas moleculares na triagem da leptospirose genital bovina em animais destinados a biotecnologias da reprodução, devido ao alto custo envolvido.

Nas condições do presente estudo, a presença de *Leptospira* spp. no FF de vacas naturalmente infectadas não afetou a morfologia dos COCs e sua maturação nuclear, porém, pode prejudicar a competência de desenvolvimento do oócito, dependendo do laboratório, diminuindo a eficiência global da PIVE. Esses dados mostram que foi possível utilizar a técnica de PIVE como ferramenta para avançar no entendimento dos mecanismos que levam a falhas reprodutivas. Outros estudos serão realizados para identificar se o efeito de *Leptospira* spp. no FF é direto, indireto ou ambos, bem como definir quais condições de cultivo podem mitigar o efeito de *Leptospira* spp. nessa biotecnologia da reprodução; estas definições auxiliarão na compreensão da fisiopatogenia desta bactéria em sua interação com oócitos, além de contribuir para a implementação de medidas de controle específicas.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. *Beef Report: Perfil da Pecuária no Brasil 2022*. Disponível em <<http://abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2022>>. Acesso em: 26 de jan. de 2023.

ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary microbiology*, v. 140, n. 3-4, p. 287-296, 2010.

ADLER B. (eds) *Leptospira* and Leptospirosis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol 387. Springer, Berlin, Heidelberg, 295 p., 2015.

ARASHIRO, E. K. N.; PALHAO, M. P., WOHLRES-VIANA, S.; et al. *In vivo* collection of follicular fluid and granulosa cells from individual follicles of different diameters in cattle by an adapted *ovum pick-up* system. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 11, 73 - 80, 2013.

ARASHIRO, E. K. N.; LIBONATI, H.; SANTOS, G. B. D.; et al. Repetition of estrus is the most frequent reproductive problem after breeding in dairy cattle from Rio de Janeiro, Brazil. *Ciência Rural*, 47, n. 7, e20161092, 2017.

AVELINO, K. B. et al. *In vitro* production of embryos of cows with acquired infertility. *Theriogenology*, v.57, p.656, 2002.

BARBOSA, C.; MARTINS, G.; LILENBAUM, W. Infectivity and virulence of leptospiral strains of serogroup Sejroe other than Hardjo on experimentally infected hamsters. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 50, n. 4, p. 1129-1132, 2019.

BIELANSKI, A.; SURUJBALLI, O. Association of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo type hardjobovis with bovine ova and embryos produced by *in vitro* fertilization. *Theriogenology*, v. 46, n. 1, p. 45-55, 1996.

1419 BIELANSKI, A. B.; SURUJBALLI, O. *Leptospira borgpetersenii* serovar
 1420 hardjo type Hardjobovis in bovine embryos fertilized *in vitro*. *Canadian Journal of*
 1421 *Veterinary Research*, 62, 234-236, 1998.

1422 BIELANSKI, A.; SURUJBALLI, O.; THOMAS, E. G.; et al. Sanitary status of
 1423 oocytes and embryos collected from heifers experimentally exposed to *Leptospira*
 1424 *borgpetersenii* serovar hardjobovis. *Animal Reproduction Science*, 54, 65-73,
 1425 1998a.

1426 BIELANSKI, A. Potencial para controle ou transmissão de doenças por meio
 1427 de transferência de embriões produzidos *in vitro*: uma revisão. Em: Stringfellow
 1428 DA, Givens MD (Ed.). *Manual of the International Embryo Transfer Society*. 4th ed.
 1429 Champaign, IL: IETS. pp. 49-60, 2010.

1430 BO, G. A.; MAPLETOFT, R. J. Evaluation and classification of bovine
 1431 embryos. *Animal Reproduction*, v. 10, n. 3, p. 344-348, 2018.

1432 BONDURANT, R. H. Venereal diseases of cattle: natural history, diagnosis,
 1433 and the role of vaccines in their control. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, v.
 1434 21, n. 2, p. 383-408, 2005.

1435 BOURHY, P.; HERRMANN STORCK, C.; THEODOSE, R.; et al. Serovar
 1436 diversity of pathogenic *Leptospira* circulating in the French West Indies. *PLoS*
 1437 *Neglected Tropical Diseases*; 7: 2114, 2013.

1438 BROCK, K. Quality control for materials of animal origin used in embryo
 1439 production and transfer. Pages 135–140 in *Manual of the International Embryo*
 1440 *Transfer Society*. 3rd ed. D. A. Stringfellow and S. M. Seidel, ed. IETS, Savoy, IL,
 1441 1998.

1442 BUENO, A. P.; BELTRAN, M. P. Produção *in vitro* de embriões bovinos.
 1443 *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, v. 6, n. 11, p. 1- 7, 2008.

- 1444 CAMPOS, Â. P.; MIRANDA, D. F. H.; RODRIGUES, H. W. S.; et al.
 1445 Seroprevalence and risk factors for Leptospirosis in cattle, sheep, and goats at
 1446 consorted rearing from the State of Piauí, northeastern Brazil. *Tropical Animal*
 1447 *Health and Production*, v. 49, n. 5, p. 899-907, 2017.
- 1448 CHAPPEL, R. J.; SMYTHE, L. D. Leptospirosis – importance of a One Health
 1449 approach. *Microbiology Australia*, 1, 154-156, 2012.
- 1450 CORREIA, L.; LOUREIRO, A. P.; LILENBAUM, W. Effects of rainfall on
 1451 incidental and host-maintained leptospiral infections in cattle in a tropical
 1452 region. *The Veterinary Journal*, v. 220, p. 63-64, 2017.
- 1453 DEMETRIO, D. G. B.; BARFIELD, J. Appendix 2: Photographic illustrations
 1454 of bovine *cumulus* oocyte complexes. In: *Manual of the International Embryo*
 1455 *Technology Society*, 5th ed., 2021; p.1-7.
- 1456 DE SOUZA, N. S.; ABADE, C. C. Produção *in vitro* de embriões bovinos:
 1457 etapas de produção e histórico no Brasil. *Ciência Veterinária UniFil*, v. 1, n. 3, p.
 1458 95-108, 2019.
- 1459 DESVARS, A.; CARDINALE, E.; MICHAULT, A. Animal leptospirosis in
 1460 small tropical areas. *Epidemiology and Infection*, 139, 167–188, 2011.
- 1461 DHALIWAL, G. S.; MURRAY, R. D.; DOBSON, H.; et al. Presence of
 1462 antigen and antibodies in serum and genital discharges of cows from dairy herds
 1463 naturally infected with *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Research in*
 1464 *veterinary science*, v. 60, n. 2, p. 163- 167, 1996.
- 1465 DIAS, L. P. B.; SÁ, W. F.; CAMARGO, L. S. A.; et al. Concentração
 1466 espermática e tempo de incubação na fecundação *in vitro* usando-se sêmen de
 1467 touros da raça Guzerá. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.
 1468 58, n. 3, p. 348-353, 2006.
- 1469 DI AZEVEDO, M. I. N.; PIRES, B. C.; LIBONATI, H.; et al. Extra-renal
 1470 bovine leptospirosis: Molecular characterization of the *Leptospira interrogans*

- 1471 Sejroe serogroup on the uterus of non-pregnant cows. *Veterinary Microbiology*,
1472 250, 108869, 2020.
- 1473 DI AZEVEDO, M. I. N.; PIRES, B. C.; BARBOSA, L. F. C.; et al.
1474 Characterization of leptospiral DNA in the follicular fluid of non-pregnant cows.
1475 *Vetetary Record*; e134, 2021.
- 1476 DIRECTOR, A.; PENNA, B.; HAMOND, C.; et al. Isolation of *Leptospira*
1477 *interrogans* Hardjoprajitno from vaginal fluid of a clinically healthy ewe suggests
1478 potential for venereal transmission. *Journal of Medical Microbiology*, v. 63, n. 9, p.
1479 1234-1236, 2014.
- 1480 ELLIS, W. A. Animal leptospirosis. *Current Topics in Microbiology and*
1481 *Immunology*, 387, 99-137, 2015.
- 1482 ELLIS, W. A. Bovine leptospirosis: microbiological and serological findings in
1483 aborted fetuses. *The Veterinary Record*, 110(7), 147-150, 1982.
- 1484 ELLIS W. A.; THIERMANN A. B. Isolation of leptospire from the genital
1485 tracts of Iowa cows. *American Journal of Veterinary Research*, Aug; 47(8):1694-
1486 1696, 1986.
- 1487 FÁVERO, J. F.; DE ARAÚJO, H. L.; LILENBAUM, W.; et al. Bovine
1488 leptospirosis: Prevalence, associated risk factors for infection and their cause-effect
1489 relation. *Microbial pathogenesis*, v. 107, p. 149-154, 2017.
- 1490 FERREIRA, S. B.; SOUSA, K. R. S.; CASTRO, V.; et al. Análise
1491 soropidemiológica e fatores de risco associados à *Leptospira* spp. em bovinos no
1492 estado do Piauí. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 45, p. 1-11, 2017.
- 1493 GÓES, A. C.; PICCOLOMINI, M. M.; PAVÃO, D. L.; et al. Assessment of
1494 trypsin and antibiotic treatment effectiveness in *in vitro*-matured oocytes
1495 experimentally exposed to *Leptospira interrogans* serovar Grippotyphosa.
1496 *Reproduction, Fertility and Development*, v.22, n. 1, p. 294-294, 2009.

- 1497 GÓES, A. C.; PICCOLOMINI, M. M.; CASTRO, V.; ET al. Eficácia dos
1498 tratamentos estabelecidos pelo Manual da IETS, em oócitos, expostos à
1499 *Leptospira interrogans*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.
1500 64, n. 1, p. 108-113, 2012.
- 1501 GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, M. H.; SANDRI, L. R.; ET al. Produção
1502 *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Reprodução*
1503 *Animal*. v.31, p.212-217, 2007.
- 1504 GUEDES, I. B.; DE ALMEIDA ARAÚJO, S. A.; DE SOUZA, G. O.; et al.
1505 Circulating *Leptospira* species identified in cattle of the Brazilian Amazon. *Acta*
1506 *tropica*, v. 191, p. 212-216, 2019.
- 1507 HAMOND, C.; MARTINS, G.; LOUREIRO, A. P.; et al. Urinary PCR as an
1508 increasingly useful tool for an accurate diagnosis of leptospirosis in livestock.
1509 *Veterinary Research Communication*. 38, 81–85. 2014.
- 1510 HOLM, P.; BOOTH, P. J.; CALLESEN, H. Kinetics of early *in vitro*
1511 development of bovine *in vivo*-and *in vitro*-derived zygotes produced and/or cultured
1512 in chemically defined or serum-containing media. *Reproduction-Cambridge*, v. 123,
1513 n. 4, p. 553-565, 2002.
- 1514 KARPAGAM, K. B.; GANESH, B. Leptospirosis: a neglected tropical
1515 zoonotic infection of public health importance—an updated review. *European*
1516 *Journal of Clinical Microbiology e Infectious Diseases*, p. 1-12, 2020.
- 1517 LIBONATI, H. A.; SANTOS, G. B.; SOUZA, G. N.; et al. Leptospirosis is
1518 strongly associated to estrus repetition on cattle. *Tropical Animal Health and*
1519 *Production*, v. 50, n. 7, p. 1625- 1629, 2018.
- 1520 LILENBAUM, W.; SOUZA, G. N. Factors associated with bovine
1521 leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Research in Veterinary Science*, 75, 249–
1522 251, 2003.

1523 LIMA, I. M. T.; SOUZA, A. L. Desenvolvimento e sobrevivência de embriões
1524 no período de pré-implantação: enfoque em ruminantes. *Revista Brasileira de*
1525 *Reprodução Animal*, [s.l.], v. 33, p.194-202, 2009.

1526 LOIOLA, M. V. G.; RODRIGUES, A. S.; CHALHOUN, M.; et al. Proporção do
1527 sexo na produção *in vitro* de embriões bovinos. *Archives of Veterinary Science*, v.
1528 20, n. 2, 2015.

1529 LOUREIRO, A. P.; MARTINS, G.; THOMÉ, S.; et al. Laboratorial
1530 diagnosis of animal leptospirosis. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 20,
1531 n. 3, 2013.

1532 LOUREIRO, A. P.; HAMOND, C.; PINTO, P.; et al. Molecular analysis of
1533 leptospire from serogroup Sejroe obtained from asymptomatic cattle in Rio de
1534 Janeiro—Brazil reveals genetic proximity to serovar Guaricura. *Research in*
1535 *Veterinary Science*, v. 105, p. 249- 253, 2016.

1536 LOUREIRO, A. P.; PESTANA, C.; MEDEIROS, M. A.; et al. High frequency
1537 of leptospiral vaginal carriers among slaughtered cows. *Animal Reproduction*
1538 *Science*, 178, 50-54, 2017.

1539 LOUREIRO, A. P.; LILENBAUM, W. Genital bovine leptospirosis: A new look
1540 for an old disease. *Theriogenology*, 141, 41-47, 2020.

1541 LUEDKE, F. E.; LAVACH, F. L.; CASSANTA, F. G.; et al. Aspectos da
1542 produção *in vitro* de embriões bovinos no Brasil – revisão. *Pesquisa Agropecuária*
1543 *Gaúcha*, 25(1/2), 120-132. 2019.

1544 LUSTOSA, A. A.; BARBOZA, N. A.; BARBOSA, Y. G. D. S.; et al. Aspectos
1545 relevantes na produção comercial de embriões bovinos por meio da técnica
1546 biotecnológica de fertilização *in vitro*: Revisão. *PUBVET*, v. 12, p. 130, 2017.

1547 MARTINS, G.; PENNA, B.; LILENBAUM, W. Differences between
1548 seroreactivity to leptospirosis in dairy and beef cattle from the same herd in Rio de

- 1549 Janeiro, Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, v. 44, n. 3, p. 377-378,
1550 2012.
- 1551 MARTINS, G.; LILENBAUM, W. Comments of environmental conditions for
1552 the maintenance of *Leptospira* in tropical scenarios. *Current Microbiology*. 71, 624-
1553 625, 2015.
- 1554 MONAHAN, A. M.; CALLANAN, J. J.; NALLY, J. E. Host-pathogen
1555 interactions in the kidney during chronic leptospirosis. *Veterinary pathology*, v. 46,
1556 n. 5, p. 792-799, 2009.
- 1557 OIE. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 7 ed.
1558 Paris: *World Organization for Animal Health*; 2012.
- 1559 OLIVEIRA, F. S.; OLIVEIRA, D.; MARTINS FILHO, E. F.; et al. Avaliação
1560 histológica e imuno-histoquímica da colonização vaginal por *Leptospira* em vacas
1561 com fluido vaginal positivo à PCR. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 38
1562 (Supl.1), p. 163-167, 2016.
- 1563 PENNA, B.; MARASSI, C. D.; LIBONATI, H.; et al. Diagnostic accuracy of
1564 an in-house ELISA using the intermediate species *Leptospira fainei* as antigen for
1565 diagnosis of acute leptospirosis in dogs. *Comparative Immunology, Microbiology
1566 and Infectious Diseases*, v. 50, p. 13-15, 2017.
- 1567 PIRES, B. C.; GRAPIGLIA, J. B.; MOREIRA, L.; et al. Occurrence of uterine
1568 carriers for *Leptospira interrogans* on slaughtered cows. *Microbial Pathogenesis*,
1569 114, 163-165, 2018.
- 1570 RAMOS, A. D. A.; CAMARGO, L. S. D. A.; SÁ, W. F. D.; et al. Fecundação
1571 *in vitro* com sêmen de bovinos da raça Gir. *Arquivo Brasileiro de Medicina
1572 Veterinária e Zootecnia*, v. 52, n. 4, p. 360-365, 2000.
- 1573 RINEHART, C. L.; ZIMMERMAN, A. D.; BUTERBAUGH, R. E.; et al.
1574 Efficacy of vaccination of cattle with the *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* type

1575 hardjoprajitno component of a pentavalent *Leptospira* bacterin against
 1576 experimental challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar *hardjo* type *hardjo*-
 1577 *bovis*. *American Journal of Veterinary Research*, v. 73, n. 5, p. 735-740, 2012.

1578 RISTOW, P.; LILENBAUM, W. Leptospirose: atualização e perspectivas.
 1579 *Microbiologia in foco*, São Paulo, ano, v. 3, p. 17-27, 2010.

1580 ROCHA, B. R.; BALARO, M.; PEREIRA, P. V.; et al. Chronic experimental
 1581 genital leptospirosis with autochthonous *Leptospira santarosai* strains of serogroup
 1582 Sejroe. *Small Ruminant Research*, v. 164, p. 28-31, 2018.

1583 RODRIGUES, C. F. M.; GARCIA, J. M. Fecundação *in vitro* em bovinos:
 1584 aplicação comercial. *Arq. Fac. Vet. UFRGS Supl.*, v.28, p.186-187, 2000.

1585 SALGADO, M.; OTTO, B.; SANDOVAL, E.; et al. A cross sectional
 1586 observational study to estimate herdlevel risk factors for *Leptospira* spp. serovars
 1587 in small holder dairy cattle farms in southern Chile. *BMC Veterinary Research* 10,
 1588 126. 2014.

1589 SÁNCHEZ, G. P.; DE LEMOS, F. A.; PAIXÃO-MARQUES, M. D. S.; et al.
 1590 Complete diagnosis of leptospirosis in tropical reproductive cattle. *BioRxiv*, p.
 1591 327726, 2018.

1592 SANGILD, P. T.; SCHMIDT, M.; JACOBSEN, H. et al. Blood chemistry,
 1593 nutrient metabolism, and organ weights in fetal and newborn calves derived from *in*
 1594 *vitro* produced bovine embryos. *Biology of Reproduction*, v.62, p.1495-1504, 2000.

1595 SARMENTO, A.; AZEVEDO, S. S.; MORAIS, Z. M.; et al. Emprego de
 1596 estirpes *Leptospira* spp. isoladas no Brasil na microtécnica de soroaglutinação
 1597 microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose em rebanhos bovinos de oito
 1598 estados brasileiros. *Pesq Vet Bras*, 32, 601-606, 2012.

1599 SCANAVEZ, A. L.; CAMPOS, C. C.; SANTOS, R. M. Taxa de prenhez e de

- 1600 perda de gestação em receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. *Arquivo*
 1601 *Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 65, n. 3, p. 722-728, 2013.
- 1602 SHAKED, Y.; SHPILBERG, O.; SAMRA, D.; et al. Leptospirosis in
 1603 pregnancy and its effect on the fetus: case report and review. *Clinical Infectious*
 1604 *Diseases*, v. 17, n. 2, p. 241-243, 1993.
- 1605 SOUZA-FABJAN, J. M. G.; PANNEAU, B.; DUFFARD, N.; et al. *In vitro*
 1606 production of small ruminant embryos: Late improvements and further research.
 1607 *Theriogenology*, 81, 1149-1162, 2014.
- 1608 STODDARD, R. A.; GEE, J. E.; WILKINS, P. P.; et al. Detection of
 1609 pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting
 1610 the lipL32 gene, *Diagnostic Microbiology Infectious Disease*. 64 - 247–255. 2009.
- 1611 STRINGFELLOW, D. A.; GIVENS, M. D. Infectious agents in bovine embryo
 1612 production: hazards and solutions. *Theriogenology*, v. 53, n. 1, p. 85-94, 2000.
- 1613 THIBEAUX, R.; IRAOLA, G.; FERRÉS, I.; et al. Deciphering the unexplored
 1614 *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence. *Microbial*
 1615 *Genomics*; 4(1), 2018.
- 1616 VAN SOOM, A.; NAUWYNCK, H.; WRATHALL, A. Fundamentos científicos
 1617 para a segurança epidemiológica da transferência de embriões. In:
 1618 STRINGFELLOW, D.A.; GIVENS, M.D. *Manual of the International Embryo Transfer*
 1619 *Society (IETS)*. 4th ed. Champaign, IL: *IETS*, 2010.
- 1620 VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A. Produção *in vitro* de
 1621 embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante
 1622 evolução. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. Belo Horizonte, v. 36, p. 100-
 1623 109, 2008.
- 1624 VIANA, J. 2021 Statistics of embryo production and transfer in domestic
 1625 farm animals. In: *Embryo Technology Newsletter*, v. 40, n. 4, 2022.

VINCENT, A. T.; SCHIETTEKATTE, O.; GOARANT, C.; et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 13, n. 5, p. e0007270, 2019.

VINODH, R.; RAJ, G. D.; GOVINDARAJAN, R.; et al. Detection of *Leptospira* and *Brucella* genomes in bovine semen using polymerase chain reaction. *Tropical Animal Health and Production*, 40, 323- 329, 2008.

WAGGONER, J. J.; PINSKY, B. A. Molecular diagnostics for human leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis*, 29, 440–445, 2016.

WANG, W.; GAO, X.; GUO, M.; et al. *Leptospira interrogans* induces uterine inflammatory responses and abnormal expression of extracellular matrix proteins in dogs, *Microb.Pathog.* 75 1–6, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Report of the first meeting of leptospirosis burden epidemiology reference group. Geneva: p.1-34, 2010.

YANG, W. C.; YANG, L. G.; RIAZ, H.; et al. Effects in cattle of genetic variation within the IGF1R gene on the superovulation performance and pregnancy rates after embryo transfer. *Animal Reproduction Science*, 143, 24- 29, 2013.

ZARANTONELLI, L.; SUANES, A.; MENY, P.; et al. Isolation of pathogenic *Leptospira* strains from naturally infected cattle in Uruguay reveals high serovar diversity, and uncovers a relevant risk for human leptospirosis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12, p.e0006694, 2018.

ZHU, J.; MOAWAD, A. R.; WANG, C. Y.; et al. Advances in *in vitro* production of sheep embryos. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, S6; S15-S26, 2018.

1651 10 ANEXOS



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Impacto da leptospirose bovina na eficiência da produção in vitro de embriões", protocolada sob o CEUA nº 8688190919 (ID 000820), sob a responsabilidade de **Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Fluminense (CEUA/UFF) na reunião de 09/04/2020.

We certify that the proposal "Impact of bovine leptospirosis on efficiency of in vitro embryo production", utilizing 120 Bovines (120 females), protocol number CEUA 8688190919 (ID 000820), under the responsibility of **Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University Fluminense (CEUA/UFF) in the meeting of 04/09/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **05/2020** a **04/2023** Área: **Medicina Veterinária**

Origem:	Animais de proprietários		
Espécie:	Bovinos	sexo:	Fêmeas
		idade:	2 a 5 anos
		N:	120
Linhagem:	Nelore	Peso:	350 a 600 kg

Local do experimento: O estudo será realizado em diferentes unidades da Universidade Federal Fluminense e em duas outras fazendas, Fazenda Floresta e Fazenda Providência, localizadas em Palma, MG. As coletas de sangue, urina, muco cervico-vaginal, fluido folicular e oócitos serão realizadas na Fazenda Escola de Cachoeiras de Macacu (FECM), localizada em Cachoeiras de Macacu, RJ e em demais fazendas da região. As análises da qualidade dos oócitos, a produção in vitro de embriões e criopreservação serão conduzidas no Setor de Reprodução Animal da Faculdade de Veterinária em Niterói, RJ. As análises moleculares e microbiológicas serão realizadas no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Biomédico em Niterói

Niterói, 27 de junho de 2020

Profª Carla Eponina
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Fluminense

Profª Caroline de Souza Barros
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Fluminense

1652

1653

1654



Universidade
Federal
Fluminense



PROPPI-UFF
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-graduação e Inovação



Comitê de Ética no Uso de Animais

Niterói, 10 de junho de 2021
CEUA N 8688190919

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Joanna Maria Gonçalves De Souza Fabjan
Área: Medicina Veterinária

Título da proposta: "Impacto da leptospirose bovina na eficiência da produção in vitro de embriões".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UFF (ID 000190)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Fluminense, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 09/abril/2021) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Este estudo tem como objetivo avaliar o impacto da leptospirose bovina na eficiência da produção in vitro de embriões. Inicialmente, acreditávamos que o N amostral de 120 vacas apresentado no projeto de pesquisa aprovado pelo CEUA/UFF seria suficiente. Apesar do avanço do projeto, o grupo de pesquisa verificou a necessidade de aumentar o número de fêmeas bovinas de 120 para 300. Esse aumento é justificado a partir de um levantamento realizado em diferentes rebanhos do estado do Rio de Janeiro, constatando que aproximadamente 21% dos indivíduos avaliados foram positivos para Leptospirose pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (HAMOND et al., 2014). A partir disto, se torna necessário aumentar o N amostral para obter maior quantidade de amostras positivas, de forma a melhorar a qualidade das análises estatísticas realizadas e trazer maior fidedignidade e relevância ao estudo. Ademais, será necessário incluir 10 machos bovinos para a realização do experimento 5 descrito no documento em anexo. Desta forma serão necessários 10 machos e 300 fêmeas totalizando 310 animais para realização do projeto.".

Comentário da CEUA: "".

Profª Carla Eponina
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Fluminense

Profª Caroline de Souza Barros
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Fluminense

1655