

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**THE ROLE OF THE CD46 RECEPTOR IN THE PATHOGENICITY OF THE
BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS INFECTION IN BOVINE CULTURED
CELLS**

CAMILO ANDRÉS PEÑA BELLO

PORTO ALEGRE

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**THE ROLE OF THE CD46 RECEPTOR IN THE PATHOGENICITY OF THE
BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS INFECTION IN BOVINE CULTURED
CELLS**

Autor: Camilo Andrés Peña Bello

**Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre
em Ciências Veterinárias na área de
Biotécnicas da Reprodução e
Fisiopatologia de Reprodução Animal.**

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Bertolini

PORTO ALEGRE

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Peña Bello, Camilo Andres

The role of the CD46 receptor in the pathogenicity of the bovine viral diarrhoea virus infection in bovine cultured cells / Camilo Andres Peña Bello. -- 2019. 69 f.

Orientador: Marcelo Bertolini.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. CRISPR/Cas9 . 2. BVDV . 3. Edição gênica . 4. receptor CD46. I. Bertolini, Marcelo, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Camilo Andres Peña Bello

THE ROLE OF THE CD46 RECEPTOR IN THE PATHOGENICITY OF THE BOVINE
VIRAL DIARRHEA VIRUS INFECTION IN BOVINE CULTURED CELLS

Aprovada em 15 de março de 2019.

APROVADO POR:

Prof. Dr. Marcelo Bertolini
Orientador e Presidente da Comissão
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal
Membro da Comissão
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Dr. Werner Giehl Glanzner
Membro da Comissão
McGill University

Prof. Dra. Andreia Henzel
Membro da Comissão
Universidade Feevale

AGRADECIMENTOS

Durante esses dois anos, amadureci como pessoa, cresci profissionalmente e aprendi a valorizar o esforço que é feito em cada investigação. Finalmente, compreendi o significado de amor, amizade e família.

Agradeço com muito carinho a Andrea por ser meu principal suporte psicológico, emocional e físico. Pelo amor, a paciência, a força e a coragem para estar juntos durante esta viagem.

Agradeço à minha família por ter me apoiado de todas as maneiras possíveis durante estes anos: meus pais Patricia e German, minha irmã Gabriela e meus irmãos Alejandro e Juan Carlos.

Aos meus amigos e colegas da Pós-Graduação por toda a ajuda durante este tempo, pelas experiências dentro e fora do laboratório, por me fazer sentir em família no exterior. Com especial carinho a Karine de Mattos, Gabriella, Karine Campagnolo, Elvis, Paula, German, Cesar, Bruna, Camila, Luís e Felipe.

A Marcelo por ter me dado a oportunidade, por ter me ensinado a investigar, por me apoiar e me guiar ao longo do caminho.

RESUMO

O vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) é um dos principais patógenos virais que causam importantes doenças clínicas em bovinos. A presença deste vírus em rebanhos representa um grande risco para a produtividade por perdas econômicas significativas. O uso da tecnologia de edição gênica, como o sistema CRISPR/Cas9, em animais de produção pode contribuir para o desenvolvimento de modelos de resistência a doenças, como a BVD. Mesmo que os mecanismos de infecção, entrada e liberação do BVDV não sejam totalmente compreendidos, a molécula CD46 é considerada o principal receptor celular para o BVDV em bovinos. O mapeamento do local de adesão ao BVDV demonstrou que dois peptídeos, localizados no módulo mais distal da proteína 1 de controle do complemento (CCP1), fornecem a plataforma de adesão ao BVDV. Os objetivos deste estudo foram (i) caracterizar o CD46 em linhagens celulares bovinas; (ii) modificar a plataforma de adesão do receptor por edição gênica; e (iii) investigar a permissibilidade do BVDV à infecção celular em células editadas geneticamente para o gene CD46. Para caracterizar o receptor, foi sequenciado o DNA complementar do gene CD46 em amostras de fibroblastos bovinos e em linhagens celulares de rim bovino Madin-Darby suscetíveis (MDBK) ou resistentes (CRIB) ao BVDV. Posteriormente, por edição gênica pelo sistema CRISPR/Cas9, criaram-se *indels* no éxon 1 do gene CD46, removendo oligopeptídeos que conformam a plataforma de adesão do receptor CD46 ao BVDV. Para realizar a edição genômica, duas sequências de RNA-guia (gRNA) foram selecionadas para a deleção do éxon 1 do CD46 em células MDBK. Posteriormente, dois plasmídeos px458, específicos para cada uma das gRNAs, e com expressão da proteína fluorescente verde (GFP), foram co-transfectados em células MDBK. O isolamento de populações de células clonais com modificações específicas das células transfectadas foi realizado por citometria de fluxo, seguido de um período de expansão para estabelecer sub-populações de células clonais. O DNA genômico foi isolado e amplificado por PCR. O produto do PCR foi ligado em plasmídeos pCR-TOPO, transformado em células TOP10 *E. coli* e sequenciado. Como resultados, identificou-se que as células CRIB codificam uma proteína CD46 semelhante às MDBK e aos fibroblastos, sem nenhuma mutação na região de interesse, com o receptor CD46 não apresentando aparente importância na resistência destas células à infecção por BVDV. Além disso, obtivemos três linhagens celulares MDBK com deleção em segmentos específicos na região codificante para o CCP1 referente a plataforma de adesão ao BVDV. Uma das linhagens apresentou a deleção bialélica, com a edição gênica sendo diferente em cada alelo; outra linhagem apresentou uma edição bialélica, com um dos alelos não apresentando a deleção da plataforma de adesão; e a última linhagem apresentou uma deleção bialélica homozigota. O estudo da susceptibilidade destas células mutantes à infecção pelo BVDV encontra-se em andamento. Com as três linhagens celulares bovinas modificadas geneticamente para a plataforma de adesão do receptor CD46 ao BVDV, tem-se a expectativa que estas modificações genéticas possivelmente levarão a uma diminuição na infecção pelo BVDV, o que permitirá obtermos mais informações sobre o mecanismo de entrada e infecção do vírus em células bovinas. Tal estratégia mostra-se viável para a futura geração de bovinos resistentes ao BVDV por biotécnicas avançadas da reprodução, como pela clonagem por transferência nuclear de células somáticas (TNCS).

Palavras-chave: Vírus da diarreia viral bovina, CRISPR/Cas9, edição gênica, receptor CD46

ABSTRACT

The Bovine Viral Diarrhea virus (BVDV) is one of the major viral pathogens that cause important clinical diseases in cattle. The presence of the virus in herds represents a major risk for productivity due to significant economic losses. The use of gene-editing technology, such as the CRISPR/Cas9 system, in livestock animals can contribute to the development of disease resistance models, such as BVD. Even though the mechanisms of infection, entry and release of BVDV are not yet fully understood, the CD46 molecule is considered the major cellular receptor for BVDV in cattle. The mapping of the adhesion site to the BVDV revealed that two peptides, located in the most distal domain of the complement control protein 1 (CCP1), provide the adhesion platform for the virus. The aims of this study were (i) to characterize CD46 in bovine cell lines; (ii) to modify the platform of adhesion of the CD46 receptor by gene edition; and (iii) to investigate the permissibility of BVDV to cellular infection in CD46 gene-edited cells. To characterize the receptor, the complementary DNA of the gene CD46 was sequenced on samples of fibroblast cells and in Madin-Darby bovine kidney cell lines (MDBK) or MDBK susceptible cells and on cells resistant to BVDV infection (CRIB cells). Afterwards, by gene editing using the CRISPR/Cas9 system, indels were created in the exon 1 of the CD46 gene, removing oligopeptides that form the CD46 receptor adhesion platform to BVDV. To achieve the genomic edition, two sequences of guiding RNA (gRNAs) were selected for exon 1 deletion of CD46 in MDBK cells. Subsequently, two px458 plasmids, each encoding one of the gRNAs, and expressing the green fluorescent protein (GFP), were co-transfected into MDBK cells. Isolation of clonal cell populations with specific modifications of the transfected cells was done through Fluorescence Activated Cell Sorting, followed by an expansion period to establish new clonal cell lines. Genomic DNA was isolated and amplified by PCR. The PCR amplified products were ligated into pCR-TOPO plasmid and transformed into TOP10 E. coli cells, and DNA-sequenced. Our results indicated that CRIB cells express a CD46 protein similar to MDBK and fibroblast cells, without any mutation in the region of interest, with the CD46 receptor in CRIB cells showing an apparent no importance in the resistance to BVDV infection. Furthermore, we obtained three MDBK cell lines with deletion in specific segments in the coding region for CCP1 referring to the BVDV adhesion platform. One of the lines presented a biallelic deletion of the adhesion platform, with gene edition being different in each allele; another line presented a biallelic edition, with one of the alleles not containing the adhesion platform deletion; and the last line presented a biallelic homozygous deletion. However, the study of the susceptibility of such mutant cells to BVDV infection is still ongoing. With the three genetically modified bovine cell lines to the CD46 receptor adhesion platform on BVDV, such genetic modification will possibly lead to a decrease in BVDV infection, which may allow us to obtain more pieces of information regarding mechanisms of virus entry and infection in bovine cells. Such a strategy proves to be feasible for the future generation of BVDV resistant animals by the use of advanced reproductive technologies, such as cloning by somatic cell nuclear transfer (SCNT).

Keywords: *Bovine viral diarrhea virus, CRISPR/ Cas9, genome editing, CD46 receptor.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de literatura

Figura 1 -	Representação do receptor CD46.....	26
Figura 2 -	Descrição gráfica das seis variantes (SV) do CD46 produzidas pelo <i>splicing</i> alternativo do gene do CD46.....	27
Figura 3 -	Modelo da estrutura cristalina do CCP1 e CCP2 do CD46 bovino.....	28

Capítulo único

Figure 1 -	Generation of the bovine CD46 attachment platform area deletion in the exon 1 using CRISPR/Cas 9.....	57
Figure 2 -	Validation of CD46 gene editing in subclone populations of MDBK edited cells.....	57

LISTA DE TABELAS

Table 1 -	Sequence of PCR primers for the CD46 transcripts analyzed in the bovine cultured cells.....	59
Table 2 -	Sequence of sgRNAs selected to flank the attachment platform area in the exon 1 of the CD46 gene	59
Table 3 -	Comparison of the CCP1 peptide sequences from the different bovine cells.....	60
Table 4 -	Comparison of the peptide sequences from the edited clone cells....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAV	Adenovírus Bovino
BEV	Enterovírus bovino
BHV	Herpes vírus bovino
BLV	Vírus da leucose bovina
bp	<i>Base pair</i>
BPV	Parvovírus bovino
BRSV	Vírus Sincicial Respiratório Bovino
BDV	Vírus da doença da fronteira
BVDV	Vírus da Diarreia Viral Bovina (<i>Bovine Viral Diarrhea Virus</i>)
BVDV-1	Vírus da Diarreia Viral Bovina tipo 1
BVDV-2	Vírus da Diarreia Viral Bovina tipo 2
BVDV-3	Vírus da Diarreia Viral Bovina tipo 3
Cas	Proteínas Associadas à Crispr
CCP	Aminoácidos ricos em cisteína unidos em tandem
CD	Agrupamento de Diferenciação
CO ₂	Dióxido de Carbono (<i>Carbon dioxide</i>)
CP	Citopático
CRIB	Células de rim bovino resistentes à infecção por BVDV (<i>Cell resistant to BVDV infection</i>)
CRISPR	Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespçadas (<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>)
crRNA	RNA de CRISPR
CSFV	Vírus da peste suína clássica
CT	Cauda intracitoplasmática (<i>Cytoplasmic tail</i>)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSB	Quebras de dupla fita (<i>Double-strand breaks</i>)
ELISA	Ensaio Imunoabsorvente Ligado a Enzima
ES	Soro Equino (<i>Equine serum</i>)
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>

GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
gRNA	Ácido ribonucleico guia (<i>Ribonucleic acid guide</i>)
HDR	Reparação por recombinação homologa
Kb	Kilobase
MDBK	Células de rim bovino de Madin Darby (<i>Madin-Darby bovine kidney cells</i>)
Min	Minutos (<i>Minutes</i>)
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
mS	Milissegundos (<i>Milliseconds</i>)
mV	<i>Millivolts</i>
NCP	Não Citopático
NHEJ	Mecanismo de reparação não homologa (<i>Non-homologous end-joining</i>)
Nm	Nanômetros
PAM	<i>Protospacer adjacent motif</i>
PI	Persistentemente infectado
PI-3	Vírus da parainfluenza bovina
PRRSV	Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase
s	Segundos (<i>Seconds</i>)
SRCR5	<i>Scavenger Receptor Cysteine-Rich Domain 5</i>
STP	Serina, Treonina e Prolina (<i>Serine, Threonine and Proline residues</i>)
TALEN	Nucleases com efetores do tipo ativador transcricional
tracrRNA	Ácido ribonucleico curto de transativação
VSV	Vírus da estomatite vesicular
ZFN	Nucleases <i>Zinc fingers</i>
%	Porcentagem (<i>Percentage</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Generalidades do BVDV	15
2.2 Importância e perdas econômicas.....	18
2.3 Genômica e biologia molecular do BVDV	19
2.4 Edição gênica utilizando o sistema CRISPR/Cas9 para gerar resistência a enfermidades	21
2.6 Receptor celular CD46	25
2.7 Células CRIB resistentes à infecção com pestivirus	28
3. HIPÓTESE.....	31
4. OBJETIVOS	32
4.1 Objetivo geral	32
4.2 Objetivos específicos.....	31
5. ARTIGO CIENTÍFICO	32
6. CONCLUSÕES	61
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	62
8. REFERÊNCIAS.....	64

1. INTRODUÇÃO

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é um dos principais patógenos virais que ocasiona doenças clínicas de grande importância em bovinos. A presença deste vírus nos rebanhos representa um grande risco para a produtividade devido às perdas econômicas significativas, principalmente pelos efeitos reprodutivos e imunossupressores da infecção em bovinos (RIDPATH, 2010). Por esta razão, diferentes estratégias de prevenção e controle têm sido implementadas em países desenvolvidos com um enfoque multifatorial, incluindo ferramentas como técnicas diagnósticas eficientes, vacinação, biossegurança e identificação de animais persistentemente infectados (PI; WALZ *et al.*, 2010). No entanto, a implementação e efetividade dos programas de controle pode variar dentro dos diferentes países e regiões, principalmente pelas falhas na definição de estratégias de vacinação que não conseguem prevenir por completo a infecção, devido ao grau de heterogeneidade do vírus e a falhas nos protocolos de biossegurança (NEWCOMER & GIVENS, 2016). Ademais, os países em via de desenvolvimento apresentam uma falta de implementação efetiva de programas de controle por não reconhecerem a importância do vírus e seu impacto na produção bovina, já que não há uma análise epidemiológica adequada da presença da doença nas regiões, tampouco nenhuma análise econômica que mostre seu impacto na produtividade agropecuária de cada país. A utilização da tecnologia de edição gênica nos animais de produção pode contribuir diretamente na melhoria da produtividade e da saúde pública (TAN *et al.*, 2016). A implementação do sistema de edição gênica formado por Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (CRISPR) e sua proteína associada-9 (Cas 9) no estudo de patógenos importantes, como no caso do BVDV ou do Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína (PRRSV), pode levar ao desenvolvimento de resistência a tais doenças, sendo este um mecanismo alternativo moderno para o controle e erradicação de doenças de alto impacto econômico na produção pecuária (BURKARD *et al.*, 2017). No entanto, a modulação gênica com um objetivo terapêutico deve ser precisa para obter efeitos e resultados desejados, pelo qual é necessário conhecer a biologia molecular e o processo de infecção e replicação dos patógenos. Os mecanismos de infecção, entrada, montagem e liberação do BVDV não têm sido compreendidos por completo, mas sabe-se que o CD46 é o principal receptor de entrada do BVDV em células bovinas (KREY *et al.*, 2006), tendo-se em conta que este receptor também tem diversas funções biológicas. A estrutura do CD46 é constituída por uma porção extracelular que consiste em quatro

módulos de controle do complemento unidos em tandem (CCPs) seguidos por uma região rica em resíduos de serina, treonina e prolina (STP; LISWEZSKI *et al.*, 2005). Na porção extracelular foram identificados dois oligopeptídeos localizados no módulo CCP mais distal, o CCP1. Estes oligopeptídeos, EQIV e GQVLAL, conformam a plataforma de adesão que interage com as glicoproteínas virais e permite a infecção por BVDV (KREY *et al.*, 2006). Certas linhagens celulares suscetíveis ao BVDV, como as células MDBK, são rotineiramente utilizadas para estudos de infectividade com o vírus, havendo uma linhagem MDBK resistente ao BVDV, denominada de células CRIB. A hipótese principal deste estudo foi que as células CRIB apresentam uma mutação no receptor CD46 que está relacionada com a resistência à infecção com o BVDV, localizada no CPP1 do CD46, especificamente junto aos oligopeptídeos EQIV e GQVLAL. Desta forma, propusemos neste trabalho o sequenciamento do gene do CD46 nas células CRIB em comparação à linhagem MDBK suscetível ao BVDV e fibroblastos bovinos, com a subsequente edição gênica do éxon 1 do gene do receptor CD46 por CRISPR/Cas9 em células MDBK suscetíveis, junto aos oligopeptídeos que conformam a plataforma de união ao vírus, e testar a infectividade das células mutantes para o BVDV.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Generalidades do BVDV

Em 1946, pesquisadores da Universidade de Cornell, em Ithaca, Estado de Nova York nos EUA, conduziram um estudo no qual o BVDV foi identificado pela primeira vez. Em 1950, casos com as mesmas características, mas com um quadro mais grave, foram relatados no Canadá e na Alemanha, aos quais foi atribuído o nome de "Doença das mucosas". Apesar disso, e com a ajuda da neutralização viral, foi demonstrado que a doença descrita em Ithaca e a doença da mucosa foram produzidas pelo mesmo vírus (GILLESPIE *et al.*, 1961; KNIAZEFF *et al.*, 1961; LEE & GILLESPIE, 1957; OLAFSON; MCCALLUM; FOX, 1946). Atualmente, este vírus foi detectado em todo o mundo e é considerado como um dos principais patógenos de bovinos em muitos países (RIDPATH, 2010); e é capaz de produzir doenças clínicas de grande importância, o que gera perdas econômicas significativas em todo o mundo.

Este vírus foi classificado como membro da família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus*, e apresenta uma ampla variabilidade antigênica, razão pela qual, os vírus agrupados com o título de BVDV são muito heterogêneos. A análise filogenética dos isolados identificados como BVDV revelou dois grupos genéticos distintos: o BVDV tipo 1 (BVDV-1) e o BVDV tipo 2 (BVDV-2; THIEL *et al.*, 2005). No tipo 1 se encontram a maioria dos vírus vacinais e das cepas de referência, enquanto que no tipo 2, identificam-se as cepas dos surtos de diarreia viral bovina aguda e a doença hemorrágica (principalmente presente na América do Norte). A análise filogenética também mostrou que há vários subgêneros, com 12 do BVDV-1, e dois do BVDV-2. Depois, foram identificados outros isolados na América do Sul e no Sudeste Asiático, que eram semelhantes ao BVDV-1 e ao BVDV-2, com a capacidade de estabelecer terneiros persistentemente infectados (PI), pelo que se denominou como BVDV-3, ou *Hobi-like virus* (RIDPATH, 2010). Por outro lado, recentemente Smith *et al.* (2017) propuseram uma reclassificação do gênero *Pestivirus*, onde os vírus da diarreia viral bovina 1 (BVDV1), vírus BVDV2 e Hobi-like foram renomeados como *Pestivirus A*, *Pestivirus B* e *Pestivirus H*.

Além da classificação mencionada anteriormente, o BVDV também pode ser classificado de acordo com a capacidade de produzir efeito citopático em cultivo celular. Nesta classificação, podem se encontrar dois biótipos: biótipos não citopático (NCP) e citopático (CP). Os biótipos CP surgem por mutações e recombinações que ocorrem no

NCP (GAMLEN *et al.*, 2010) e, na maioria dos casos, entre 70-90% das cepas, são do tipo NCP (SALIKI & DUBOVI, 2004).

Os principais animais afetados pelo BVDV são os bovinos, mas também se evidenciou sua presença em diferentes espécies, como ovinos, caprinos, suínos, bubalinos, bisontes, javalis, cervos e lhamas, o que é um fator importante a ter em conta no delineamento de estratégias de controle (PASSLER & WALZ, 2009). O vírus pode produzir diferentes quadros clínicos, como por exemplo, infecção subclínica, doença respiratória, enfermidade gastroentérica aguda ou crônica com diarreia e erosões no trato gastrointestinal, doença hemorrágica e doença hiperaguda (BAKER, 1995), assim como imunossupressão crônica, patologias cutâneas e crescimento retardado. Ademais, por sua capacidade de reduzir os linfócitos circulantes e supressão da imunidade inata, o BVDV apresenta a capacidade de associação com patógenos secundários que contribuem ao complexo de doenças respiratórias bovinas (RIDPATH, 2010). Ainda assim, sabe-se que a maioria das infecções em animais imunocompetentes parece cursar de forma subclínica (RIDPATH, 2010). Em fêmeas prenhes, o vírus pode gerar diferentes consequências, dependendo da idade gestacional, como, por exemplo, baixas taxas de concepção e de prenhez, mortalidade embrionária precoce, mortalidade fetal, mumificação fetal, natimortos, malformações congênitas e neonatos PI (WALZ *et al.*, 2010). No entanto, as consequências da infecção dependem do potencial patogênico, biótipo, amostra viral, idade e imunidade do animal.

A transmissão do vírus ocorre de forma horizontal e pode ocorrer tanto por contato direto como indireto por meio de secreções, excreções contaminadas, descargas nasais, urina, leite, sêmen, saliva, lagrima e fluidos fetais (HOUE, 1999; LANYON *et al.*, 2014). Igualmente, o vírus pode ser transmitido através da placenta, gerando terneiros PI, os quais geralmente representam os principais reservatórios desta doença, por excretarem o vírus continuamente em grandes quantidades, tornando-os fontes primárias de disseminação do vírus (ARENHART *et al.*, 2009; HOUE, 1995; MCCLURKIN *et al.*, 1984). Os animais PI são resultado da infecção de vacas prenhes com o BVDV NCP entre 40 e 120 dias de gestação, resultando imunotolerantes ao vírus, com o sistema imune não identificando o vírus como um antígeno estranho, excretando desta forma grandes quantidades de partículas virais, já que o animal não desenvolve anticorpos específicos contra o BVDV (HOUE, 1999).

Para a identificação do BVDV, têm sido utilizados diferentes ferramentas que dependem do tipo de diagnóstico a ser realizado. A principal e mais segura é o isolamento viral, que é a técnica padrão-ouro, para a qual, a melhor amostra é o sangue completo, no entanto, no caso de fetos abortados ou amostras de necropsias, a melhor amostra são órgãos linfoides. Outras técnicas usadas para a detecção dos antígenos específicos do vírus são a imunofluorescência, imunohistoquímica e ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA). Porém, estes métodos apresentam uma menor sensibilidade e confiabilidade quando comparados com o isolamento viral. Por exemplo, a técnica de ELISA é útil para a identificação de PIs, mas não é confiável para o diagnóstico de doenças agudas. A detecção de ácidos nucleicos pode ser realizada pela reação da transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), que tem uma alta sensibilidade e permite realizar diagnóstico de PIs em *pools* de amostras, como por exemplo, em *pools* de soros ou em testes para tanques de leite, o que reduz custos. Porém, é necessário que o desenho de *primers* para RT-PCR seja muito cauteloso para conferir sensibilidade diagnóstica correta (SALIKI & DUBOVI, 2004).

Para a detecção de anticorpos nos animais, se expostos ao vírus de forma natural ou por imunização, os métodos principais são ELISA e soroneutralização (LANYON *et al.* 2014). Porém, os resultados devem ser interpretados tendo em conta a informação importante do contexto na fazenda e a anamnese, como, por exemplo, se realizam vacinação, que tipo de vacina é utilizada, ou qual protocolo de biossegurança é implementado. Assim mesmo, é importante reconhecer-se que a prevalência de anticorpos varia entre os países, sendo influenciada pela utilização de vacinas, o que pode se encontrar entre 40 a 90% dos animais (WALZ *et al.*, 2010).

A identificação e eliminação de animais PI é um dos pontos mais importantes para os programas de controle. O diagnóstico de PIs pode ser realizado por isolamento, imunohistoquímica, RT-PCR e ELISA de antígenos com boa sensibilidade e especificidade. Além disto, qualquer tipo de amostra de secreção, excreção ou tecido é útil para realizar o diagnóstico devido ao alto título viral presente nos PIs (SALIKI & DUBOVI, 2004). A ELISA de antígenos pode ser menos onerosa, testando animais individualmente, e é de eleição para animais adultos PI. No caso de terneiros, é preferível o uso de RT-PCR já que os anticorpos maternos não têm nenhuma interferência com esta técnica o que pode ocorrer com o isolamento ou teste de antígenos por ELISA. Finalmente, recentemente têm sido desenvolvidas técnicas para utilizar pequenas biopsias

de orelhas, feitas durante a identificação do animal, como amostras para diagnóstico de antígeno por ELISA e imunohistoquímica (LANYON *et al.*, 2014).

2.2 Importância e perdas econômicas

A infecção com BVDV é reconhecida por ter um impacto econômico significativo, que pode variar entre regiões e países. As perdas diretas são relacionadas principalmente aos efeitos reprodutivos e imunossupressores da infecção, entre estes, incluem-se o incremento da mortalidade devido à imunossupressão, a redução na taxa de concepção, a mortalidade embrionária precoce, a mortalidade fetal, os natimortos, as malformações congênitas, os animais persistentemente infetados e a redução da produção láctea. Igualmente, as perdas econômicas podem variar segundo o impacto da doença na fazenda e de fatores da propriedade ou região. O impacto da fazenda depende de fatores como a duração da infecção, a virulência da cepa, a imunidade do rebanho, o nível de produção e doenças concomitantes. Os fatores da propriedade incluem a densidade do rebanho, as condições de manejo da fazenda, a biossegurança, se utilizam ou não vacinação e que tipo de vacina. É por isto que há uma ampla variação nas estimativas de perdas econômicas e nos tipos de perdas, entre os diferentes estudos que têm sido realizados, uma vez que se encontram relacionadas à distinção nas variáveis biológicas do BVDV e à heterogeneidade dos projetos de estudo (RICHTER *et al.*, 2017).

Richter *et al.* (2017) realizaram uma metanálise com ênfase nas perdas econômicas diretas pelo BVDV abrangendo 15 países, determinando perdas de US\$ 0.50 a 687.80 por animal, além de uma média de perdas diretas de US\$ 199.50 por vaca de leite e de US\$ 174.60 por vaca de corte, ressaltando que as perdas são 20% menores em gado de corte. Os autores também mostram que os principais fatores que tem uma influência significativa nas perdas econômicas são a mortalidade, a morbidez, natimortos, abortos, reinfecção e o descarte prematuro.

Quanto aos países em desenvolvimento, não há um reconhecimento do BVDV como um problema de grande importância, e é por tal razão que estes não têm sistemas de controle, erradicação e vacinação implementados. Isto pode ser observado pelo fato de que a maioria das avaliações sobre as perdas econômicas têm sido conduzidas na Europa, em outros países de primeiro mundo ou em países de maior desenvolvimento. No estudo de Richter *et al.* (2017), encontrou-se que os países que registravam as estimativas das perdas diretas tinham maior probabilidade de implementar programas de intervenção.

Ademais, as probabilidades de realizar programas de controle e/ou erradicação para o BVDV foram dez vezes maiores nos países que registraram perdas diretas devido ao vírus (RICHTER *et al.*, 2017). É por estes fatos que há um reconhecimento de que nos países em desenvolvimento ainda não há a quantificação direta das perdas, pelos menos não com estudos confiáveis e reconhecidos a nível mundial, pelo que, nestes países há uma falta geral de informação econômica e epidemiológica do BVDV. Porém, é importante reconhecer que só as perdas diretas pela infecção do BVDV justificam a implementação de programas de prevenção e controle da doença.

Em outro estudo (PINIOR *et al.*, 2017), realizou-se uma revisão sistemática que mostrou informações relevantes sobre as avaliações econômicas e financeiras dos programas de prevenção e controle do BVDV. Novamente, os autores observaram que a maioria dos estudos econômicos sobre programas de prevenção e controle são realizados na Europa, América do Norte e Nova Zelândia, ressaltando de novo a falta de estudos de alto impacto na América Latina. Dentro do impacto econômico, em alguns países como Noruega, Irlanda, França e Suíça, os estudos demonstram a justificativa econômica dos programas de controle implementados em nível nacional. Além disso, encontrou-se informação evidenciando que a erradicação da doença na Dinamarca foi eficiente economicamente (PINIOR *et al.*, 2017). Por sua vez, estes autores encontraram uma forte heterogeneidade nos tipos de estudos, metodologias e avaliações econômicas, o que não permitiu gerar uma recomendação objetiva sobre estratégias de controle. Porém, em geral os estudos mostram que é a implementação de programas de controle e erradicação são economicamente eficientes para o BVDV, que a informação que gerada nestes tipos de análises é vital para as autoridades de saúde pública, e que auxiliam nos processos de decisão dos setores públicos e privados para a implementação de programas de prevenção e controle do BVDV.

2.3 Genômica e biologia molecular do BVDV

O BVDV é um vírus pequeno, de 40 a 60 nanômetros (nm), com capsídeo e envelope. Como genoma, o vírus contém uma molécula de RNA linear, fita simples e polaridade positiva de aproximadamente 12,5 kilobases (kb). O genoma viral codifica para uma poliproteína grande que é processada por proteases do vírus para gerar proteínas virais, estruturais e não estruturais. O RNA genômico contém nucleotídeos nas extremidades 3' e 5' que não codificam para proteínas, sendo regiões não traduzidas, as

quais se encarregam de formar as estruturas secundárias que interagem com as proteínas virais e celulares, para regular a replicação e transcrição de RNA (RIDPATH, 2010).

As três proteínas estruturais virais do BVDV são a Erns, a E1 e a E2, as quais fazem parte do capsídeo que envolve e protege o RNA gnômico. A proteína Erns é uma proteína que se encontra associada à partícula viral, mas também pode se encontrar na forma solúvel. Esta proteína apresenta atividade RNase, portanto, é importante para modular e limitar a resposta imune do hospedeiro. As glicoproteínas E1 e E2 são proteínas integrais de membrana necessárias para a infecção, já que interagem com os resíduos hidrofóbicos das âncoras de membrana celular. A porção terminal da proteína E2 possui a função de receptor de união e também possui o domínio de fusão de membrana, enquanto que, a E1 pode atuar como chaperona da E2. Esta interação previne a ativação prematura do domínio de fusão de membrana de E2 até o momento da infecção de uma célula. É importante ressaltar que a proteína E2 contém os maiores determinantes antigênicos, e por isto, a maior parte da resposta humoral protetora está dirigida contra esta proteína, visto que somente os anticorpos produzidos contra a E2 são neutralizantes e inibem efetivamente a infecção (LIANG *et al.*, 2003; NEILL, 2013; RIDPATH, 2010).

As sete proteínas não estruturais do BVDV são: Npro, p7, NS2 NS3, NS4a, NS4b, NS5a e NS5b. A Npro é uma proteinase única do gênero dos pestivírus e possui uma função na supressão do sistema imune inato do hospedeiro, já que interfere com a atividade do fator regulador do Interferon 3, o que leva ao bloqueio da produção de Interferon tipo 1. A proteína p7 é necessária para a produção de partículas virais infecciosas. A NS4a tem atividade de cofator da NS3. As proteínas NS4b e NS5a são componentes do complexo de replicação viral. A NS5b é uma RNA polimerase dependente de RNA, sendo a proteína mais importante no processo de replicação do genoma (HILTON *et al* 2006; NEILL, 2013; ZHONG; GUTSHALL; DEL VECCHIO, 1998). As proteínas NS2 e NS3 têm atividade protease, sendo responsáveis pelas clivagens proteolíticas da poliproteína; ademais, a proteína NS3 contém um domínio RNA helicase, que participa no processo de replicação viral. Portanto, tais proteínas são necessárias para a viabilidade dos virions. Estas proteínas se encontram primeiro como uma proteína NS2/3 nos biótipos NCP, mas no princípio da infecção, esta sofre uma clivagem que é necessária para o processo de replicação. No entanto, os biótipos CP possuem mudanças nas sequências que codificam a NS2/3 que resultam na clivagem da proteína NS2/3, o que confere às cepas o fenótipo citopático. Estas mudanças podem

ocorrer por duplicações genômicas, inserções de mRNA celular ou mutações (BALINT *et al.*, 2005; NEILL, 2013).

O processo de infecção e replicação do genoma viral ocorre após a união do vírus aos receptores celulares, mediada pelas proteínas E1 e E2. A internalização do vírus ocorre por endocitose clatrina-dependente, permitindo a entrada do vírus em uma vesícula endossômica. Uma diminuição no pH no endossoma permite a fusão do envelope viral com a membrana celular e, finalmente, o capsídeo se dissocia e o RNA genômico é liberado no citoplasma (GRUMMER; GROTHA; GREISER-WILKE, 2004; LECOT *et al.*, 2005; KREY; THIEL; RUMENAPF, 2005). A replicação do genoma ocorre por completo no citoplasma celular, onde o RNA genômico de polaridade positiva é traduzido para originar uma poliproteína, que vai ser clivada por proteases celulares e virais, dando origem às proteínas estruturais e não-estruturais. As proteínas não-estruturais ajudam na clivagem da poliproteína e atuam na replicação do genoma, enquanto que as proteínas estruturais servem para a construção dos virions. A replicação do genoma também inclui a síntese de um RNA de polaridade negativa, que serve de molde para a síntese do RNAs de polaridade positiva. Estes RNA de polaridade positiva podem servir para gerar mais proteínas ao serem traduzidos, mas também servem como genoma para a montagem de novas partículas virais, que ocorre em associação do complexo de Golgi e do retículo endoplasmático liso onde se encontram as proteínas virais em processo de maturação. Uma vez formadas, as partículas virais permanecem localizadas em vacúolos no citoplasma. Entretanto, também se derivam membranas externas com as glicoproteínas virais pelo processo de brotamento através das membranas celulares e, posteriormente, ocorre a liberação dos virions pela fusão dos vacúolos com a membrana plasmática (RIDPATH; FLORES, 2007; NEILL, 2013).

2.4 Edição gênica utilizando o sistema CRISPR/Cas9 para gerar resistência a enfermidades

Com o advento da tecnologia de edição do genoma, há uma grande variedade de técnicas hoje disponíveis que podem ser implementadas visando a modificação genética de animais de produção. Estas ferramentas permitem estabelecer mudanças específicas no em regiões alvo, sem gerar outras mudanças ao longo do DNA, com a habilidade de que sequências gênicas individuais sejam silenciadas, eliminadas ou até mesmo inseridas de maneira fácil e eficiente no genoma hospedeiro. O amplo espectro de aplicações destas tecnologias pode ajudar no melhoramento da sanidade, da saúde pública, da biomedicina

e da biotecnologia. Em adição, estas técnicas podem ser aplicadas na produção de biofármacos, xenotransplantes e modelos de grandes animais para o estudo de doenças humanas e animais. Igualmente, na produção animal, o aproveitamento da introdução de uma diversidade de variações genéticas pode ser usado para melhorar características desejáveis (TAN *et al.*, 2016).

Dentre as técnicas de edição gênica que realizam quebras de dupla fita em locais específicos do DNA, existem as nucleases baseadas em fatores de transcrição eucarióticos, como as *zinc fingers* (ZFN), e as nucleases com efetores do tipo ativador transcricional (TALENs) derivadas das bactérias *Xanthomonas* sp. Mais recentemente, foram descritas as endonucleases guiadas por RNA, conhecidas como proteínas associadas as repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas, ou o sistema CRISPR/Cas9 (CONG *et al.*, 2013; HSU; LANDER; ZHANG, 2014).

O sistema CRISPR/Cas9 é um mecanismo imunitário adaptativo que se encontra em bactérias e *archaea*, cuja função é usar nucleases guiadas por RNA para clivar elementos genéticos estranhos, como bacteriófagos e plasmídeos de DNA (CONG *et al.*, 2013, JINEK *et al.* 2012). O sistema consiste na endonuclease Cas, associados à CRISPR, que é formada por uma série de elementos repetitivos não codificantes interespaçados por sequências curtas variáveis, chamados espaçadores. Esses espaçadores curtos são derivados de elementos genéticos estranhos, e constituem a base para a memória imune adaptativa destes elementos invasores (BARRANGOU *et al.*, 2007). As sequências correspondentes nos genomas dos fagos e plasmídeos são chamadas de protoespaçadores e cada protoespaçador é flanqueado por uma sequência curta denominada de *protospacer adjacent motif* (PAM), que desempenha um papel crítico no mecanismo de busca e reconhecimento de alvos da Cas9. A matriz CRISPR é transcrita em moléculas curtas de RNA, chamadas RNAs de CRISPR (crRNA), que em conjunto com um segundo RNA curto de transativação (tracrRNA) formam um complexo com a Cas9 para facilitar o reconhecimento e clivagem do alvo. Além disso, o crRNA e o tracrRNA podem ser combinados em uma única molécula formando o RNA guia (gRNA) sintético (DOUDNA & CHARPENTIER, 2014; DELTCHEVA *et al.*, 2011; PELLAGATTI *et al.*, 2015).

A ferramenta de edição genômica CRISPR/Cas9 utiliza a sequência gRNA programável para guiar o complexo até a sequência alvo específica no DNA, onde a nucleasse Cas9 vai realizar a clivagem de dupla fita (*double strand break*, DSB) no DNA. A DSB será reconhecida e reparada por mecanismos de reparo celular endógenos como

o mecanismo de reparação não homólogo (NHEJ) ou por recombinação homóloga (*homology directed repair*, HDR), e os dois podem ser usados para editar o genoma. A via NHEJ é mais propensa a cometer erros de reparo, gerando inserções ou deleções nos sítios de clivagem (*indels*). O HDR utiliza sequências de DNA homólogas como molde para o reparo. Ao fornecer um molde de reparo exógeno, o HDR pode ser utilizado para editar com precisão a sequência genômica ou inserir DNA exógeno sítio-específico (CONG *et al.*, 2013; PELLAGATTI *et al.*, 2015).

Nos últimos anos, este sistema CRISPR/Cas9 se converteu na ferramenta de engenharia genética mais amplamente utilizada porque oferece simplicidade, flexibilidade e precisão para o estudo da genômica funcional e de edição genômica de diversos organismos. Além disso, a metodologia é rápida, de baixo custo, facilidade de uso, e de múltiplas aplicações. Mais importante ainda, este sistema CRISPR/Cas9 é mais eficiente, específico e barato que outras tecnologias utilizadas na edição genética, como as ZFN e as TALENs (CEASAR *et al.*, 2016; PELLAGATTI *et al.*, 2015).

No ano de 2016, foi publicado um importante estudo do grupo de pesquisa da Universidade de Missouri, relatando o sucesso da edição genômica com o sistema de edição CRISPR/Cas9 em zigotos para gerar suínos vivos com deleções no éxon 7 do gene CD163, um mediador de entrada viral, produzindo a resistência ao PRRSV (PRATHER *et al.*, 2017; WHITWORTH *et al.*, 2016). Este agente produz uma das doenças infecciosas mais importantes na produção suína devido ao forte impacto econômico, com perdas produtivas estimadas em mais de US\$ 664 milhões anuais nos EUA (HOLTKAMP *et al.*, 2013). O grupo de Missouri demonstrou uma grande aplicação desta ferramenta de edição gênica, com um grande impacto na produtividade e saúde animal no mundo. Como o vírus do PRRSV tem um tropismo estreito, somente infecta subgrupos específicos de macrófagos suínos (sendo a entrada celular mediada por endocitose), e incluem vários fatores e receptores no processo de entrada, utilizou-se um destes mediadores, o CD163, como alvo da edição para evitar a infecção pelo vírus. O CD163 é um receptor celular que se encontra envolvido no processo de fusão do vírus, e se expressa em altos níveis nos macrófagos. Igualmente, este receptor tem uma ampla variedade de funções biológicas, tais como realizar a remoção eficiente da hemoglobina livre do plasma sanguíneo (essencial devido às propriedades tóxicas e oxidativas do ferro presente na hemoglobina); e na regulação da inflamação, promovendo a produção de citocinas pró-inflamatórias quando interage com microrganismos patógenos, e efeitos anti-

inflamatórios pela indução da expressão de interleucina 10 (BURKARD *et al.*, 2017; PRATHER *et al.*, 2017; WHITWORTH *et al.*, 2016). Para realizar a edição gênica, os autores identificaram as localizações dos genes e os elementos regulatórios do genoma. Neste caso, a proteína CD163 possui nove domínios, dos quais o domínio 5 é o local que interage com o vírus no processo de infecção e não tem funções biológicas associadas conhecidas. O gene CD163 tem 16 éxons, sendo o éxon 7 o que codifica para o domínio 5 (VAN GORP; DELPUTTE; NAUWYNCK, 2010). Como estratégia de edição, houve a excisão do éxon 7 com o sistema de edição CRISPR/Cas9, microinjectando nos zigotos duas sequências gRNAs (RNAs), juntamente com mRNA que codifica a nuclease Cas9 no citosol de zigotos suínos. Esta estratégia levou à modificação genética com a deleção do domínio SRCR5 na proteína CD163, gerando suínos completamente saudáveis, além de manter as funções biológicas da proteína. Como resultado, demonstraram que a remoção do domínio da proteína derivou em uma resistência completa dos macrófagos ao vírus, com experimentos que mostram a resistência aos genótipos Europeu 1 e Americano-Asiático 2. Os macrófagos com a deleção mantêm as habilidades de realizar por completo as funções biológicas associadas ao CD163. A remoção do domínio teve a vantagem de remover a sequência de interação-alvo do vírus, tornando assim mais difícil para o vírus se adaptar.

Finalmente, denota-se que é possível utilizar uma abordagem de edição genômica direta para que um animal se torne resistente a uma infecção viral, mantendo a função biológica do gene direcionado. A técnica para a edição do genoma foi um sucesso para a produção de suínos resistentes ao vírus, o que pode ser extrapolado a diferentes animais e tipos de patógenos, sendo necessária a identificação das localizações dos genes e os elementos regulatórios do genoma, como a função desses genes para poder ter sucesso na edição gênica com CRISPR/Cas 9.

2.5 Receptor celular CD46

O receptor CD46 é uma glicoproteína transmembrana tipo 1, identificada como uma proteína cofator de membrana que pertence à família de reguladores da ativação do complemento e se encontra presente em todas as células nucleadas em humanos (RILEY-VARGAS *et al.*, 2004). Nos bovinos, há relatos da presença do CD46 no espermatozoide (JANKOVICOVA *et al.*, 2011) e em células sanguíneas como linfócitos, plaquetas, granulócitos e eritrócitos (ANTALÍKOVÁ *et al.*, 2007), sendo também detectada na forma solúvel (ALZAMEL *et al.*, 2016). Sua função principal é regular a ativação do sistema complemento, fundamentalmente porque esta proteína une-se aos produtos do complemento C3b e C4b depositados nas membranas de células hospedeiras, servindo como um cofator para a sua inativação proteolítica pelo fator I da proteína serina plasmática. Desta forma, o CD46 impede a ativação da cascata do sistema complemento, protegendo as células hospedeiras do ataque autólogo do complemento (CHOILEAIN; ASTIER, 2011). Outras funções atribuídas ao CD46 incluem: modulação da autofagia e da atividade imune adquirida, controle das funções e da ativação de células T e de células apresentadoras de antígenos, como monócitos e células dendríticas (YAMAMOTO *et al.*, 2013). Cardone, Le Friec e Kemper (2011) descreveram que a ativação do CD46 se encontra envolvido no processo de diferenciação do fenótipo de linfócitos T. Além disto, acredita-se que pode haver uma função na proteção do espermatozoide após a reação do acrosoma durante a fecundação (JANKOVICOVA *et al.*, 2011). Finalmente, o CD46 é reconhecido por ser um receptor de entrada para diferentes vírus e bactérias em diferentes espécies, como o vírus do sarampo, o herpesvirus humano 6, adenovirus, *Neisseria sp.*, *Streptococcus pyogenes*, e BVDV (CATTANEO, 2004; MAURER *et al.*, 2004).

A estrutura do CD46 é formada pela porção extracelular que consiste de quatro módulos de controle do complemento, de aproximadamente 60 aminoácidos ricos em cisteína unidos em tandem (CCP; KREY *et al.*, 2006), seguida de uma região rica em serina, treonina e prolina (STP), com múltiplos sítios de glicosilação, e um segmento de 12 aminoácidos. Possui também uma fração transmembrana (TM) e um cauda citoplasmática curta (CT; LISWEZSKI *et al.*, 2005). Na Figura 1 pode ser observada a representação gráfica do receptor CD46.

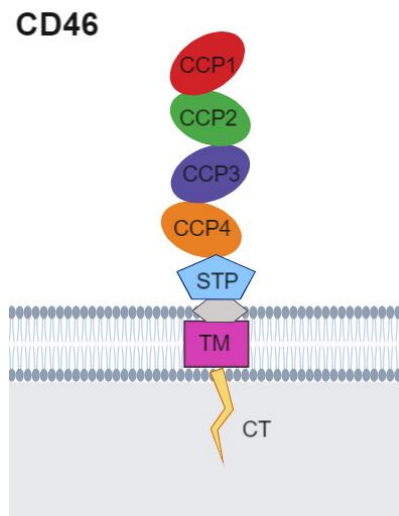


Figura 1. Representação do receptor CD46. Em vermelho o CCP1, em verde o CCP2, em roxo o CCP3, em laranja o CCP4, em azul a região rica em serina, treonina e prolina (STP), em rosa a fração transmembrana (TM) e em amarelo a cauda citoplasmática (CT). Fonte: Elaborada pelo autor.

Em bovinos, o gene CD46 possui 14 éxons, e na literatura há o relato de seis isoformas, com transcritos sendo diferentes devido ao *splicing* alternativo (ZEZAFOUN; DECREUX; DESMECHT, 2011). No genoma do CD46, os éxons 1 a 5 codificam para os quatro CCPs, os éxons 6 a 10 codificam para a região STP, seguido dos éxons 11 e 12 que codificam para o domínio transmembrana, com os éxons 12 a 14 codificando para as caudas citoplasmáticas curtas (ZEZAFOUN; DECREUX; DESMECHT, 2011). Em células de humanos, as isoformas são diferenciadas principalmente pelos diferentes *splicing* alternativos em duas regiões, primeiro na região STP, e segundo na cauda citoplasmática curta (CHOILEAIN & ASTIER, 2011), enquanto que nos bovinos, Zezafoun, Decreux e Desmecht (2011) encontraram que o *splicing* alternativo pode gerar três versões diferentes na porção extracelular e cinco caudas citoplasmáticas. Na Figura 2, de Zezafoun, Decreux e Desmecht (2011), é exemplificado o genoma do CD46 bovino e as seis isoformas do CD46 derivadas do *splicing* alternativo.

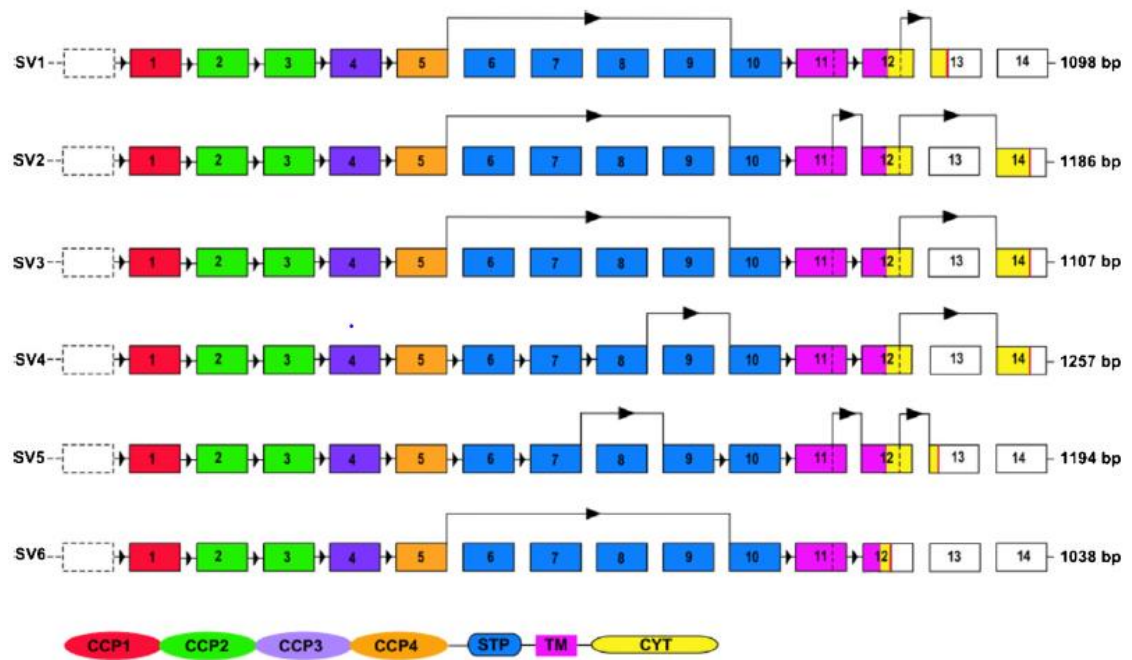


Figura 2. Descrição gráfica das seis isoformas (SV) do CD46 produzidas pelo *splicing* alternativo do gene do CD46. As caixas representam os 14 éxons que possuem mRNA do CD46 bovino. Fonte: Zezafoun, Decreux e Desmecht (2011).

O CD46 tem múltiplas interações com ligantes fisiológicos e patológicos, que envolvem diferentes regiões no receptor. Por exemplo, as frações do complemento C3b e C4b interagem com CCP2, CCP3 e CCP4, vírus do sarampo e adenovírus e se unem ao CCP1 e CCP2; o herpesvírus humano 6 une-se ao CCP2 e CCP3; o *Streptococcus pyogenes* interage com CCP1 e CCP2; e a *Neisseria* sp. interage com CCP3 e a região STP. Acredita-se que a interação entre o espermatozoide e o oócito durante a fecundação envolva o domínio CCP1 (YAMAMOTO *et al.*, 2013). No caso do BVDV, Krey *et al.* (2006) identificaram a localização da região de união no domínio CCP1. Os autores utilizaram moléculas quiméricas de CD46 bovino com frações do CD46 suíno para localizar a área de união, tendo em conta que o CD46 do suíno não se encontra envolvido na invasão do BVDV. Naqueles experimentos, os autores encontraram que a expressão do receptor com a deleção do CCP1 mostrou ter uma diminuição na suscetibilidade ao vírus, também encontrando que o receptor quimérico CD46 bovino com a porção CCP1 do suíno teve uma menor suscetibilidade ao vírus, sendo este domínio essencial para a função do receptor.

Nos experimentos realizados para localizar as porções exatas do CCP1 que interagem com o BVDV, as análises sistemáticas de quimeras CD46 revelaram a

importância de dois oligopeptídeos presentes no CCP1, o tetrapeptídeo EQIV (posições 66-69) e o hexapeptídeo GQVLAL (posições 82-87), confirmando que estes dois peptídeos tem um papel principal, formando uma plataforma de união que interage com o vírus e permite a infecção do BVDV (KREY *et al.*, 2006). Na Figura 3 pode ser observada a localização dos dois peptídeos descritos anteriormente. Também se observou que a troca dos aminoácidos GQVLAL do receptor bovino pelo hexapeptídeo ALPTFS presente no domínio CCP1 do receptor suíno eliminaram a função como receptor do vírus. Além disto, encontraram que a mutação no receptor CD46 suíno com a troca destes peptídeos, para formar uma quimera com os peptídeos EQIV e GQVLAL, resultou em um aumento da suscetibilidade nas células ao vírus (KREY *et al.*, 2006). Tais informações se tornam chave para a possibilidade de manipulação genética do CD46 bovino para eliminar a entrada do BVDV, sendo o desafio uma edição gênica que mantenha a funcionalidade da proteína.

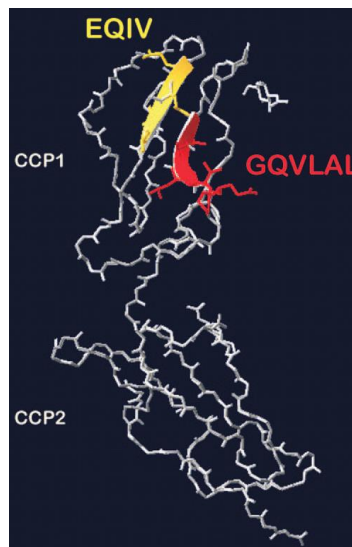


Figura 3. Modelo da estrutura cristalina do CCP1 e do CCP2 do CD46 bovino, demonstrando as posições dos peptídeos EQIV (em amarelo) e GQVLAL (em vermelho). Fonte: Krey *et al.* (2006).

2.7 Células CRIB resistentes à infecção com pestivírus

As células CRIB são uma linhagem celular de rim bovino (MDBK) resistente à infecção do BVDV e outros pestivirus, como o vírus da peste suína clássica (CSFV) e o vírus da doença da fronteira (BDV). Esta linhagem foi obtida por clonagem e seleção de células MDBK que sobreviveram à infecção com uma cepa do BVDV altamente citopática (FLORES & DONIS, 1995). Estas células não permitem a entrada do vírus BVDV, aparentemente devido à falta de uma função necessária para que o BVDV entre na célula e/ou inicie uma infecção produtiva. Nos experimentos prévios de Flores &

Donis (1995) foi confirmado que as partículas virais conseguem se aderir, mas não penetrar na célula, levando a pensar que essas células têm alguma modificação importante que altera uma função endosomal, da membrana plasmática, ou do receptor viral.

O fenótipo de resistência viral destas células é específico para o BVDV e outros pestivírus, não é uma consequência da expressão de uma atividade antiviral, nem um defeito na rota metabólica requerida para a replicação viral, já que mantém a suscetibilidade à infecção e replicação de outros vírus bovinos como o BHV-1, 2 e 4, BRSV, BAV, BEV, VSV, PI-3, BPV e BLV (FLORES & DONIS, 1995). Além disso, a evidência dos experimentos prévios mostra que as células CRIB permitem uma replicação eficiente do vírus se o bloqueio inicial for ultrapassado utilizando a electroporação para transferir o RNA genômico dentro da célula (FLORES; KREUTZ; DONIS, 1996). Complementarmente, Krey *et al.* (2006) mostraram que o receptor CD46 está presente na superfície celular das células CRIB.

A hipótese mais consistente exposta por Flores, Kreutz e Donis (1996) para explicar a resistência é que deve haver um evento posterior à adesão do vírus que seja responsável pela inabilidade dos pestivírus para infectar as células CRIB. Porém, os autores também não excluem a possibilidade de uma alteração física ou funcional do principal receptor de membrana, neste caso o CD46, que intermedia a ligação do vírus e sua subsequente entrada na célula, com o vírus possivelmente se aderindo a uma molécula mutante ou substituta que não permite mediar a entrada na célula (FLORES; KREUTZ; DONIS, 1996).

Uma análise detalhada da estrutura e do papel do CD46 nas células CRIB permitiria determinar se o receptor tem uma alteração funcional que esteja relacionada com a resistência à infecção pelo BVDV e que afete de maneira direta o processo de adesão e entrada do vírus na célula, o que pode evidenciar mecanismos a serem utilizados em busca da utilização de estratégias, como a edição gênica, para resistência ao BVDV.

3. HIPOTESE

- a) O sequenciamento do gene do receptor CD46 nas células CRIB permitirá a identificação e caracterização de uma possível alteração genômica em um dos domínios que esteja relacionada com a resistência à infecção com o BVDV.
- b) As edições gênicas no gene do receptor CD46 de células bovinas com CRISPRs permitirão a geração de linhagem(ns) de células modificadas com um alto grau de resistência à infecção com o BVDV, principalmente ao editar as principais bases do gene CD46 que codificam para a área da plataforma de união celular ao vírus.

4. OBEJTIVOS

4.1 Objetivo geral

- a) Compreender os mecanismos de infectividade do BVDV em células bovinas e a participação do receptor CD46 no processo de infecção e resistência ao BVDV.

4.2 Objetivos específicos

- a) Realizar o sequenciamento e pareamento da região genômica codificante para o receptor CD46 nas células CRIB, MDBK, e em fibroblastos bovinos.
- b) Estabelecer uma linhagem de células MDBK modificada geneticamente, utilizando o sistema CRISPR/Cas9 para realizar um *knockout* da região genômica codificante da plataforma de adesão ao BVDV no receptor CD46.
- c) Definir o grau de resistência à infecção ao BVDV nas linhagens de células MDBK editadas geneticamente no éxon 1 do receptor CD46.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

1

2

3

4

5

6

7

8

9 **The role of the CD46 receptor in the pathogenicity of the bovine viral diarrhea**

10 **virus infection in bovine cultured cells**

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21 Manuscrito em elaboração que será submetido para publicação no periódico *Microbes &*

22 *Infection.*

23

46 **1. Introduction**

47 Bovine Viral Diarrhea Virus (BVD) is one of the most important diseases in cattle
48 worldwide [1]. The presence of the virus in herds represents a major risk to productivity
49 due to significant economic losses, which are mainly associated with reproductive losses
50 and immunosuppressive effects [2,3]. The BVDV can cause two types of infection, an
51 acute or transient infection, and a persistent form. Persistently infected animals are the
52 main source of virus dissemination [4,5].

53 The BVD, as a disease, is caused by viruses belonging to the family *Flaviviridae*
54 genus *Pestivirus*, including bovine viral diarrhea virus 1 (BVDV1), BVDV2 and Hobi-
55 like viruses recently reclassified as *Pestivirus A*, *Pestivirus B* and *Pestivirus H* [6].
56 *Pestivirus* are small, single-stranded RNA, enveloped viruses that encode a large
57 polyprotein that is processed by virus proteases to generate structural and non-structural
58 proteins [7]. The viral structural proteins of the BVDV are the nucleocapsid C protein and
59 Erns, E1 and E2 [8]. The process of infection and replication of the viral genome occurs
60 after the binding of the virus to the CD46 cellular receptor, mediated by interactions of
61 glycoproteins E1 and E2 with the CD46 cell membrane receptor [9,10].

62 The CD46 receptor is a transmembrane glycoprotein, identified as a membrane
63 cofactor protein that belongs to the family of complement activation regulators and is
64 present in all cells in cattle [11]. The structure of the CD46 is constituted by an
65 extracellular portion that consists of four modules of control of the complement united in
66 tandem (CCPs) followed by a region rich in serine, threonine and proline residues (STP).
67 Moreover, it counts with a transmembrane fraction, an intracytoplasmic anchor and a
68 cytoplasmic tail (CT) [12,13]. The main function of CD46 is to regulate the activation of
69 the complement system [14]. Moreover, CD46 has several functions, including
70 modulation of autophagy and acquired immune activity, control of functions and

71 activation of T cells and antigen-presenting cells, such as macrophages and dendritic cells
72 [15]. Furthermore, CD46 is recognized as a receptor for different viruses and bacteria in
73 different species [16], including BVDV [9]. The extracellular portion of CD46 was
74 identified with two oligopeptides located in the more distal CCP module (CCP1), the
75 tetrapeptide EQIV (positions 66-69) and hexapeptide GQVLAL (positions 82-87). Such
76 oligopeptides conform the attachment platform that interacts with the viral glycoproteins
77 and allows BVDV infection [12]. The CD46 bovine gene has 14 exons, whereof exons 1
78 to 5 code for the four CCPs, exons 6 to 10 code for the STP region, followed by exons 11
79 and 12 that code for the transmembrane domain, and exons 12 to 14, coding for the
80 cytoplasmic tails [17]. On one hand, Exon 1, which encodes the whole CCP1 module, has
81 multiple allelic variations. On the other hand, the gene also counts with alternative
82 splicing variants that generates multiple CD46 isoforms. Additionally, the CCP1 allelic
83 diversity and alternative splicing subordinated variation of CD46 cytoplasmic tails
84 control cell permissivity to BVDV [17].

85 The BVDV grows and propagates well in cell cultures, and sometimes it can
86 become a problem as a contaminant in cell cultures, with the fetal bovine serum being
87 one of the potential viral contaminant sources [18,19]. Thereby, it is common the efforts
88 to generate cell cultures resistant to BVDV infection, such as the Cell Resistant to BVDV
89 (CRIB) [20]. CRIB cells are a bovine kidney cell line (derived from MDBK) resistant to
90 BVDV and other pestiviruses, such as classical swine fever and border disease virus. Such
91 cells appear not allow the entry of the BVDV virus, apparently due to the lack of a
92 function necessary for the BVDV to penetrate the cell and initiate a productive infection.
93 With this in mind, there is a possibility that such cells may have mutations in the CD46
94 receptor, possibly attaching the virus itself to a mutant molecule or substitute that does
95 not allow the mediation of the virus entry into the cell [21].

96 In order to better understand the mechanisms of BVDV infectivity in bovine cells
97 and the contribution of the CD46 receptor in the process of infection and resistance to
98 BVDV, the goals of this study were to genotype the CD46 in bovine cell lines susceptible
99 and resistant to BVDV, to subsequently delete sequences of the receptor to study the role
100 of the CD46 attachment platform in BVDV permissibility for cell infection in cattle.

101 **2. Materials and Methods**

102 *2.1 Cell cultures*

103 Primary fibroblast cell cultures were established from a fetus of approximately 60
104 days in gestation, collected at a local slaughterhouse. Following evisceration, biopsies of
105 the fetal body were taken aseptically and diced into small pieces to be plated in 35-mm
106 cell culture dishes containing culture medium, composed of Dulbecco's Modified Eagle
107 Medium (DMEM) medium supplemented with 44 mM NaHCO₃, 3.99 mM L-glutamine,
108 1% penicillin/streptomycin and 10% inactivated equine serum (ES). Cell cultures were
109 established, expanded and maintained at 37°C, 5% CO₂ and saturated humidity.

110 Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) cells (CCL-22; ATCC, USA) and CRIB
111 cells (CVCL_DD19) were kindly provided by Dr. Claudio Canal, from the Veterinary
112 Virology Laboratory, and Dr. Paulo Roehle, from the Virology Laboratory, respectively,
113 at the Federal University of Rio Grande do Sul. Cells were cultured as described above.

114 2.2 RNA isolation, RT-PCR and PCR analyses

115 Total RNA from each cell type was extracted with TRIzol IS reagent (Life
116 Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instruction. Then,
117 total RNA was reverse transcribed with the SuperScript® III Reverse Transcriptase Kit
118 (Life Technologies). PCR reactions were performed with the primer sequences listed in
119 Table 1. Reactions were carried out with the platinum PCR supermix (Life Technologies),
120 at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of 94°C for 30 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 60
121 s, and finally at 72°C for 5 min (T1 thermocycler, Biometra, Jena, Germany).

122 2.3 Cloning and sequencing

123 The amplification products were TA-ligated into the pCR4-TOPO vector (Life
124 Technologies) and the resulting constructs were used to transform *Escherichia coli*
125 Top10. Five positive colonies of each sample were chosen to be cultured overnight in LB
126 medium. Plasmid extraction was performed with the kit PureYield™ Plasmid Miniprep
127 System (Promega Corporation, Madison, WI, USA), and the miniprep PCR was
128 performed with the M13 forward and M13 reverse primers to confirm the amplicons.
129 Plasmids were sequenced on both strands using the M13 forward and M13 reverse
130 primers. Sequencing was performed in the ACTGene Laboratory (Biotechnology Center,
131 UFRGS, Porto Alegre, RS).

132 2.4 Gene edition of the CD46 receptor

133 The CRISPR/Cas9 system was used as a gene-editing tool to make the genomic
134 edition into the CCP1 in the CD46 receptor, to generate the precise deletion of the area
135 that codes for the peptides 66EQIV69 and 82 GQVLAL87 and produce MDBK cell lines
136 with the knockout of the attachment platform, for use in the infectivity assay with BVDV.

137 2.4.1 Gene edition

138 Four potential guide RNA sequences (gRNA 1A, gRNA 1B, gRNA 2A, gRNA
139 2B) were selected to flank the target fragment of nucleotides in the exon 1, a target area
140 coding for the oligopeptides that conforms the attachment platform, with two gRNA
141 located upstream and two downstream the target sequence (Table 2). Oligomers were
142 hybridized and ligated into the bbs1 site in the plasmid px458, which carry the Cas9 and
143 green fluorescent protein (GFP) genes. Cutting efficiency of each guide was assessed by
144 transfection of the plasmids into MDBK cells using a Neon transfection system (Life
145 Technologies) set a 1300 mV with 1 pulse of 20 ms. Then, 48 h post-transfection, GFP
146 positive cells were collected using fluorescence activated cell sorting (FACS), which
147 were individually cultured into 96 well plates for generation of sub-clone populations of
148 cells and subsequent genomic DNA extraction. PCR analysis across the target sites was
149 done with the primers 5'-TGT ATT CAC CTC TTA CCA CAG CA-3' (forward) and 5'-
150 GGC AAC CAA TCG TGA CGA AA-3' (reverse) using platinum PCR supermix (Life
151 Technologies), to produce a product of 862 pb.

152 Co-transfection of MDBK cells with a pair of plasmids encoding guides flanking
153 exon 1 were carried out as described above. In this instance, a smaller PCR product was
154 observed indicating the deletion of the target fragment on the exon 1. Based on single
155 cutting efficiencies, guide RNAs A1, A2 and B2, located upstream and downstream of
156 target fragment in the exon 1, were selected.

157 2.4.2 Genotyping

158 Genomic DNA was extracted from the edited cells using the proteinase K
159 protocol. The region spanning intron 1 to intron 2 was amplified as described above. PCR
160 products were analyzed by separation on a 1.5% agarose gel and subsequent cloning and
161 sequencing, as previously described.

162 2.5 Bioinformatics

163 Sequences of the CD46 receptor were edited and aligned using Geneious 11.1.5
164 (<https://www.geneious.com>) [22] and compared by BLAST
165 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) [23]. Translation of nucleotide into amino acid
166 sequence alignments was performed using ExpASy-translate tool, and alignments of
167 protein sequences with MUSCLE software (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>)
168 [24].

169 3. Results

170 3.1 Identification of CD46 splice variants and CCP1 characterization

171 The RNA of the three types of cells, CRIB, MDBK and bovine fibroblast cells,
172 was extracted, reverse transcribed and then PCR was performed. The products were
173 cloned, and three to five cloned cDNA were sequenced. The analysis of the PCR products
174 and confirmation by cloning and sequencing determined four CD46 splicing variants. The
175 splicing variant AEB53068.1 was identified in the CRIB cells. The sequencing of the
176 MDBK cells yielded two alternative transcripts which were identified as the splicing
177 variants NP_001229491 and XP_005217376, with the last one presenting the non-
178 synonymous substitution V79I located in exon 1. Finally, the fibroblast cell transcripts
179 revealed the variant AIC33505. Also, the sequencing procedures of the cells also revealed

180 a series of non-synonymous allelic modifications L30P, N124S, T197A, Q228K, H244Y,
181 Y272Q, T297P, R340G, none in the coding region of the attachment area.

182 The sequence obtained out of the exon 1 allowed us to study the CCP1, with the
183 amino acid sequences represented in Table 3. The analysis revealed that all cells, CRIB
184 included, conserved the region of the attachment platform that result in the translation of
185 the oligopeptides 66EQIV69 and 82GQVLAL87. Also, we determined the CCP1 allelic
186 variants according to the nonsynonymous nucleotide substitutions that yielded in the
187 combinations of amino acids present in the positions 69, 70, 73, 74, 79 and 88. All clones
188 out of CRIB and one of the MDBK cells showed a β haplotype determined by
189 combinations of the amino acids 69V 70Y 73R 74L 79I 88V, with a homozygous
190 chromatogram. On the other hand, the samples of the fibroblast cells displayed an α
191 haplotype (69V 70Y 73H 74L 79V 88V). Additionally, another one of the clones of the
192 MDBK cells showed a δ haplotype (69V 70Y 73H 74L 79I 88V).

193 *3.2 Generation of edited cell lines with the deletion of the CD46 attachment platform* 194 *area*

195 The CD46 is encoded by 14 exons with exons 1 to 5 predicted to encode de CCP
196 domains of the protein. Specifically, within the CCP1 are located the sequences of
197 nucleotides that code for the two peptides that form the attachment protein to the BVDV.
198 Then, we developed an editing strategy to excise that area of exon 1 using the
199 CRISPR/Cas9 genome editing system. A combination of two gRNAs was used to flank
200 the attachment platform and to allow the appropriate splicing of the remaining exons.
201 Two candidate gRNA sequences were selected in the immediate upstream area of the
202 attachment platform, and two in the downstream area (Fig. 1).

203 All four gRNA were assessed for cutting efficiency by transfection of MDBK cells
204 with the plasmid px458 encoding the complete gRNA. Transfected cells were isolated by
205 FACS for GFP fluorescence and cutting efficiency at the target site was assessed using a
206 T7 assay. The gRNA 2B showed better results than gRNA 1B in the T7 endonuclease
207 assay, while the gRNA 1A and 1B were similar in their efficiency. For this reason, we
208 decided to perform the double transfection assay with the combinations 1A-2B, and 1B-
209 2B. Following double transfection assay and subsequent PCR analysis, only the
210 combination of guides 1A and 2B generated the desired deletion in the exon 1.

211 Editing efficiency was evaluated in 24 subclone populations of MDBK edited
212 cells by DNA extraction and PCR amplification across the exon 1. The analysis revealed
213 that none of the 12 clones of the combination of gRNA 1B and 2B contained the deletion
214 intended, and three out of the 12 clones of the combination of gRNA 1A and 2B presented
215 the desired deletion. The sanger sequencing of the PCR product confirmed the deletion
216 of the attachment platform area in the three clone populations of edited cells (Fig. 2).

217 Sequencing of the edited clone cell H showed the deletion intended (-106 bp) with
218 the subsequent re-ligation at the cutting sites of gRNA 1A and 2B, plus the insertion of 1
219 nucleotide at the target site, in both alleles (homozygous, both alleles edited). In the edited
220 clone cell C, a different edition in each allele (biallelic) was identified, with the allele 1
221 having the intended deletion (-106 bp), with the subsequent re-ligation at the cutting sites
222 of gRNA 1A and 2B, with the insertion of 1 nucleotide at the target site; in the other
223 allele, allele 2, a clean cut was observed at the cutting site of the gRNA 1A, in addition
224 to the intended deletion (-106 bp), and the deletion of 12 bp of the exon 1, downstream
225 the cutting site of the gRNA 1B, with a 118 bp deletion in total. The sequencing of the
226 edited clone cell D also revealed a biallelic edition, with the intended deletion (-106 bp)
227 in allele 1, with the subsequent re-ligation at the cutting sites of gRNA 1A and 2B, but

228 with the insertion of 1 nucleotide at the target site. Nevertheless, in the other allele, the
229 attachment platform area was not excised, with the sequencing showing a clean cut at the
230 cutting site of the gRNA 1A, with the deletion of 3 bp downstream and the insertion of 1
231 nucleotide at the cutting site of the gRNA 2B. The cell genotypes are described in Fig. 2.

232 **4. Discussion**

233 The CD46 is recognized as pathogen *magnet* as multiple pathogens interact with
234 different regions of the protein to establish a port of entry into cells. For example, Measles
235 virus and adenoviruses join CCP1 and CCP2; human herpesvirus 6 join CCP2 and CCP3;
236 *Streptococcus pyogenes* interacts with CPP1 and CCP2; and *Neisseria meningitidis* and
237 *Neisseria gonorrhoeae* interacts with CCP3 and the STP region [16]. Similarly, BVDV
238 uses the CCP1 domain as an attachment platform, specifically using the oligopeptides
239 66EQIV69 and 82 GQVLAL87, located in antiparallel beta sheets in the CCP1 domain
240 [12].

241 Porcine cells are approximately 500 times less susceptible to BVDV than bovine
242 cells and that the porcine CD46 is not involved in the process of virus entry into porcine
243 cells [9]. Interestingly, the characterization and analysis of chimeric CD46 molecules
244 performed by Krey *et al* [12], showing that modifications of CCP1 in CD46 altered the
245 susceptibility of cells to BVDV, also demonstrating the importance of the two
246 oligopeptides as a crucial part of a binding platform that interacts with BVDV virions. In
247 this study, we aimed to characterize the CD46 receptor in bovine cultured cells that are
248 susceptible (MDBK and fibroblast cells) or resistant (CRIB cells) to BVDV,
249 hypothesizing that CRIB cell BVDV-resistance are due to mutations in the CD46, having
250 genotypic changes that lead to BVDV resistance.

251 *4.1 CD46 characterization in CRIB cells*

252 Contrary to our inference, sequencing of the CD46 receptor in CRIB cells
253 rendered identical genotypes as for bovine MDBK and fibroblast cells, with no mutations,
254 no alterations in the chain of amino acids or modification in the peptide sequences
255 66EQIV69 and 82GQVLAL87 that conforms the attachment platform for BVDV. CRIB
256 cell sequencing also revealed an alternative splicing variant that corresponds to the
257 already identified complement regulatory protein variant 3 (AEB53068.1). Previous
258 studies by Zezafoun *et al.* [17] demonstrated ten distinct allelic versions of the CCP1
259 module, of which some displayed significantly lower binding to BVDV. Additionally,
260 Zezafoun *et al.* [17] disclosed the complex mRNA splicing pattern in the CD46 bovine,
261 which results in multiple isoforms, with three different STP segments and five different
262 cytoplasmic tails. In our results, the CRIB cells exhibited a β allelic version of the CPP1.
263 In experiments by Zezafoun *et al.* [17] to determine the effect of the CCP1 allelic
264 variation on cell permissivity towards BVDV, the β variant did not show a difference in
265 the BVDV permissivity to infection compared to the α variant, which was used as control
266 for a settled permissivity of 100%. The α variant, observed in fibroblast cells, is the most
267 frequent version of the CCP1 module and is the variant present in the CD46 initially
268 sequenced from bovine ganglion cDNA (Genbank number NP_898903) [9]. The
269 alternative splicing generates five different types of cytoplasmic tails according to the
270 usage of alternative 3' exon splice sites of exons 11 and 12. These cytoplasmic domains
271 differentially control cell permissivity towards BVDV, likely because there is an
272 interaction between BVDV and CD46 that might indeed trigger outside-in signaling [17].
273 The type of CT exhibited by CRIB cells was type 3
274 (CCFCRQRKKGKAEC SATYTTYQDKATTATEQMN), with such type demonstrated
275 to have a similar permissivity to BVDV infection than the type 2 [17], established as

276 100%. Consequently, such genotype variations cannot be related with the resistance of
277 the CRIB cells to BVDV infection.

278 The CRIB lineage was obtained by cloning and selection of MDBK cells that
279 survived infection with a cytopathic strain of BVDV [20]. Previously, it was
280 demonstrated that CRIB cells are bovine cells by karyotype and isoenzyme analyses,
281 additionally with a chromosomal distribution alike bovine cells and almost identical to
282 MDBK cells [20]. In former studies, Flores *et al.* [21] confirmed that the BVDV virions
283 can attach but cannot penetrate into CRIB cells. The authors also showed that BVDV
284 binding was reduced in CRIB cells compared to MDBK cells. Complementary, Krey *et*
285 *al.* [25] showed that the CD46 receptor is present in the cell surface of CRIB cells, using
286 monoclonal antibodies anti-CD46 BVD/CA 17, 26, and 27 [26]. Also, Flores *et al.* [21]
287 showed that the resistance of the CRIB cells is pestivirus specific. Nevertheless, Flores
288 and Donis [20] showed that BVDV replication after overcoming the initial blockage, by
289 transfection of the virus genomic RNA by electroporation, was equally efficient and
290 produced similar amounts of progeny virus. Moreover, the authors demonstrated that the
291 course of infection, cytopathology and yield of infectious progeny of others bovine virus,
292 including the bovine herpes virus types 1, 2 and 4, bovine respiratory syncytial virus,
293 bovine adenovirus, bovine enteric virus, vesicular stomatitis virus, bovine parainfluenza
294 3, and bovine leukemia virus was similar between CRIB and MBDK cells [20].

295 Taken together, the resistance of the CRIB cells to BVDV is unlikely to be a
296 defect in the metabolic pathway required for viral replication [20, 21], and results from
297 this study refute the possibility of the existence of mutations in the attachment platform
298 and/or the CD46, the main receptor for BVDV. Thus, the mechanism of resistance to
299 pestiviruses still needs to be unraveled. Thus, the hypothesis of a cell event or more after
300 the attachment of the virus as the cause of resistance to BVDV in CRIB cells is viable,

301 but not absolute, as CRIB cells could have some important modifications involving viral
302 coreceptors, not necessarily directly related to the CD46 receptor.

303 The process of infection and replication of the viral genome into cells begins after
304 the viral particles interact with the CD46 receptor, mediated by proteins E1 and E2. After
305 binding, the virus enters by clathrin-mediated endocytosis [27, 28]. The fusion of the virus
306 and cell membranes is mediated by a pH drop in the endosomal vesicle. Then, the
307 genomic RNA is released into the cytoplasm of the infected cell [29, 30, 31]. Even though
308 the CD46 is the main BVDV receptor identified thus far, several studies suggest that one
309 or more unidentified coreceptors are required for efficient cell entry, acting downstream
310 the CD46 to mediate subsequent internalization after primary binding [9, 12, 32].

311 Previously, a direct link between the expression of bovine CD46 and susceptibility
312 to BVDV was demonstrated in porcine cells [9]. However, the overexpression in
313 nonsusceptible human and murine cells increased the attachment without a productive
314 infection, although BVDV RNA replication is supported by such cells. Such findings
315 suggested that the pathway of entry may be blocked between virus binding and replication
316 [9, 12]. Besides, pieces of evidence indicate that CD46 does not undergo endocytosis
317 [33], reinforcing the concept that the BVDV interacts with one or more post-attachments
318 coreceptors, minimizing the distance between the bound virion and the plasma
319 membrane, thus initiating the process of endocytosis [9, 29]. Interestingly, whereas the
320 CD46 is the dominant receptor for most BVDV strains, the BVDV-1 strain 519 entry is
321 CD46-independent, with the presence of CD46 antibodies only reducing the infection by
322 20% [9]. In addition, the MDBK cells showed a residual susceptibility (1%) to BVDV
323 type strain NADL in presence of high quantities of CD46 antibodies, whereas porcine
324 cells presented a basal susceptibility to BVDV NADL [9]. Then, it is likely that
325 alternative receptors or coreceptors are involved in the BVDV entry process.

326 Recent pieces of evidence disclosed that BVDV uses direct cell-to-cell
327 transmission as the main mode of infection propagation, a process not requiring CD46.
328 In previous studies, a mechanism for BVDV cell-to-cell transmission was proposed,
329 involving the efflux of assembled viral particles in exocytic vesicles, with accumulation
330 in the extracellular space at sites of cell-cell contact. Then, the viral glycoprotein E2 of
331 extracellular viruses attached to the plasma membrane interact with a cellular coreceptor
332 on the target cell that mediates internalization of spreading virions by clathrin-dependent
333 endocytosis [32, 34]. Among possible molecule candidates involved in the previous
334 mechanism are heparan sulfate and cell surface glycosaminoglycans. Heparan sulfate and
335 other glycosaminoglycans have been shown to bind a cluster of basic amino acids within
336 the C-terminal domain of the glycoprotein Erns of the BVDV strain PE515 [30, 35, 36,].
337 Also, the BVDV-1 strain 519 seemed to interact with high sulfated glycosaminoglycans
338 [12]. In the past, the low-density lipoprotein receptor (LDL-R) was proposed as a possible
339 BVDV receptor [37], but the evidence in the experiments by Krey *et al.* [25] showed that
340 CRIB and MDBK cells expressed LDL-R, and, as anti- low-density lipoprotein antibodies
341 did not inhibit the process of BVDV infection, it was determined that such receptor is not
342 involved in BVDV invasion into cells.

343 *4.2 The genomic edition of the CD46 receptor*

344 The CRISPR/Cas9 system functions as an adaptive immune system in bacteria
345 and is currently used as a gene-editing tool for efficient genome manipulations [38]. The
346 CRISPR/Cas9 system uses a single guide RNA that targets the genomic sequence and
347 directs the Cas 9 nuclease to generate double-strand breaks (DSB) in the matching target
348 DNA sequence. After the endonuclease activity of Cas9 enzymes creates DNA DSBs,
349 such breaks are recognized and repaired by cellular DNA repair machinery [39, 40]. The
350 CRISPR/Cas9 system has been widely used in research and has several applications, such

351 as the generation animals as disease models, production of synthetic tissues, immune-
352 compatible donor organisms for xenotransplantation, correction of genetic diseases, gene
353 and antiviral therapies, among others [41]. The CRISPR/Cas9 technology has been used
354 to generate cells and animal lines with specific gene function being disrupted or knockout
355 [42, 43, 44, 45]. In this study, we described the use of the CRISPR/Cas9 system to
356 successfully generate genome edited bovine cell lines without the attachment platform to
357 BVDV in the CD46, considered the main receptor involved in BVDV infection. The
358 application of such genome editing tool allowed us to gene edit the CCP1 in the bovine
359 CD46 receptor, to generate precise deletions in the area that codes for the peptides
360 66EQIV69 and 82GQVLAL87, finally producing bovine cell lines with the knockout of
361 the attachment platform that likely will provide resistance to BVDV infection.

362 The CRISPR/Cas9 technology can be used to delete whole genomic regions or
363 single exons of a target gene, resulting in gene disruption [43, 46, 47]. In the deletions,
364 two Cas9/gRNAs targeting the desired gene would generate two points of DSB in the
365 gene, and then the DNA ends will be repaired by non-homologous end-joining (NHEJ),
366 resulting in deletion of the DNA target sequence that was flanked by the breakpoints [48].
367 The genomic edition of a gene in cells may have four potential outcomes: no mutation, a
368 heterozygous mutation (only one allele is mutated), a biallelic mutation (both alleles are
369 mutated but the sequence of each allele is distinct) or a homozygous mutation (both alleles
370 carry the same mutation) [49]. In our case, the analyzed clones had different genome
371 editing patterns, even within each subclone population, with Clone H having a
372 homozygous mutation, and clones C and D having a biallelic mutations. Among the
373 editions, we observed three distinct mutation patterns: in all clones, 1 bp (Adenine) was
374 added just prior to the cutting site of the gRNA 2B. Also, one of the alleles of clone C
375 had an additional deletion of 12 bp (GGAGGGCTGTAA), and clone D had and deletion

376 of 3 bp (CTG) just after the cutting site of the gRNA 1A in one allele. Such mutation
377 patterns can be explained by the mechanisms of repair for DSBs. There are three major
378 repair pathways for DSBs known as canonical NHEJ, alternative NHEJ, and homologous
379 recombination. The NHEJ pathways are active throughout the cell cycle and are therefore
380 the most common mechanism for DSB repair [50]. During NHEJ, DNA ends are re-
381 ligated by Ligase-4. However, prior to ligation, exonucleases and polymerases can
382 remove or add a small number of bases, creating insertion/deletion (indel) mutations in
383 the genome sequence [51]. The indels in the genome sequence can cause a frameshift
384 mutation, and they can knockout the function of the gene due to the production of
385 truncated polypeptides and/or nonsense-mediated mRNA decay [49]. In Table 4, the most
386 predominant peptide sequences generated by the edited clones are depicted. The deletion
387 of the target area and in the insertion of 1 bp is predicted not to cause a change in the final
388 amino acid sequence translated from the other exons of the CD46 gene. Nevertheless, the
389 polypeptide products generated by allele 2 in clone C and by allele 2 in clone D are
390 predicted to truncated. In the case of clone D, the final transcription of the exon 1 is to
391 generate a stop codon at the end of the CCP1. On the other hand, the transcription and
392 translation of exon 1 and exon 2 will likely generate a stop codon at the beginning of exon
393 2. Future studies would be useful to evaluate the alternative splicing in the mutant clones
394 produced in this study, also quantifying and characterizing the CD46 gene expression and
395 CD46 protein expression.

396 In summary, we used the CRISPR/Cas 9 system as a practical and effective edition
397 genome tool to establish edited bovine cell lines with the deletion of the attachment
398 platform to BVDV infection. The upcoming experiments will be focused on determining
399 the degree of resistance that such edited cells lines to BVDV infection. Eventually, if the
400 susceptibility experiments show a high grade of BVDV resistance, this approach can be

401 used to generate live animals with the intended deletions and resistance to BVDV. For
402 that, gene edition could be attained after CRISPR/Cas9 microinjection of zygotes or after
403 editing fibroblast cells for further use as donor cells to generate cloned animals by somatic
404 cell nuclear transfer procedures [52].

405 In the foreseeable future, edited cells lines will be relevant as a tool for *in vitro*
406 studies of BVDV infection, focusing on mechanisms and pathways involved in BVDV
407 binding and internalization into cells. In addition, such cells could be used to evaluate and
408 elucidate the role of the alternative cellular receptors or the existence of coreceptors
409 associated with BVDV attachment and internalization into cells. Alternatively, as such
410 edited cells lines retain the expression of mutant forms of the CD46 protein, the model
411 can be used to evaluate other biological functions of the bovine CD46 receptor.

412 **Acknowledgements**

413 The authors thank the FrigoLeo Ltda. (São Leopoldo, RS, Brazil) for supplying
414 the bovine fetus. The authors also thank Dr. L. Relly for technical assistance in the study.

415 **Conflict of interest**

416 The authors declare no conflict of interest at all.

417

418 **References**

- 419 [1] Ridpath J. Bovine Viral Diarrhea Virus: Global Status. *Vet Clin Food Anim* 2010;
420 26:105–121.
- 421 [2] Richter V, Lebl K, Burgstaller J, Obritzhauser W, Käsbohrer A, Pinior B. A systematic
422 worldwide review of the direct monetary losses in cattle due to bovine viral diarrhoea
423 virus infection. *Vet J.* 2017, 220:80–87.
- 424 [3] Walz PH, Grooms DL, Passler T, Ridpath JF, Tremblay R, Step DL, Callan RJ, Givens
425 MD. control of bovine viral diarrhoea virus in ruminants. *J Vet Intern Med.* 2010, 24: 476–
426 486.
- 427 [4] Houe H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus
428 diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet Microbiol.* 1999, 64: 89–107.
- 429 [5] Baker JC. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *Vet Clin*
430 *North Am Food Anim Pract.*, 1995, 11: 425–445.
- 431 [6] Smith DB, Meyers G, Bukh J, Gould EA, Monath T, Scott Muerhoff A, Pletnev A,
432 Rico-hesse R, Stapleton JT, Simmonds P, Becher P. Proposed revision to the taxonomy
433 of the genus pestivirus, family flaviviridae. *J Gen Virol* 2017, 98:2106.
- 434 [7] Rügenapf T, Unger G, Strauss JH, Thiel HJ. Processing of the envelope
435 glycoproteins of pestiviruses. *J Virol.* 1993; 3288-3294.
- 436 [8] Ronecker S, Zimmer G, Herrler G, Greisser-Wilke I, Grummer B. Formation of
437 bovine viral diarrhoea virus E1-E2 heterodimers is essential for virus entry and depends
438 on charged residues in the transmembrane domains. *J Gen Virol* 2008; 89: 2114-2121.
- 439 [9] Maurer K, Krey T, Moenning V, Thiel HJ, Rumenapf T. CD46 is a cellular receptor
440 for bovine viral diarrhoea virus. *J Virol* 2004; 78: 1792–1799.

- 441 [10] Neill JD. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus. *Biologicals* 2013; 41: 2-
442 7.
- 443 [11] Riley-Vargas RC, Gill DB, Kemper C, Liszewski MK, Atkinson JP. CD46:
444 expanding beyond complement regulation. *Trends Immunol* 2004; 25: 9.
- 445 [12] Krey T, Himmelreich A, Heimann M, Menge C, Thiel HJ, Maurer K, et al. Function
446 of bovine CD46 as a cellular receptor for bovine viral diarrhoea virus is determined by
447 complement control protein. *J Virol* 2006; 80: 3912-3922.
- 448 [13] Liszewski MK, Kemper C, Price JD, Atkinson JP. CD46 processing: a means of
449 expression. *Immunobiology* 2005; 217: 169– 175.
- 450 [14] Choileain S, Astier A. CD46 processing: a means of expression. *Immunobiology*
451 2012; 217: 169– 175.
- 452 [15] Yamamoto H, Fara AF, Dasgupta P, Kemper C. CD46: the multitasker of
453 complement proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 2013; 45: 2808-2820.
- 454 [16] Cattaneo R. Four viruses, two bacteria, and one receptor: membrane cofactor protein
455 (CD46) as pathogens' magnet. *J Virol* 2004; 78: 4385–4388.
- 456 [17] Zezafoun H, Decreux A, Desmecht D. Genetic and splice variations of *Bos taurus*
457 CD46 shift cell permissivity to BVDV the bovine pestivirus. *Vet Microbiol.* 2011; 152:
458 315–327.
- 459 [18] Polak MP, Rola J, Zmudziński JF. Contamination of foetal bovine serum with bovine
460 viral diarrhoea virus (bvdv). *Bull Vet Inst Pulawy* 2008, 52: 501-505.
- 461 [19] Uryvaev LV, Dedova AV, Dedova LV, Ionova KS, Parasjuk NA, Selivanova TK,
462 Bunkova NI, Gushina EA, Grebennikova TV, Podchernjaeva RJ. Contamination of cell
463 cultures with bovine viral diarrhoea virus (bvdv). *Bull Exp Biol Med* 2012, 153: 88-93.

- 464 [20] Flores E, Donis R. Isolation of a mutant MDBK cell line resistant to Bovine Viral
465 Diarrhea Virus Infection Due to a block in viral entry. *Virology* 1995; 208: 565-575.
- 466 [21] Flores E, Kreutz L, Donis R. Swine and ruminant pestiviruses require the same
467 cellular factor to enter the bovine cells. *J Gen Virol* 1996; 77: 1295-1303.
- 468 [22] Kears M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, *et al.*
469 Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the
470 organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 2012; 28(12): 1647-1649.
- 471 [23] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers W, Lipman DJ. Basic local alignment search
472 tool. *J. Mol. Biol* 1990; 215: 403–410.
- 473 [24] Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high
474 throughput. *Nucleic Acids Res* 2004; 32(5): 1792-97.
- 475 [25] Krey T, Moussay E, Thiel HJ, Rumenapf T. Role of the low-density lipoprotein
476 receptor in entry of bovine Viral diarrhea virus. *J Virol* 2006, 80: 10862-10867.
- 477 [26] Schelp C, Greiser-Wilke I, Wolf G, Beer M, Moennig V, Liess B. Identification of
478 cell membrane proteins linked to susceptibility to bovine viral diarrhoea virus infection.
479 *Arch Virol* 1995, 140:1997–2009.
- 480 [27] Lecot S, Belouzard S, Dubuisson J, Rouille Y. Bovine viral diarrhea virus entry is
481 dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 2005, 79:10826–10829.
- 482 [28] Grummer B, Grotha S, Greiser-wilke I. Bovine viral diarrhoea virus is internalized by
483 clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *J Vet M B Infect Dis Vet Public*
484 *Health* 2004, 51: 427-432.
- 485 [29] Krey T, Thiel HJ, Rumenapf T. Acid-resistant bovine pestivirus requires activation
486 for pH-triggered fusion during entry. *J Virol* 2005, 79: 4191–4200.

- 487 [30] Wang FI, Deng MC, Huang YL, Chang CY. Structures and Functions of Pestivirus
488 Glycoproteins: Not Simply Surface Matters. *Viruses* 2015, 7: 3506-3529.
- 489 [31] Li Y, Modis Y. A novel membrane fusion protein family in Flaviviridae? *Trends*
490 *Microbiol* 2014, 22:176 –182.
- 491 [32] Merwaiss F, Czibener C, Alvarez DE. Cell-to-cell transmission is the main
492 mechanism supporting bovine viral diarrhoea virus spread in cell culture. *J Virol* 2019, 93:
493 e01776-18.
- 494 [33] Maisner A, Zimmer G, Liszewski MK, Lublin DM, Atkinson JP, Herrler G.
495 Membrane cofactor protein (CD46) is a basolateral protein that is not endocytosed.
496 Importance of the tetrapeptide FTSL at the carboxyl terminus. *J Biol Chem* 1997,
497 272:20793–20799.
- 498 [34] Schmeiser S, Mast J, Thiel HJ, Konig M. Morphogenesis of pestiviruses: new
499 insights from ultrastructural studies of strain Giraffe-1. *J Virol* 2014, 88:2717–2724.
- 500 [35] Iqbal M, Flick-Smith H, and McCauley JW. Interactions of bovine viral diarrhoea
501 virus glycoprotein Erns with cell surface glycosaminoglycans. *J Gen Virol* 2000, 81:451–
502 459.
- 503 [36] Iqbal M and McCauley JW. Identification of the glycosaminoglycan-binding site on
504 the glycoprotein Erns of bovine viral diarrhoea virus by site-directed mutagenesis. *J Gen*
505 *Virol* 2002, 83:2153–2159.
- 506 [37] Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other
507 Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci*
508 *USA* 199, 96:12766–12771.

- 509 [38] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero
510 DA, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes.
511 Science. 2007, 315:1709-1712.
- 512 [39] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna J, Charpentier E. A
513 Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity.
514 Science 2012, 337 816-821.
- 515 [40] Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W,
516 Marraffini L, Zhanf F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems.
517 Science 2013, 339:819–823.
- 518 [41] Barrangou R. and Doudna J. Applications of CRIRISPR technologies in research
519 and beyond. Nat biotechnol 2016, 34 9 933-941.
- 520 [42] Huang P, Tong D, Sun J, Li Q, Zhang F. Generation and characterization of a human
521 oral squamous carcinoma cell line SCC-9 with CRISPR/Cas9-mediated deletion of the
522 p75 neurotrophin receptor. Arch Oral Biol 2017, 82 223–232.
- 523 [43] Burkard C, Lilloco S, Reid E, Jackson B, Mileham A, Ait-ali T, Whitelaw C,
524 Archibald A. 'Precision engineering for PRRSV resistance in pigs: Macrophages from
525 genome edited pigs lacking CD163 SRCR5 domain are fully resistant to both PRRSV
526 genotypes while maintaining biological function'. PLoS Pathogens 2017, 13 (2)
527 e1006206.
- 528 [44] Humbert O, Laszlo GS, Sichel S, Ironside C, Haworth KG, Bates OM, Beddoe ME,
529 Carrillo RR, Kiem HP, Walter RB. Engineering resistance to CD33-targeted
530 immunotherapy in normal hematopoiesis by CRISPR/Cas9-deletion of CD33 exon 2.
531 Leukemia, Epub ahead of print, Oct 5, 2018.

- 532 [45] Hsu P, Lander E, Zhang F. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for
533 Genome Engineering. *Cell* 2014, 157: 1262-1278.
- 534 [46] Togashi Y, Mizuuchi H, Tomida S, Terashima M, Hayashi H, Nishio K, Mitsudomi
535 T. MET gene exon 14 deletion created using the CRISPR/Cas9 system enhances cellular
536 growth and sensitivity to a MET inhibitor. *Lung Cancer* 2015, 90(3):590-597.
- 537 [47] Li C, Fu Z, Yang Y, Yan J, Liu F, Zhao W, Zhang L, Wei L, Feng Z, Li D, Jiang L-
538 Hua. CRISPR/Cas9-mediated editing of GABRR2 gene in RGC-5 cells induces random
539 exon deletion, exon splicing and new exon recruitment. *Biochem Eng J* 2018, 139: 43-
540 50.
- 541 [48] Symington LS, Gautier J. Double-strand break end resection and repair pathway
542 choice. *Annu Rev Genet.* 2011, 45:247-71.
- 543 [49] Zischewski J, Fischer R, Bortesi L. Detection of on-target and off-target mutations
544 generated by CRISPR/Cas9 and other sequence-specific nucleases. *Biotechnol Adv.*
545 2017, 35(1):95-104.
- 546 [50] Salsman J, Dellaire G. Precision Genome Editing in the CRISPR Era. *Biochem Cell*
547 *Biol.* 2017, 95(2):187-201.
- 548 [51] Schmid-Burgk JL. Disruptive non-disruptive applications of CRISPR/Cas9. *Curr*
549 *Opin Biotechnol.* 2017, 48: 203-209.
- 550 [52] Tan W, Proudfoot C, Lillico S, Whitelaw C. 'Gene targeting, genome editing: from
551 Dolly to editors'. *Transgenic Res* 2016, 25 (3): 273-287.

552 **Figure legends**

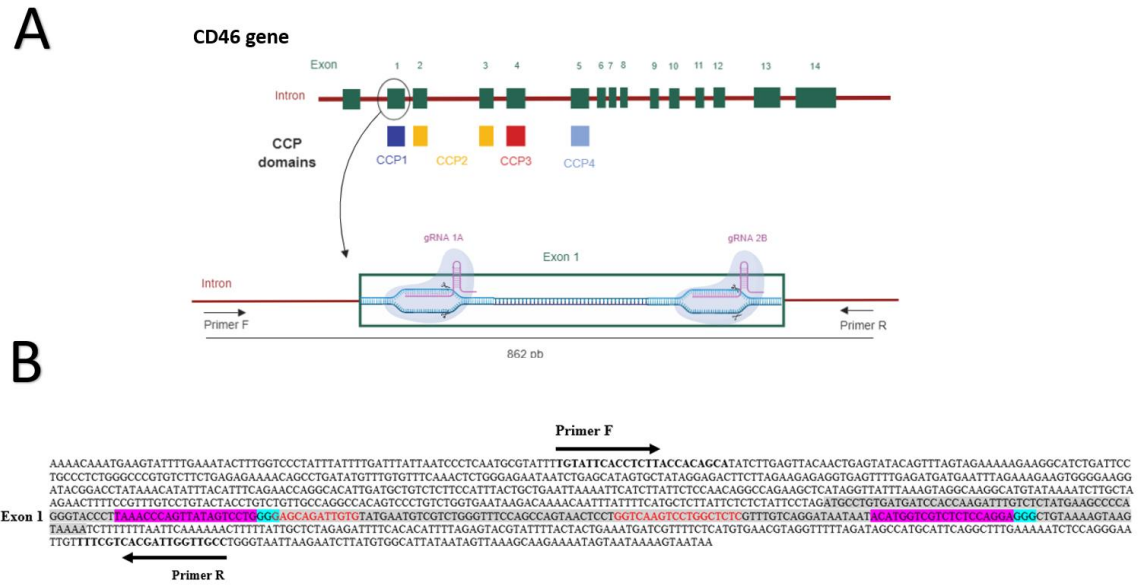
553 **Fig 1.** Generation of the bovine CD46 attachment platform area deletion in the
554 exon 1 using CRISPR/Cas 9. A) Schematic of the CD46 gene in the bovine. In green are
555 indicated the 14 exons that codes the CD46 mRNA and in red the introns. Below, the
556 CCPs domains are represented in distinct colors. The edition of the target area in the Exon
557 1 using the gRNAs 1A and 2B would result in the deletion of the attachment platform
558 from the encoded protein. B) Schematic illustration of the gRNA targeting site in the
559 CD46 gene. The gRNA guiding sequences are labeled in purple. Protospacer adjacent
560 motif (PAM) is marked in blue. Primes for PCR to amplify the genomic sequence are
561 marked by black arrows. Exon 1 is indicated in gray halftones. In red are represented the
562 nucleotides that codes for the peptides that conform the attachment platform for BVDV.

563 **Fig 2.** Validation of CD46 gene editing in subclone populations of MDBK edited
564 cells. A) PCR amplification of gRNAs cotransfection. MDBK cells were cotransfected
565 with the two gRNAs 1A and 2B. After 48 h in culture, cells were isolated by FACS.
566 Efficiency of intended deletion after double transfection was assessed by PCR. B) DNA
567 sequencing of the PCR products confirming the deletion of the attachment platform area
568 in the exon 1 in different clones. C) Description of the genotypes of the three edited cell
569 lines (C, D, H) with the desired deletion. Sequence of the wild type (Genbank number
570 NP_898903) is placed in the first line. Mutant alleles are placed below. The new added
571 nucleotide is highlighted in red.

572

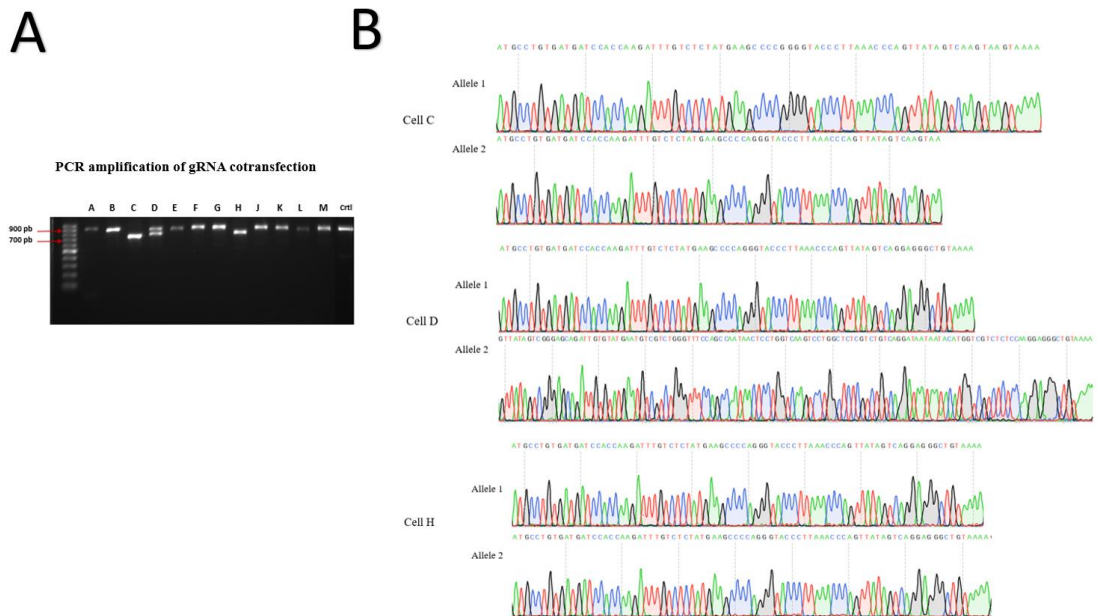
573 **Figures**

574 **Fig 1.** Generation of the bovine CD46 attachment platform area deletion in the exon 1
 575 using CRISPR/Cas 9



576

577 **Fig 2.** Validation of CD46 gene editing in subclone populations of MDBK edited cells



578

C

Clone Cell C Cutting site gRNA 1A Cutting site gRNA 2B

Wt GTTATAGTCCTGGGAGCAGATTGTGTATGAATGTCGTCGGGTTCCAGCCAATAACTCCTGGTCAAGTCCTGGCTCTCGTTTGTTCAGGATAATAATACATGGTCCTCTCCAGGAGGCTGTAAAA

Allele 1 GTTATAGTC-----AGGAGGCTGTAAAA (-106, +1 bp)

Allele 2 GTTATAGTC-----AA (-118 bp)

Clone Cell D

Wt GTTATAGTCCTGGGAGCAGATTGTGTATGAATGTCGTCGGGTTCCAGCCAATAACTCCTGGTCAAGTCCTGGCTCTCGTTTGTTCAGGATAATAATACATGGTCCTCTCCAGGAGGCTGTAAAA

Allele 1 GTTATAGTC-----AGGAGGCTGTAAAA (-106, +1 bp)

Allele 2 GTTATAGTC---GGGAGCAGATTGTGTATGAATGTCGTCGGGTTCCAGCCAATAACTCCTGGTCAAGTCCTGGCTCTCGTTTGTTCAGGATAATAATACATGGTCCTCTCCAAGGAGGCTGTAAAA (-3, +1 bp)

Clone Cell H

Wt GTTATAGTCCTGGGAGCAGATTGTGTATGAATGTCGTCGGGTTCCAGCCAATAACTCCTGGTCAAGTCCTGGCTCTCGTTTGTTCAGGATAATAATACATGGTCCTCTCCAGGAGGCTGTAAAA

Allele 1 GTTATAGTC-----AGGAGGCTGTAAAA (-106, +1 bp)

Allele 2 GTTATAGTC-----AGGAGGCTGTAAAA (-106, +1 bp)

579

580

581 **Tables**

582 **Table 1.** Sequence of PCR primers for CD46 transcripts analyzed in the bovine cultured
583 cells

Target	Primer orientation	Sequence (5'-3')	Product size (bp)	References
Exons 1-14	Forward	TTG GGT GTC CCG CTG GTC TC	1075-1468*	[17]
	Reverse	AGC AAA GTC CCC TCA GGT CT		[17]
Exons 1-4	Forward	CCC CGA AAG ACT GGC TTC TT	607	Present study
	Reverse	CTT GCT CTC TCC AAC AAG GG		Present study
Exons 4-14	Forward	CCC TTG TTG GAG AGA GCA AG	568-962*	Present study
	Reverse	AGC AAA GTC CCC TCA GGT CT		[17]

584 *The range of sizes is due to the fact that the alternative splicing generates different
585 isoforms with different sizes

586

587 **Table 2.** Sequence of guide RNAs (gRNAs) selected to flank the attachment platform
588 area in the exon 1 of the bovine CD46 gene

gRNA	Sequence 5'-3'	Strand	Target location
A1	CAC CGA AAC CCA GTT ATA GTC CTG	sense	upstream
	AAA CCA GGA CTA TAA CTG GGT TTC	antisense	
A2	CAC CGA GGA GAC TTC TTA GAA GAG	sense	upstream
	AAA CCT CTT CTA AGA AGT CTC CTC	antisense	
B1	CAC CGG TCC TGG CTC TCG TTT GTC	sense	downstream
	AAA CGA CAA ACG AGA GCC AGG ACC	antisense	
B2	CAC CGC ATG GTC GTC TCT CCA GGA	sense	downstream
	AAA CTC CTG GAG AGA CGA CCA TGC	antisense	

589

590

591 **Table 3.** Comparison of the CCP1 peptide sequences from the different genotyped
592 bovine cells

Bovine cell type	Peptide sequence (Exon 1)	CCP1 allelic variant
Wild type (WT)*	ACDDPPRFVSMKPQGTLKPSYSPG EQ IVYEC HLGFQPVTP GQVLAL VCQDN NTWSSLQEGCK	α
CRIB	ACDDPPRFVSMKPQGTLKPSYSPG EQ IVYEC RLLGFQPITP GQVLAL VCQDNN TWSSLQEGCK	β
MDBK	ACDDPPRFVSMKPQGTLKPSYSPG EQ IVYEC RLLGFQPITP GQVLAL VCQDNN TWSSLQEGCK	β
MDBK	ACDDPPRFVSMKPQGTLKPSYSPG EQ IVYEC RLLGFQPVTP GQVLAL VCQDN NTWSSLQEGCK	δ
Fibroblast cells	ACDDPPRFVSMKPQGTLKPSYSPG EQ IVYEC HLGFQPVTP GQVLAL VCQDN NTWSSLQEGCK	α

593 *WT is based in the Genbank sequence number NP_898903.

594 In red are represented the peptides of the CD46 attachment platform for the BVDV.

595

596 **Table 4.** Comparison of the peptide sequences from the gene edited cloned MDBK cells

Cell type	Allele	Predicted amino acid sequence
WT*		ACDDPPRFVSMKPQGTLKPSYSPG EQIVYEC HLGFQ P VT P GQVLAL VCQDNNTWSSLQEGCK
Clone C	1	ACDDPPRFVSMKPQGTLKPSYS----- -----QEGCK
	2**	ACDDPPRFVSMKPQGTLKPSYS----- -----QKDGVL P stop
Clone D	1	ACDDPPRFVSMKPQGTLKPSYS----- -----QEGCK
	2	ACDDPPRFVSMKPQGTLKPSYS REQIVYEC HLGFQ P IT P GQVLAL VCQDNNTWSSLQGG L stop
Clone H	1	ACDDPPRFVSMKPQGTLKPSYS----- -----QEGCK
	2	ACDDPPRFVSMKPQGTLKPSYS----- -----QEGCK

597 *WT is based in the Genbank sequence number NP_898903.

598 **In this clone are represented the exon1 and the initial part of the exon 2 to depict the
599 stop codon.

600 In bold are the targeted sequences for deletion (dashed lines), and in red are represented
601 the peptides of the CD46 attachment platform for BVDV.

6. CONCLUSÕES

Este estudo propôs melhor compreender mecanismos de infecção do BVDV em células bovinas, buscando determinar a contribuição do receptor CD46 no processo de infecção e resistência ao BVDV. Baseados nos resultados observados em nossos experimentos, podemos concluir que:

- 1) A genotipagem da sequência genômica codificante para receptor CD46 bovino demonstrou não haver diferenças entre as células MDBK, CRIB e fibroblastos, à parte das diferentes variantes do CD46 encontradas nas células, geradas pelo *splicing* alternativo do gene CD46, as quais já são descritas previamente na literatura e/ou já estão depositadas no Genbank.
- 2) Como o genótipo e a variante do CD46 observados nas células CRIB não se encontram associados a variações na susceptibilidade das células ao BVDV, de acordo com a literatura, a resistência das células CRIB à infecção com o BVDV não está associada diretamente ao receptor CD46. Outros mecanismos associados ao CD46, relacionados com o tipo de cauda citoplasmática e a variante alélica β do CCP1 encontradas nas células CRIB, também não determinam a resistência das células aos BVDV.
- 3) O sistema CRISPR/Cas9 foi uma ferramenta prática e eficaz para gerar edições genômicas em linhagens de células bovinas, com sucesso na modificação (deleção) específica da plataforma de união ao BVDV. No entanto, o grau de suscetibilidade à infecção destas linhagens celulares ao BVDV ainda está em estudo.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O processo de infecção e entrada do BVDV nas células ainda não está totalmente elucidado. Embora o CD46 seja o único e principal receptor identificado, existem evidências que sugerem a existência de um ou mais coreceptores ou receptores alternativos não identificados, que são necessários à entrada do vírus nas células. Este estudo está contribuindo para o entendimento de algumas etapas neste processo, somando evidência sobre a contribuição do receptor CD46 nos mecanismos de infecção e resistência do BVDV nas células bovinas.

Mesmo assim, este trabalho ainda possui etapas a serem desenvolvidas para complementação dos dados apresentados. Esperamos que estes resultados esclareçam os aspectos do grau de suscetibilidade à infecção com BVDV nas linhagens de células MDBK editadas geneticamente. No âmbito dos experimentos a serem realizados para avaliar a resistência viral, serão utilizados os vírus BVDV 1 cepa NADL, BVDV 2 cepa VS253, e *Hobi-like* cepa *Italyc* para realizar testes de infecção nas células. Será realizado o isolamento em cultivo celular, inoculando isolados virais a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0.1, 1, e 10, em triplicata para cada uma das linhagens, e depois o sobrenadante será coletado, aliquoteado e estocado a -80°C para posterior análise. Seguidamente, será realizada a quantificação por diluição limitante das alíquotas dos sobrenadantes e quantificação por RT- qPCR do RNA viral isolado dos sobrenadantes.

Por fim, se a implementação do sistema CRISPR/Cas9 para a obtenção de uma linhagem de células bovinas com a modificação gênica do receptor CD46 gerar um alto grau de resistência à infecção pelo BVDV, estas células poderão ser utilizadas em futuros estudos de função biológica do receptor CD46, e devido à modificação gênica, poderemos aprofundar o conhecimento dos mecanismos do processo de invasão dos pestivirus e as diferentes vias envolvidas na sua ligação e internalização na célula, permitindo obter mais informações sobre possíveis coreceptores ou receptores alternativos do BVDV.

Finalmente, em estudos posteriores, esta abordagem poderá ser utilizada para gerar animais com a deleção pretendida e possivelmente resistentes ao BVDV, sendo este um mecanismo alternativo moderno para o controle e erradicação de doenças de alto impacto econômico na produção pecuária. Para alcançar este objetivo, de desenvolver um bovino geneticamente modificado resistente ao BVDV, pelo menos duas abordagens

poderão ser utilizadas: realização de edição gênica após a microinjeção citoplasmática de CRISPR/Cas9 em zigotos, ou pela edição em fibroblastos bovinos em cultivo para estabelecer células com modificações genéticas bialélicas, resistentes ao BVDV, para a geração de animais fundadores pela clonagem por TNCS.

8. REFERÊNCIAS

- AGNELLO, V *et al.* Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.96, p.12766–12771, 1999.
- ALTSCHUL, S.F *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, p.403–410, 1990.
- ALZAMEL, N *et al.* Soluble forms of CD46 are detected in Bos taurus plasma and neutralize BVDV, the bovine pestivirus. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 49, p. 39–46, 2016.
- ANTALÍKOVÁ, J *et al.* Identification of MCP/CD46 analogue on bovine erythrocytes using the new monoclonal antibody IVA-520. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.115, p. 155–159, 2007.
- ARENHART, S *et al.* Excreção e transmissão do vírus da diarreia viral bovina por bezerros persistentemente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 9, p.736-742, 2009.
- BAKER, J.C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea virus infection. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 11, p.425-445, 1995.
- BALINT, A *et al.* Viral sequence insertions and a novel cellular insertion in the NS2 gene of cytopathic isolates of bovine viral diarrhea virus as potential cytopathogenicity markers. **Virus Genes**, v. 30, p.49–58, 2005.
- BURKARD, C *et al.* Precision engineering for PRRSV resistance in pigs: Macrophages from genome edited pigs lacking CD163 SRCR5 domain are fully resistant to both PRRSV genotypes while maintaining biological function. **PLoS Pathogens**, v.13, p.2, e1006206, 2017.
- BARRANGOU, R.; DOUDNA, J. Applications of CRISPR technologies in research and beyond. **Nature Biotechnology**, v.34, n.9, p.933-941, 2016.
- BARRANGOU, R *et al.* CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. **Science**, v.315, p.1709-1712, 2007.
- CARDONE, J. LE FRIEC G. AND KEMPER C. CD46 in innate and adaptive immunity: an update. **Clinical and Experimental Immunology**, v.164, p.301-311, 2011.
- CATTANEO, R. Four viruses, two bacteria, and one receptor: membrane cofactor protein (CD46) as pathogens' magnet. **Journal of Virology**, v. 78, p. 4385–4388, 2004.
- CEASAR, SA *et al.* Insert, remove or replace: A highly advanced genome editing system using CRISPR/Cas9. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1863, n.9 p.2333-44, 2016.
- CHOILEAIN, S.; ASTIER, A. CD46 processing: a means of expression. **Immunobiology**, v. 217, p. 169–175, 2012.
- CONG, L *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. **Science**, v. 339, p.819–823, 2013.

- DELTCHEVA, E *et al.* CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. **Nature**, v.471 n. 7340, p. 602–607, 2011.
- DOUDNA, J.A.; CHARPENTIER, E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, v.346, n. 6213, p.1258096, 2014.
- EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v.32, n.5, p.1792-97, 2004.
- FLORES, E.; KREUTZ, L.; DONIS, R. Swine and ruminant pestiviruses require the same cellular factor to enter the bovine cells. **Journal of General Virology**, v.77, p.1295-1303, 1996.
- FLORES, E; DONIS, R. Isolation of a mutant MDBK cell line resistant to BOvine Viral Diarrhea Virus Infection Due to a block in viral entry. **Virology**, v. 208, p. 565-575; 1995.
- GAMLEN, T *et al.* Expression of the NS3 protease of cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus results in the induction of apoptosis but does not block activation of the beta interferon promoter. **Journal of General Virology**, v. 91, p. 133–144, 2010.
- GILLESPIE, J. *et al.* Comparison by neutralization tests of strains of virus isolated from virus diarrhoea and mucosal disease. **The Cornell Veterinarian**. v .51, p.155–159, 1961.
- GRUMMER, B.; GROTHA, S.; GREISER-WILKE, I. Bovine viral diarrhoea virus is internalized by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. **Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 51, p. 427-432, 2004.
- HILTON, L *et al.* The NPro product of bovine viral diarrhoea virus inhibits DNA binding by interferon regulatory factor 3 and targets it for proteasomal degradation. **Journal of Virology**, v. 80, p. 11723-11732, 2006.
- HOLTKAMP D *et al.* ASSESSMENT of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. **Journal of Swine Health and Production**, v. 21, p. 72-84, 2013.
- HOUE, H. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Clinics of North America**, v.11, n.3, p. 521-548, 1995.
- HOUE, H. Epidemiological features and economical importance of bovinevirus diarrhoea virus (BVDV) infections. **Veterinary Microbiology**, v. 64, p. 89–107, 1999.
- HSU, P.; LANDER, E.; ZHANG, F. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. **Cell**, v.157, p.1262-1278, 2014.
- HUANG, P *et al.* Generation and characterization of a human oral squamous carcinoma cell line SCC-9 with CRISPR/Cas9-mediated deletion of the p75 neurotrophin receptor. **Archives of Oral Biology**, v.82, p.223–232, 2017.

- HUMBERT, O *et al.* Engineering resistance to CD33-targeted immunotherapy in normal hematopoiesis by CRISPR/Cas9-deletion of CD33 exon 2. **Leukemia**, electronic publication ahead of print, October 5, 2018.
- IQBAL, M.; FLICK-SMITH, H.; MCCAULEY, J.W. Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein Erns with cell surface glycosaminoglycans. **Journal of General Virology**, v.81, p.451–45, 2000.
- IQBAL, M.; MCCAULEY, J.W. Identification of the glycosaminoglycan-binding site on the glycoprotein Erns of bovine viral diarrhoea virus by site-directed mutagenesis. **Journal of General Virology**, v.83, p.2153–2159, 2002.
- JANKOVICOVA, J *et al.* Comparative fluorescence analysis of the bovine sperm using IVA-520 (anti-CD46 antibody) and lectins: probable localisation of CD46 on bovine sperm membrane. **General Physiology and Biophysics**, v. 30, p. 70–76, 2011.
- JINEK, M *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science**, v.337, n.6096, p.816-821, 2012.
- KEARSE, M *et al.* Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v.28, n.12, p.1647-1649, 2012.
- KNIAZEFF, A. *et al.* Antigenic relationship of some bovine viral diarrhoea-mucosal disease viruses from the United States, Great Britain and West Germany. **Veterinary Record**. v. 73, p.768–9, 1961.
- KREY, T *et al.* Function of bovine CD46 as a cellular receptor for bovine viral diarrhea virus is determined by complement control protein 1, **Journal of Virology**, v. 80, p. 3912–3922, 2006.
- KREY, T *et al.* Role of the low-density lipoprotein receptor in entry of bovine Viral diarrhea virus. **Journal of Virology**, v.80, p.10862-10867, 2006a.
- KREY, T.; THIEL, H.J.; RUMENAPF, T. Activation for pH-Triggered fusion during Entry. **Journal of Virology**, v. 79, n. 7, p. 4191–4200, 2005.
- LANYON, S.R *et al.* Bovine viral diarrhoea: Pathogenesis and diagnosis. **The Veterinary Journal**, v.199, n.2, p.201-209, 2014.
- LECOT, S *et al.* Bovine viral diarrhea virus entry is dependent on clathrin-mediated endocytosis. **Journal of Virology**, v. 79, n.16, p. 10826–10829, 2005.
- LEE KM, GILLESPIE JH. Propagation of virus diarrhea virus of cattle in tissue culture. **American Journal of Veterinary Research**. v. 18, p.9523, 1957.
- LI, C *et al.* CRISPR/Cas9-mediated editing of GABRR2 gene in RGC-5 cells induces random exon deletion, exon splicing and new exon recruitment, **Biochemical Engineering Journal**, v.139, p.43-50, 2018.
- LI, Y.; MODIS, Y. A novel membrane fusion protein family in Flaviviridae? **Trends in Microbiology**, v.22, p.176 –182, 2014.

- LIANG, D *et al.* The envelope glycoprotein E2 is a determinant of cell culture tropism in ruminant pestiviruses. **Journal of General Virology**, v. 84, p.1269-1274, 2003.
- LISWEZSKI MK *et al.* CD46 processing: a means of expression. **Immunobiology**, 217: 169– 175, 2005.
- MAISNER, A *et al.* Membrane cofactor protein (CD46) is a basolateral protein that is not endocytosed. Importance of the tetrapeptide FTSL at the carboxyl terminus. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.20793–20799, 1997.
- MAURER, K *et al.* CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhoea virus, **Journal of Virology**, v.78, p. 1792–1799, 2004.
- MCCLURKIN A.W. *et al.* Production of cattle immunotolerant to BVD virus. **Canadian journal of comparative medicine and veterinary science**. v. 48, p. 156-161. 1984
- NEILL, J.D. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus. **Biologicals**, v.41, p. 2-7, 2013.
- NEWCOMER, B.W.; GIVENS, D. Diagnosis and control of viral diseases of reproductive importance infectious bovine rhinotracheitis and bovine viral diarrhoea. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 32, n. 2, p. 425-441, 2016.
- OLAFSON P, MCCALLUM A, FOX F. An apparently new transmissible disease of cattle. **The Cornell Veterinarian**. v. 36, p.205–213, 1946.
- PASSLER, T.; WALZ P.H. Bovine viral diarrhoeavirus infections in heterologous species. **Animal Health Research Reviews**, v. 11, n.2, p. 191–205, 2009.
- PELLAGATTI, A *et al.* Application of CRISPR/Cas9 genome editing to the study and treatment of disease. **Archives of Toxicology**, v. 89, n.7, p. 1023-34, 2015.
- PINIOR, B *et al.* A systematic review of financial and economic assessments of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) prevention and mitigation activities worldwide. **Preventive Veterinary Medicine**, v.137, p. 77–92, 2017.
- POLAK, M.P.; ROLA, J.; ZMUDZIŃSKI, J.F. Contamination of foetal bovine serum with bovine viral diarrhoea virus (BVDV). **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v.52, p.501-505, 2008.
- PRATHER, R. S. *et al.* Knockout of maternal CD163 protects fetuses from infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). **Nature, Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 13371, 2017.
- RICHTER, V. *et al.* A systematic worldwide review of the direct monetary losses in cattle due to bovine viral diarrhoea virus infection. **The Veterinary Journal**, v. 220, p. 80–87, 2017.
- RIDPATH, J.; FLORES E.F. em Flores E.F. *Virologia veterinária*. ED. Da UFSM, Santa Maria, p. 565 - 590, 2007.
- RIDPATH, J.F. Bovine Viral Diarrhoea Virus: Global Status. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 26, n. 105, p. 121, 2010.

- RILEY-VARGAS, R.C *et al.* CD46: expanding beyond complement regulation. **TRENDS in Immunology**, v.25, n.9, 2004.
- RONECKER, S. *et al.* Formation of bovine viral diarrhea virus E1-E2 heterodimers is essential for virus entry and depends on charged residues in the transmembrane domains. **Journal of General Virology**, v.89, p.2114-2121, 2008.
- RÜMENAPF, T *et al.* Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. **Journal of Virology**, p.3288-3294, 1993.
- SALIKI, J.T.; DUBOVI, E.J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.20, p. 69–83, 2004.
- SALSMAN, J.; DELLAIRE, G. Precision Genome Editing in the CRISPR Era. **Biochemistry and Cell Biology**. v.95, n.2, p.187-201, 2017.
- SCHELP, C *et al.* Identification of cell membrane proteins linked to susceptibility to bovine viral diarrhoea virus infection. **Archives of Virology**, v.140, p.1997–2009, 1995.
- SCHMEISER, S *et al.* Morphogenesis of pestiviruses: new insights from ultrastructural studies of strain Giraffe-1. **Journal of Virology**, v.88, p.2717–2724, 2014.
- SCHMID-BURGK, J.L. Disruptive non-disruptive applications of CRISPR/Cas9. **Current Opinion in Biotechnology**, v.48, p.203-209, 2017.
- SMITH, D.B *et al.* Proposed revision to the taxonomy of the genus pestivirus, family flaviviridae. **Journal of General Virology**, v. 98, p. 2106-2112, 2017.
- SYMINGTON, L.S.; GAUTIER, J. Double-strand break end resection and repair pathway choice. **Annual Review of Genetics**, v.45, p.247-71, 2011.
- TAN, W *et al.* Gene targeting, genome editing: from Dolly to editors. **Transgenic Research**, v. 25, n. 3, p. 273-287, 2016.
- THIEL, H.J *et al.* Flaviviridae. In: FANQUET C.M (Ed.) *et al.*, **Virus Taxonomy**: eighth report of the international committee on the taxonomy of viruses. San Diego: Elsevier; p. 981–998, 2005
- TOGASHI, Y *et al.* MET gene exon 14 deletion created using the CRISPR/Cas9 system enhances cellular growth and sensitivity to a MET inhibitor. **Lung Cancer**, v.90, n.3, p.590-597, 2015.
- URYVAEV, L.V *et al.* Contamination of cell cultures with bovine viral diarrhea virus (bvdv). **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v.153, p.88-93, 2012.
- VAN GORP, H.; DELPUTTE, P.L.; NAUWYNCK, H.J. Scavenger receptor CD163, a Jack-of-all-trades and potential target for cell-directed therapy. **Molecular Immunology**, v. 47, p. 1650-1660, 2010.
- WALZ, P.H *et al.* Control of Bovine Viral Diarrhea Virus in Ruminants. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, p. 476–486, 2010.
- WANG, F.I *et al.* Structures and Functions of Pestivirus Glycoproteins: Not Simply Surface Matters. **Viruses**, v.7, p.3506-3529, 2015.

- WHITWORTH, K. M. et al. Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Nature Biotechnology**, v. 34, p. 20–22, 2016.
- YAMMAMOTO H *et al.* CD46: the multitasker of complement proteins. **The international Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 45: 2808-2820, 2013.
- ZEZAFOUN, H.; DECREUX, A.; DESMECHT, D. Genetic and splice variations of *Bos taurus* CD46 shift cell permissivity to BVDV the bovine pestivirus. **Veterinary Microbiology**, v. 152, p. 315–327, 2011.
- ZHONG, W.; GUTSHALL, L.L.; DEL VECCHIO, A.M. Identification and characterization of an RNA-dependent RNA polymerase activity within the nonstructural protein 5B region of bovine viral diarrhea virus. **Journal of Virology**, v. 72, p. 9365-9369, 1998.
- ZISCHEWSKI, J.; FISCHER, R.; BORTESI, L. Detection of on-target and off-target mutations generated by CRISPR/Cas9 and other sequence-specific nucleases. **Biotechnology Advances**, v.35, n.1, p.95-104, 2017.