

UNIVERSIDADE DE UBERABA  
DÊNIA MONTEIRO DE MOURA

IDENTIFICAÇÃO DE *Trypanosoma vivax* E DE ANTÍGENOS DO PARASITA EM  
PLASMA SEMINAL DE BOVINOS PÚBERES EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS

UBERABA, MG

2014

DÊNIA MONTEIRO DE MOURA

IDENTIFICAÇÃO DE *Trypanosoma vivax* E DE ANTÍGENOS DO PARASITA EM  
PLASMA SEMINAL DE BOVINOS PÚBERES EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos, do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba.

Orientador: Prof. Dr. André Belico de Vasconcelos

UBERABA, MG

2014

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

Moura, Dênia Monteiro de.

M865i Identificação de trypanosoma vivax e de antígenos do parasita em plasma seminal de bovinos púberes experimentalmente infectados / Dênia Monteiro de Moura. – Uberaba, 2014.

72 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Medicina Veterinária, concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-Graduação, 2014.

Orientador: Prof. Dr. André Belico de Vaconcelos

1. Bovino. 2. Tripanossomose em animais. 3. Reprodução animal. I. Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Medicina Veterinária, concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-Graduação. II. Título.

CDD 636.21

**Ata da Sessão Pública de defesa de dissertação para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos, a que se submeteu a aluna Dênia Monteiro de Moura – matrícula 5018379/3, orientada pelo Prof. Dr. André Belico de Vasconcelos.**

Aos trinta e um dias do mês de março do ano de dois mil e quatorze, às 14 horas, na sala 2C05, da Universidade de Uberaba, reuniu-se a Comissão Julgadora da defesa em epígrafe indicada pelo o Colegiado do Programa de Mestrado em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba, composta pelos Professores Doutores: André Belico de Vasconcelos - **Presidente**, Joely Ferreira Figueiredo Bittar e Marcos Vinícius da Silva, para julgar o trabalho da candidata Dênia Monteiro de Moura, apresentado sob o título: "IDENTIFICAÇÃO DE *Trypanosoma vivax* E DE ANTÍGENOS DO PARASITA EM PLASMA SEMINAL DE BOVINOS PUBERES EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS". O Presidente declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros da Comissão Julgadora. A seguir a candidata dissertou sobre o seu trabalho e foi arguido pela Comissão Julgadora, tendo a todos respondidos às respectivas arguições. Terminada a exposição, a Comissão reuniu-se e deliberou pelo seguinte resultado:

**APROVADO**

**REPROVADO** (anexar parecer circunstanciado elaborado pela Comissão Julgadora)

Para fazer jus ao título de MESTRE EM SANIDADE E PRODUÇÃO ANIMAL NOS TRÓPICOS, a versão final da tese, considerada aprovada devidamente conferida pela Secretaria do Mestrado em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos, deverá ser entregue à Secretaria dentro do prazo de 30 dias, a partir da data da defesa. O aluno Aprovado que não atender a esse prazo será considerado Reprovado. Após a entrega do exemplar definitivo, o resultado será homologado pela Universidade de Uberaba, conferindo título de validade nacional aos aprovados. Nada mais havendo a tratar, O Senhor Presidente declara a sessão encerrada, cujos trabalhos são objeto desta ata, lavrada por mim, que segue assinada pelos Senhores Membros da Comissão Julgadora, pelo Coordenador do Programa de Mestrado em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da UNIUBE, com ciência do aluno. Uberaba, aos trinta e um dias do mês de março de dois mil e quatorze.

Prof. Dr. André Belico de Vasconcelos

Prof. Dr.ª Joely Ferreira Figueiredo Bittar

Prof. Dr. Marcos Vinícius da Silva

Prof. Dr. Eustáquio Resende Bittar

Coordenador do Programa de Mestrado em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da UNIUBE

Flávia Michele da Silva

Secretária do Programa de Mestrado em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da UNIUBE

Ciência do Aluno:

*Dedico este trabalho a duas pessoas essenciais na minha vida: Thiago Franco Reis meu esposo, amigo e companheiro pela paciência, amor e incentivo ao longo desta jornada. E a minha melhor amiga, mãe de coração e conselheira Joely Ferreira Figueiredo Bittar por acreditar na minha capacidade, por impulsionar o meu crescimento pessoal e intelectual e por estar presente em todas as minhas grandes conquistas.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pelas inúmeras graças e bênçãos recebidas durante toda a minha vida.

À Universidade de Uberaba-UNIUBE por oportunizar o meu crescimento profissional e intelectual.

Ao programa de mestrado em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos- UNIUBE pela oportunidade de aprendizado e enriquecimento curricular.

Ao Sinpro pela concessão da bolsa de estudos imprescindível á minha formação.

À empresa Neovet, e principalmente a seu proprietário Danilo Capaneli pelo fornecimento de equipamentos para realização dos experimentos.

Ao meu orientador, colega e amigo Dr. André Belico de Vasconcelos pela compreensão, amizade e presteza ao longo desta jornada.

Aos professores do mestrado, queridos mestres obrigada por todos os ensinamentos.

Ao professor Dr. Álvaro Ferreira Junior pelos conhecimentos transmitidos, pelos conselhos e pela grande ajuda na área da Imunologia.

Ao professor Dr. André Pedrosa- Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal do Triângulo Mineiro pela grande parceria e cooperação durante a realização deste trabalho.

Aos professores Geraldo Thedei e Giuliana Thedei pelos valiosos ensinamentos na área de biologia molecular na realização das técnicas da PCR.

Ao professor Raul Morais, pela ajuda na área de reprodução animal.

Aos meus queridos ex-alunos e agora colegas de mestrado Luiz Flávio e Guilherme pela lealdade, amizade e cooperação durante todo o experimento e pela incansável força de vontade durante todos os percalços que enfrentamos.

À minha querida colega de mestrado Paula Boeira Bassi, pelos bons momentos e ensinamentos durante estes dois anos.

As amigas Camila Cristina, Jandra e Geovanna pelo total apoio e suporte nos laboratórios do Hospital Veterinário de Uberaba.

Às colegas do laboratório de Imunologia da UFTM, Lara e Monique pela paciência e dedicação na realização dos experimentos e aos colaboradores do laboratório de biologia molecular.

Aos alunos de iniciação científica, Marco Túlio, Laís, Guilherme Cunha, Rafael Lafetá, José Paulo e Everton pela valiosa ajuda durante a realização dos experimentos.

Aos colegas veterinários, Bruno Balduino, Marcos Brandão e Marcelo Cembranelli pelo fornecimento de amostras de sêmen para conclusão do experimento.

Ao setor de grandes animais do Hospital Veterinário de Uberaba e seus colaboradores Jadir, Antônio, Cristiano e Fernando pela ajuda e cuidado com os animais experimentais.

Aos meus familiares e amigos pelo grande apoio e carinho durante este período.

## RESUMO

Este trabalho objetivou a detecção do *Trypanosoma vivax* e de antígenos do parasita no plasma seminal de bovinos púberes experimentalmente infectados, pois há descrição de lesões epididimárias em modelos ovinos experimentalmente infectados, mas não há registros da presença do parasita em plasma seminal bovino. Foram utilizados sete bovinos, sendo quatro inoculados experimentalmente, com  $2 \times 10^6$  tripomastigotas de *T. vivax*/mL (grupo infectado) e três (não infectados) negativos a técnica de *buffy coat* (BCT), reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e reação de polimerase em cadeia (PCR) para *T. vivax*. Os animais infectados foram acompanhados em relação à parasitologia (BCT), e coleta de sêmen com eletroejaculador até o 90° dpi. As coletas nos animais infectados foram realizadas nos 1°dpi, 15°dpi, 30°dpi, 45°dpi, 60° dpi, 75°dpi, 90°dpi. A parasitemia dos animais infectados foi detectada a partir do 14° dpi, atingindo seu pico no 18° dpi, com ausência no 30°dpi, 60°dpi e 90° dpi. Nos animais não infectados foi realizada apenas uma coleta de sêmen com eletroejaculador para avaliação do perfil de bandas proteicas no plasma seminal em relação aos animais infectados. O plasma seminal foi obtido por centrifugação a 1200g por 10 minutos e conservado em guanidina 1:1 (- 20°C) para a identificação do DNA de *T. vivax* ou seus antígenos por PCR. As amostras destinadas a realização da eletroforese SDS-PAGE e *Western Blotting* foram conservadas em inibidor de protease 1:1 (-20° C). Na PCR duas regiões do parasita foram pesquisadas a *spliced-leader* de 210 bp, e a Catalepsina-L de 177 bp. Foi possível a detecção do parasita somente pela região amplificada da Catalepsina-L. O perfil eletroforético do plasma seminal dos bovinos infectados experimentalmente identificou bandas de proteínas de 186,68 a 7,73 kDa e de 130,65 a 10,17 nos animais não infectados. Na avaliação por *Western blotting* dos animais infectados foram reconhecidos 105 bandas contendo antígenos protéicos de 131,8 a 8,95 kDa. Na fase aguda da infecção (1° dpi a 15° dpi) cinco antígenos protéicos de 13,47 a 11,87 kDa foram os mais prevalentes, enquanto que, na fase crônica (30°dpi a 90° dpi) 21 antígenos proteicos foram mais prevalentes de 55,78 a 16,79 kDa e 11,51 a 8,95 kDa. A detecção do DNA do parasita e dos seus antígenos protéicos no plasma seminal permitirá um maior entendimento sobre as alterações reprodutivas ocorridas em machos durante a infecção por *Trypanosoma vivax* e a discussão sobre novas medidas de controle a fim de se evitar a possível transmissão via sêmen.

**Palavras-chaves:** Tripanossomíase, bovino, reprodução.



## ABSTRACT

This study aimed to detect *Trypanosoma vivax* and parasite antigens in seminal plasma of experimentally infected cattle pubescent, because no description of epididymal lesions in sheep experimentally infected models, but there are no records of the presence of the parasite in bovine seminal plasma. Seven animals were utilized, four inoculated with  $2 \times 10^6$  trypomastigotes of *T. vivax*/mL (infected group) and three (uninfected) negative *Buffy coat* technique (BCT), indirect immunofluorescence assay (IFA) and the polymerase chain reaction (PCR) for *T. vivax*. Infected animals were followed regarding parasitology (BCT), and semen collection by electroejaculation with the 90<sup>th</sup>dpi. The collections in infected animals, 15<sup>th</sup> dpi, 30<sup>th</sup>dpi, 45<sup>th</sup>dpi, 60<sup>th</sup>dpi, 75<sup>th</sup>dpi, 90<sup>th</sup>dpi were performed at 1<sup>th</sup>dpi. The parasitemia was detected from 14<sup>th</sup>dpi, peaking at 18<sup>th</sup>dpi, with the absence on the 30<sup>th</sup>dpi, 60<sup>th</sup>dpi and 90<sup>th</sup>dpi. In uninfected animals was held just a semen collection with eletroejaculator to review the profile of protein bands in seminal plasma compared to infected animals. Seminal plasma was obtained by centrifugation at 1200g for 10 minutes and kept at 1:1 guanidine (- 20 ° C) for identification of DNA from *T. vivax* or their antigens by PCR. The samples for the completion of SDS - PAGE and *Western blotting* were preserved in protease inhibitor 1:1 (-20 ° C). PCR in two regions of the parasite *spliced -leader* of 210 bp were surveyed, and *Catalepsina -L* of 177 bp . It was possible to detect the parasite only amplified by the *Catalepsina -L* region. The electrophoretic profile of seminal plasma from infected cattle experimentally identified protein bands from 186.68 to 7.73 kDa and 130.65 to 10.17 kDa in uninfected animals. When analyzed by *Western blotting* of infected animals 105 bands were recognized protein antigens containing 131.8 to 8.95 kDa. In the acute phase of infection (1<sup>th</sup> dpi to 15<sup>th</sup> dpi ) five protein antigens from 13.47 to 11.87 kDa were the most prevalent, whereas in the chronic phase (30<sup>th</sup> dpi to 90<sup>th</sup> dpi) 21 protein antigens were more prevalent than 55.78 to 16.79 kDa and 11.51 to 8.95 kDa. The detection of parasite DNA and its protein in seminal plasma antigens will allow a greater understanding of the reproductive changes in males during infection with *Trypanosoma vivax* and discussion of new control measures in order to prevent possible transmission via semen

**Key-words:** *Trypanosoma vivax*, bovine, reproduction

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Principais organelas encontradas no *Trypanosoma vivax*. C (Cinetoplasto), N (Núcleo)F(Flagelo Livre).....17
- Figura 2:** Montagem adequada de sanduiche do *blotting*.....34
- Figura 3.** Determinação da parasitemia durante a infecção experimental por *T. vivax* nos bovinos púberes.....37
- Figura 4:** Gel de Eletroforese (agarose 1,5%, corado com brometo de etídio 0,5 mg amostras de DNA extraídas de plasma seminal (PM) Marcador molecular DNA Ladder (Invitrogen®); (C+) controle positivo amostra de *T. vivax* isolada de surto em Veríssimo(C-) Controle negativo (água destilada) 210 bp.....38
- Figura 5:** Gel de Eletroforese (agarose 1,5%, corado com brometo de etídio 0,5 mg amostras de DNA extraídas de plasma seminal (PM) Marcador molecular DNA Ladder (Invitrogen®); (C+) controle positivo amostra de *T. vivax* isolada de surto em Veríssimo(C-) Controle negativo (água destilada). 177bp 1(30°dpi) 2(60°dpi) 3 (75°dpi) 4(90°dpi).....38
- Figura 6:** Eletroforese SDS-PAGE do plasma seminal de bovinos experimentalmente infectados por *Trypanosoma vivax* no 1° dpi (A), 15°-30°dpi (B), 45°-60° dpi (C) e 75°-90°dpi (D).....39
- Figura 7:** Bandas de proteínas obtidas do plasma seminal de bovinos não infectados submetidos a SDS-PAGE.....40
- Figura 8:** Número de bandas proteicas observadas no perfil eletroforético do plasma seminal dos animais infectados experimentalmente e não infectados (negativos).....40
- Figura 9:** Identificação de antígenos proteicos em plasma seminal de bovinos experimentalmente infectados 1° e 15°dpi (9 A), 30° e 45° dpi (9B), 60° e 75° dpi (9C) e 90° dpi (9D).....41
- Figura 10:** Análise da atividade parasitêmica e perfil de antígenos proteicos dos animais experimentalmente infectados por tripomastigotas de *T. vivax*. A linha pontilhada demonstra a parasitemia e as colunas os antígenos proteicos detectados durante os 90 dias de infecção.....41
- Figura 11:** Identificação de bandas de proteínas em plasma seminal de bovinos não infectados por soro negativo de *T. vivax*, 1° e 15°dpi (11 A), 30° e 45° dpi (11B), 60° e 75° dpi (11C) e 90°dpi (11D).....45
- Figura 12:** Número de bandas de proteínas detectadas no plasma seminal dos animais infectados experimentalmente incubados com soro hiperimune e soro negativo.....46

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1:** Antígenos protéicos identificados no plasma seminal de bovinos infectados experimentalmente com *Trypanosoma vivax* e reconhecidas pelo soro hiperimune.....42
- Quadro 2:** Bandas de proteínas identificadas no plasma seminal de bovinos infectados experimentalmente e reconhecidas pelo soro negativo.....42
- Quadro 3:** Bandas proteicas identificadas no plasma seminal de bovinos não infectados durante o período experimental e reconhecidas pelos soros negativos e soro hiperimune respectivamente.....44

## LISTA DE ABREVIATURAS

BCT	-	<i>Buffy Coat Technique</i>
BIS	-	N <sup>o</sup> N metileno –Bis-acrilamida
DNA	-	Ácido Desoxirribonucléico
dpi	-	dias pós-infecção
EDTA	-	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
FSH	-	Hormônio folículo estimulante
GNRH	-	Hormônio regulador de gonadotrofina
HAT	-	Tripanossomíase humana africana
HPS	-	Síndrome hemofagocítica
kDa	-	kiloDalton
LH	-	Hormônio luteinizante
µl	-	Microlitro
MHCT	-	Método do microhematócrito
PAGE	-	Eletroforese em gel de Poliacrilamida
PBS	-	Salina tamponada com fosfato
PCR	-	Reação em cadeia de polimerase
RIFI	-	Reação de Imunofluorescência indireta
RNA	-	Ácido Ribonucléico
SC	-	Subcutânea
SDS	-	Dodecil- sulfato de sódio
TA	-	Temperatura ambiente
TBE	-	Tris/Borato/EDTA
VCM	-	Volume Corpuscular Médio
WLC	-	Whole cell lysate

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	16
2.1 ETIOLOGIA, MORFOLOGIA E CICLO BIOLÓGICO .....	16
2.3 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS .....	17
2.4 ESPERMATOGÊNESE, PLASMA SEMINAL E ALTERAÇÕES CLÍNICAS E FISIOLÓGICAS DO SÊMEN CAUSADAS PELO <i>Trypanosoma vivax</i> .....	18
2.5 DIAGNÓSTICO.....	21
<b>2.5.1 Testes Parasitológicos</b> .....	22
<b>2.5.2 Testes Sorológicos</b> .....	22
<b>2.5.3 Testes Moleculares</b> .....	24
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	26
3.1 OBJETIVO GERAL.....	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	26
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	27
4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS .....	27
4.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	27
<b>4.2.1 Infectados com tripomastigotas de <i>T. vivax</i></b> .....	27
<b>4.2.2 Não infectados para <i>T. vivax</i></b> .....	28
4.3 AVALIAÇÃO PARASITOLÓGICA DOS ANIMAIS INFECTADOS .....	28
4.4 OBTENÇÃO DO PLASMA SEMINAL DOS ANIMAIS INFECTADOS E NÃO INFECTADOS POR <i>T. vivax</i> .....	29
4.5 AVALIAÇÃO PELA PCR.....	29
4.6 DOSAGEM DE PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL DOS ANIMAIS INFECTADOS E NÃO INFECTADOS POR <i>T. vivax</i> .....	31
4.7 DETERMINAÇÃO DO PERFIL ELETROFORÉTICO SDS-PAGE DO PLASMA SEMINAL DOS ANIMAIS INFECTADOS E NÃO INFECTADOS POR <i>T. vivax</i> .....	31
<b>4.7.1 Coloração pelo azul de Comassie</b> .....	34

<b>4.7.2 Cálculo dos pesos moleculares aparentes e migração das bandas do perfil eletroforético.....</b>	<b>34</b>
4.8 <i>WESTERN BLOTTING</i> .....	34
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
5.1 ANÁLISE PARASITOLÓGICA.....	37
5.2 PCR.....	38
5.3 PERFIL ELETROFORÉTICO.....	39
5.4 PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO PLASMA SEMINAL DE BOVINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE .....	41
<b>5.3.1 Pelo soro hiperimune.....</b>	<b>41</b>
<b>5.3.2 Pelo soro negativo.....</b>	<b>44</b>
5.4 PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO PLASMA SEMINAL DE ANIMAIS NÃO INFECTADOS.....	46
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>50</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>51</b>

**ANEXO I – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL (UNIUBE)**

**ANEXO II - SOLUÇÕES DA PCR**

**ANEXO III - SOLUÇÕES ELETROFORESE SDS-PAGE**

**ANEXO IV - COLORAÇÃO PELO AZUL DE COMASSIE**

**ANEXO V - SOLUÇÕES WESTERN BLOTTING**

**ANEXO VI - BANDAS DE PROTEÍNAS OBSERVADAS NO PLASMA SEMINAL DOS BOVINOS PELA ELETROFORESE**

**ANEXO VII - ANTÍGENOS PROTEÍCOS IDENTIFICADOS NO PLASMA SEMINAL DOS ANIMAIS INFECTADOS E NÃO INFECTADOS PELO SORO HIPERIMUNE E SORO NEGATIVO**



## 1 INTRODUÇÃO

*Trypanosoma vivax*, um protozoário flagelado, pertencente à família Trypanosomatidae, é o responsável pela tripanosomíase, principalmente em bovinos e outros ruminantes da América do Sul podendo afetar a saúde animal e produtividade levando à diminuição da produção, retardo no crescimento, infertilidade e mortalidade (HOARE, 1972).

A transmissão desta hemoparasitose nas Américas ocorre mecanicamente através da picada de dípteros hematófagos dos gêneros *Tabanus* spp e *Stomoxys* spp por via inoculativa das formas tripomastigostas presentes em seu aparelho bucal e por via iatrogênica através de agulhas contaminadas (GARDINER, 1989).

A tripanossomíase é particularmente uma enzootia importante na reprodução animal, devido a sua disseminação por todo o país com variações sazonais na incidência da doença. No Brasil *Trypanosoma vivax* foi identificado nos Estados do Amapá (SERRA-FREIRE, 1981), Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (PAIVA et al, 1997; SILVA et al, 1996.; BARBOSA et al., 2001), Tocantins (LINHARES et al., 2006) Paraíba (BATISTA et al., 2007) Maranhão (GUERRA et al., 2008) Minas Gerais (CARVALHO et al., 2008) e Rio Grande do Sul (SILVA et al., 2009).

Na fase aguda da enfermidade os animais poderão apresentar febre, anemia, anorexia, apatia, emagrecimento progressivo, lacrimejamento, opacidade de córnea, além de desordens neurológicas e reprodutivas. Na fase crônica da infecção frequentemente não são observados sinais clínicos, dificultando o diagnóstico e levando os animais ao estado de portador, atuando como reservatórios da infecção.

As alterações reprodutivas ocasionadas pela tripanossomíase em fêmeas como abortos, repetição deaios, morte embrionária e natimortos foram bem descritas (SILVA, et al., 2004). Já a transmissão transplacentária foi confirmada pela primeira vez por Ikede e Losos (1972). Posteriormente, Okech et al., (1996); Betancourt (1978) e Meléndez et al., (1993) confirmaram esse modo de transmissão, o qual segundo Ogwu et al., (1986) pode estar associado com a ocorrência de abortos e natimortos.

Em machos as informações acerca das alterações reprodutivas ocasionadas pelo *T. vivax* são escassas. Adamu et al. (2007) realizaram infecção experimental em zebuínos com *T. vivax* e constataram que com o decorrer da infecção há destruição do tecido intersticial com túbulos seminíferos hipoplásicos, desaparecimento das células de sertoli e comprometimento



do parênquima epididimário com áreas de necrose e depleção da reserva espermática (BEZERRA et. al., 2008). Além das lesões anatomopatológicas testiculares e epididimárias constatadas pelos autores supracitados, alterações na qualidade seminal, ocasionadas pela redução da concentração espermática (oligospermia ou mesmo azoospermia), diminuição do volume do ejaculado, redução de células espermatogênicas e aumento das anormalidades morfológicas espermáticas além de infertilidade temporária e esterilidade em casos de cronicidade da doença (SEKONI et al., 1990) e (ADAMU et al., 2007). Desta forma, destacase a importância da morbidade ocasionada pela tripanossomíase em machos e embora ainda pouco investigada, é de suma importância epidemiológica a confirmação da possibilidade de transmissão venérea do *T. vivax*, através da identificação da presença do parasita no sêmen.

Neste contexto, o presente trabalho objetivou a detecção do DNA do parasita e de seus antígenos proteicos no plasma seminal de bovinos púberes experimentalmente infectados com *T. vivax*.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ETIOLOGIA, MORFOLOGIA E CICLO BIOLÓGICO

O agente etiológico da tripanosomíase bovina é o *Trypanosoma (Duttonella) vivax*, um protozoário flagelado, pertencente ao filo Euglenozoa, classe Mastigophora, subordem Trypanosomatina com uma única família Trypanosomatidae. A seção Salivaria é dividida em quatro subgêneros (*Duttonella*, *Pycnomonas*, *Nannomonas* e *Trypanozoon*).

As principais características de formas sanguíneas *Duttonella* são os grandes cinetoplastos terminais situados em uma extremidade posterior arredondada, membrana ondulante desenvolvida medianamente, e um flagelo livre (OSÓRIO et al., 2008).

As formas tripomastigotas encontradas na corrente sanguínea são basicamente lancetadas, o corpo é alongado e achatado. Ao corte transversal apresenta-se elíptico ou oval e suas extremidades são afiladas. A extremidade pela qual avança durante a locomoção é costumeiramente descrita como anterior final. As principais organelas de um tripanosoma são o núcleo, o cinetoplasto, o sistema mastigonte representado pelo flagelo (Figura 1) e corpo basal (SILVA et al., 2002).

Segundo Hoare (1972), as formas tripomastigotas delgadas tem comprimento variando de 23,6 a 27,0 $\mu$ m e são encontradas na fase de elevada parasitemia, enquanto que na fase de baixa parasitemia, as formas curtas e largas apresentando variação de 21,4 a 24,6 $\mu$ m.



**Figura 1:** Principais organelas encontradas no *Trypanosoma vivax*. C (Cinetoplasto), N (Núcleo) F (Flagelo Livre).

**Fonte:** Silva et.al (2002).

*T. vivax* africano é transmitido ciclicamente pelas moscas tsé-tsé, desenvolvendo-se em seu tubo digestivo. Na América do Sul, devido à perda da habilidade de se desenvolver

ciclicamente, o parasita é transmitido mecanicamente através de dípteros hematófagos das famílias Tabanidae, Stomoxidinae e Hippoboscidae não havendo crescimento ou multiplicação nestes insetos (HOARE, 1972; GARDINER, 1989 e GUERRA, 2013). Nestes casos, a mosca se alimenta de mais de um animal e permanece infectante por apenas um curto período de tempo.

Serra-Freire e Rezende (1988), mostraram que moscas da espécie *Stomoxys calcitrans* alimentadas em ovinos infectados com *T. vivax* foram capazes de fazer a transmissão mecânica. Porém, isto somente aconteceu quando as moscas sofreram interrupção da alimentação e encontraram um novo hospedeiro em menos de 15 segundos, e não tinham tido nenhuma alimentação anterior à do hospedeiro vertebrado infectado.

### 2.3 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS

O curso da infecção por *T. vivax* depende de uma série de fatores, entre eles o hospedeiro, presença do vetor biológico ou mecânico e patogenicidade do inóculo. A parasitemia apresenta flutuações irregulares, até mesmo durante o dia (OSÓRIO et al., 2008).

O período entre a infecção e o aparecimento da parasitemia (período pré-patente) varia em função da resistência inata do hospedeiro, infecções intercorrentes, bem como, por fatores relacionados ao parasita, tais como: frequência de passagem cíclica ou mecânica e quantidade de tripanossomos inoculados. O período pré-patente médio após a inoculação do *T. vivax* é de quatro dias por via intravenosa e de sete por via intramuscular, em bovinos, ovinos e caprinos. (STEPHEN, 1986).

A infecção aguda é caracterizada por elevada parasitemia em associação à diminuição dos parâmetros eritrocitários, levando o animal a anemia, com duração de 2 semanas a 2 meses após infecção. Na fase crônica, nos animais que não morrem, os parâmetros eritrocitários tendem a aumentar (ou até voltar aos parâmetros fisiológicos) em torno de 6 a 8 semanas, porém ainda observam-se recorrências da parasitemia em baixas concentrações podendo se estender por vários meses e até anos (TAYLOR e AUTHIÉ, 2004). Anemia, leucopenia com linfocitose e ausência de ganho de peso são observados, também, durante a fase crônica (BATISTA et al., 2006)

Na tripanossomíase por *T. vivax* o principal sinal clínico observado é a anemia. Anemia persistente e insuficiência cardíaca congestiva, devido aos danos do miocárdio são as principais causas de mortalidade dos animais infectados com tripanossomas no campo

(SANNUSI, 1979; MURRAY et al, 1979). O agente desencadeia uma anemia hemolítica nos estágios iniciais da infecção, que é atribuída a mecanismos imunomediados (SCHENK, 2001).

A fisiopatologia das lesões inflamatórias e degenerativas causadas pelos tripanossomas não é bem determinada e/ou conhecida, e supõe-se que haja deposição de imunocomplexos nos diversos tecidos e, desse modo, as hemácias sensibilizadas por tais complexos seriam destruídas pelo sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro (TIZARD et al., 1978), e/ou o próprio parasito teria causado danos aos tecidos do espaço extravascular pela inerente movimentação (VAN DEN INGH et al., 1976).

O fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) pode contribuir para a anemia em diferentes níveis: pode agir sobre hematopoiese, baixando a eritropoietina e inibindo a proliferação de células precursoras (JELKMANN, 1998) ou ele pode ter um papel na hiperativação do macrófago sistêmico e HPS (LARROCHE e MOUTHON, 2004).

Geralmente, a anemia causada por *T. vivax* caracteriza-se inicialmente como microcítica normocrômica, passando para macrocítica por um período de tempo e, posteriormente, torna-se microcítica, revelando um quadro de anemia crônica (SILVA et al., 1999; PAIVA et al., 2000; BATISTA et al., 2007; ABRÃO 2009).

Nos casos onde há cronicidade da doença a quantidade de ferro no organismo pode diminuir, levando a um quadro de anemia microcítica hipocrômica (MURRAY et al., 1978), em virtude da remoção das hemácias complexadas com anticorpos ou marcadas com complemento pelo sistema mononuclear fagocítico, retendo o ferro do grupamento heme na forma de ferretina. Além disso, a recaptção de ferro pelo sistema fagocítico mononuclear pode estar prejudicada pela liberação de interleucinas e pela grande perda desse elemento associada à pouca absorção por via dietária (HUTCHISON e DAVEY, 1999); e a anemia hemolítica, observada nas tripanossomíases, pode ocasionar hemoglobinemia e hemoglobinúria, predispondo à grande perda de ferro pela urina (JENNINGS, 1976).

#### 2.4 ESPERMATOGÊNESE, PLASMA SEMINAL E ALTERAÇÕES CLÍNICAS E FISIOLÓGICAS DO SÊMEN CAUSADAS PELO *Trypanosoma vivax*

Segundo Aguiar et al., (2006) a espermatogênese é um processo cíclico no qual os gonócitos, primeiras células germinativas a habitarem os túbulos seminíferos, multiplicam-se e diferenciam-se em espermatogônias. A última geração destas células, formada pelas

espermatogônias B, sofre meiose, formando os espermatócitos primários e as espermatídes arredondadas, que se diferenciam em espermatozoides (COUROT et al.,1970; CURTIS e AMANN, 1981; GRIFFIN, 1988; RUSSELL e FRANÇA, 1994).

O plasma seminal um dos constituintes do sêmen é produzido a partir da mistura de secreções dos testículos, epidídimos, ductos deferentes, ampolas, glândulas vesiculares e próstata. É um fluído constituído de proteínas, carboidratos, lipídeos, sais minerais e vitaminas e, tem a função de transportar e proteger os espermatozoides do momento da ejaculação até o trato genital feminino. Aproximadamente 15-20 proteínas correspondem a 60-80% da concentração total de proteínas (MARTINS, 2009).

Dentre estas proteínas identificadas já foi constatado que algumas podem afetar diretamente a fertilidade dos machos, pois, além de modificar a fertilidade do espermatozoide da cauda do epidídimo, o plasma seminal também modifica a fertilidade do espermatozoide ejaculado (JOBIM et al., 2009).Proteínas com peso molecular entre 26 a 55 kDa foram apontadas em touros com alta fertilidade e de 16 kDa em touros de baixa fertilidade (RONCOLLETA et al., 1999).

Os machos acometidos pela tripanossomíase por *T. vivax* apresentam várias desordens reprodutivas quer seja em infecções naturais ou experimentais. Tais alterações são reportadas quase que exclusivamente em ruminantes domésticos, os principais susceptíveis à doença (ANOSA, 1983). Nesse contexto, os efeitos do *T. vivax* sobre a reprodução despontam como um dos principais responsáveis por acarretarem prejuízos econômicos para o produtor.

A tripanossomíase afeta severamente o tempo de reação de coleta de sêmen, com dificuldade progressiva de obter ejaculado, provavelmente devido ao estresse da infecção e danos aos órgãos genitais. Ao mesmo tempo mudanças adversas nas características do sêmen como a diminuição do volume médio, aumento de anormalidades morfológicas nos espermatozóides e diminuição da concentração de espermatozóides por ejaculação, provavelmente devido à degeneração testicular associada à crises de hipertermia na fase aguda da infecção (ARTHUR, 1964; ROBERTS, 1971 ; KUMI – DIAKA, 1981 apud SEKONI et al., 1988).

Sekoni et al., (2004) demonstrou com bovinos zebuínos e animais cruzados parasitados por *T. vivax* que inicialmente os animais apresentavam baixa viabilidade espermática, porém nos níveis limites para a fecundação.

Carneiros não infectados por *T. vivax* apresentam o sêmen com aspecto opaco e cremoso, já no período de infecção por *T. vivax* as amostras de sêmen apresentam-se leitoso aguado e, em seguida, transparente com deterioração progressiva nas características do sêmen

ao longo das nove semanas de pós- infecção. Após a infecção, há uma redução progressiva do volume de sêmen de todos os carneiros infectados e ao final de nove semanas pós-infecção a maioria deles não foi capaz de ejetar, além de drástica redução no volume, decréscimo na concentração de espermatozoides, tornando-se oligozoospermicos. O número de espermatozoides vivos diminuiu enquanto o número de espermatozoides mortos aumentou. Observou-se a redução na motilidade dos espermatozoides e aumento nas patologias afetando severamente as características do sêmen. A infecção por *T. vivax* teve efeitos patogênicos mais graves sobre as características do sêmen ovino, possivelmente devido às diferenças em patogenicidade das estirpes de tripanossomas (SEKONI, 1992).

Touros infectados com *T. vivax* podem apresentar degeneração testicular leve, moderada ou severa. Em alguns animais pode-se observar que a infecção por *T. vivax* pode acarretar a destruição celular dentro dos tecidos intersticiais e dos túbulos seminíferos. Degeneração leve a moderada no tecido epididimário com redução significativa de suas reservas espermáticas entre 20 e 50%, além da degeneração moderada das vesículas seminais, glândulas prostáticas e ampolas (SEKONI et al., 1990).

Adamu et al. (2007), estudaram os danos progressivos em testículos e epidídimos de zebuínos experimentalmente infectados por *T. vivax*. Esses órgãos foram estudados anatomopatologicamente aos 14, 28 e 56 dias pós-infecção. Observou-se que com o decorrer da infecção, ocorreu depleção das células espermátogênicas e destruição do tecido intersticial (túbulos seminíferos hipoplásicos além do desaparecimento das células de sertoli). No epidídimo, os danos chegaram a 60% de comprometimento do parênquima, verificando-se áreas focais de necrose e ainda metaplasia escamosa do epitélio epididimário, com reserva espermática avaliada em 0% aos 56 dias pós-infecção. Os citados autores demonstraram que os danos no sistema reprodutor masculino já estão presentes em fases precoces da doença, aos 14 dias pós-infecção.

Embora alguns dados já estejam disponíveis sobre os efeitos da infecção crônica por *T.viva* a escassez de informações sobre o grau dos danos testiculares e epididimários em diferentes fases da infecção aguda (ADAMU, 2007)

Na etiopatogenia de lesões testiculares e epididimárias outros aspectos deverão ser observados visto que a tripanossomíase por *T. vivax* é uma infecção sistêmica que provoca hipertermia, anorexia e anemia. E, desta maneira, tais fatores podem contribuir para o desencadeamento de processos degenerativos (MCENTEE, 1990; SETCHELL, 1998).

De acordo com Adamu et. al., (2007) os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na disfunção testicular induzida por *Trypanosoma* spp. não estão bem elucidados. A

possibilidade de que durante a tripanossomíase ocorram danos hipofisários resultando em disfunção testicular como uma consequência da interrupção da secreção de LH e FSH (APTED, 1970; IKEDE e LOSOS, 1975) foi refutada por descrições de BOLY et al. (1994) e MUTAYOBA et al. (1994) que relataram que a função hipofisária, como observado pela medida da resposta do LH ao GnRH, não foi afetada. No entanto, a destruição de células de Leydig, conforme observado no presente estudo, pode resultar em declínio na esteroidogênese testicular. Isso, conseqüentemente, pode agravar as alterações degenerativas nos túbulos seminíferos com depleção subsequente das células espermatogênicas, uma vez que a espermatogênese depende da secreção androgênica normal (SETCHELL, 1978; CAMERON et al, 1993).

Contudo, Isoun e Anosa (1974), destacam que o mecanismo pelo qual *T. vivax* produz lesões degenerativas no testículo está relacionado com a elevada taxa de atividade metabólica e biossíntese deste órgão, que está intimamente relacionado com a produção de milhões espermatozoides por dia, o que torna muito sensível a este dano. Em relação à degeneração testicular fatores como as mudanças na temperatura corporal, especialmente associado com os picos febris (hipertermia) ocorridos durante o pico de parasitemia (ANOSA e ISOUN, 1980) e a obstrução vascular causada pela formação de trombos de fibrina com conseqüente necrose de tecido testicular.

Os prejuízos econômicos dessas lesões tornam-se claros, visto que interferem diretamente sobre a fertilidade dos machos infectados, especialmente os animais geneticamente superiores e sobre a fertilidade dos rebanhos servidos por esses machos. Entretanto, muitas vezes esses efeitos não são perceptíveis e nem mensurados, especialmente em criações extensivas (GOMES, 1991).

## 2.5 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico desta enfermidade poderá ser realizado através de técnicas parasitológicas com a observação direta de formas tripomastigotas em esfregaços sanguíneos (fase aguda da doença), testes sorológicos (fase crônica) e técnicas de biologia molecular através da detecção do DNA/RNA do parasita.

### **2.5.1 Testes Parasitológicos**

Os parasitas podem ser demonstrados em esfregaços de sangue espessos e finos, em preparações de sangue anticoagulado concentradas (THOMPSON et al., 1992).

Na fase aguda, quando os tripanosomas são abundantes a identificação morfológica do parasita é possível através de métodos diretos, por meio de exames de sangue fresco entre lâmina e lamínula. Esfregaços com gota espessa podem ser corados pelo método de Giemsa. (GARDINER, 1989).

A técnica de centrifugação ou microhematócrito (WOO, 1970; BETANCOURT e JÚLIO, 1979) é um dos métodos parasitológicos mais utilizados e consiste na observação da motilidade das formas tripomastigotas entre a camada de leucócitos e do plasma. A técnica permite a detecção de tripanosomas de seis a dez dias antes de serem detectados no exame a fresco como o esfregaço de gota espessa (MOLYNEUX, 1975). Apesar de sua facilidade de uso, a técnica de Woo apresenta baixa sensibilidade quando aplicados durante a fase crônica da doença, ea sensibilidade diminui consideravelmente quando a parasitemia é inferior a 200 tripomastigotas/ml de sangue (DESQUESNES; TRESSE, 1996).

### **2.5.2 Testes Sorológicos**

#### **2.5.2.1 Eletroforese SDS-PAGE e Western Blotting**

O termo eletroforese foi criado por Michaelis, em 1909, para descrever a migração de colóides sob a influência de um campo elétrico (SARGENT e GEORGE, 1975). O princípio da eletroforese é baseado na migração de íons submetidos à corrente elétrica, ou seja, moléculas com carga negativa migram para o pólo positivo e moléculas com carga positiva migram para o pólo negativo. A evidenciação de proteínas e ácidos nucleicos é uma ferramenta importante para o estudo da relação entre parasita-hospedeiro através da determinação do peso molecular das proteínas e caracterização de moléculas de ácidos nucleicos (DNA e RNA) (BRUNE et al., 1998)

A separação de moléculas durante a eletroforese ocorre em função de suas cargas elétricas, de seus pesos moleculares e de suas conformações, em suportes porosos e tampões apropriados, sob a influência de um campo elétrico contínuo. Sendo substâncias anfólicas, as proteínas adquirem carga positiva ou negativa em função do pH. É, portanto, importante



manter o pH do meio estável durante a eletroforese, mediante soluções-tampão. (BRUNE et al., 1998)

A fricção e a velocidade da migração de macromoléculas em campo elétrico dependem da porosidade do gel. Géis de poli(acrilamida) são formados por copolimerização de acrilamida e Bis-acrilamida (Bis) na presença de persulfato de amônia e tetrametiletilenodiamina (TEMED). O diâmetro dos poros do gel é função das concentrações de acrilamida e Bis. A presença de Bis ocasiona durante a polimerização, uma reticulação como consequência das ligações de moléculas de poli(acrilamida), essa reticulação forma os poros (BRUNE et al., 1998)

Na eletroforese por sistema de SDS-PAGE é aplicado o estudo de proteínas desnaturadas por aquecimento na presença de SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol, visando à determinação do peso molecular de proteínas, empregam-se, comumente, géis com gradiente de concentração, na faixa de 5% a 20% de acrilamida. Nesse caso as separações se dão segundo o peso molecular e a migração é consequência tão somente das cargas negativas do SDS, causando efeito de peneiramento molecular. Quanto maior a molécula, menor a sua mobilidade (BRUNE et al., 1998). As revelações das bandas de proteínas podem ser realizadas por Azul-brilhante-de-coomassie (CHRAMBACH e RODBARD, 1971).

O termo "blotting" refere-se à transferência de amostras biológicas a partir de um gel para uma membrana e a sua subsequente detecção na superfície da membrana. *Western blotting* foi introduzido por Towbin et al., (1979) e trata-se de uma imunotransferência de detecção pois um anticorpo primário é usado para detectar especificamente os seus alvos antigênicos sendo utilizado atualmente como uma técnica para análise de proteínas. Este método consiste na transferência de proteínas de um gel de acrilamida para uma lâmina imobilizante por eletrodifusão. O gel de eletroforese e a lâmina imobilizante encontram-se embutidos entre folhas de papel-filtro fixadas entre placas porosas. O pacote assim preparado encontra-se em meio tampão e entre eletrodos (SCHEIDTMANN, 1999).

Teixeira et al., (2012) infere que as proteínas de fase aguda aumentam em resposta a produção de mediadores químicos liberados pelos macrófagos e leucócitos durante processos inflamatórios e infecciosos (KENT, 1992). Assim, as proteínas de fase aguda refletem a gravidade da reação inflamatória, podendo auxiliar no diagnóstico e prognóstico, bem como no entendimento de mecanismos patogênicos de doenças (GODSON et al., 1996).

Proteínas de fase aguda a ceruloplasmina, a transferrina, a albumina, a haptoglobina e a glicoproteína ácida foram identificadas por Teixeira et al. (2008) e Patelli et al. (2008) trabalhando com ratos Wistar e caprinos, ambas as espécies, infectadas experimentalmente

com a mesma cepa de *T. evansi* e identificaram sete e seis proteínas de fase aguda, respectivamente. A maioria das proteínas de fase aguda são glicoproteínas sintetizadas pelos hepatócitos como consequência de injúrias, traumatismos ou infecções teciduais (BAUMANN e GAULDIE, 1994).

Yadav et al., (2013) identificou antígenos imunodominantes para *T. evansi* em equinos, de 62 a 66 kDa, 52 a 55 kDa e 41 a 43 kDa através do imunoblot.

De acordo com Teixeira et al., (2012) em bovinos inoculados com *T. evansi*, vinte e seis proteínas com pesos moleculares entre 20 a 245 kDa foram encontradas porém, só oito identificadas nominalmente (imunoglobulina A, ceruloplasmina, transferrina, albumina, imunoglobulinas G de cadeia pesada e de cadeia leve, haptoglobina e glicoproteína ácida), e, para as demais proteínas foram obtidos apenas os pesos moleculares. Passos (2004) sugere que proteínas não identificadas nominalmente são produtos oriundos da degradação dos parasitos. Portanto, o número de frações protéicas em animais infectados com *T. evansi* parece não ter correlação direta com a resposta imunológica ao parasito, mas, possivelmente às diferenças de resposta de cada espécie animal a estímulos semelhantes.

### **2.5.3 Testes Moleculares**

#### **2.5.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

Técnicas como a PCR tiveram uma considerável contribuição na identificação, caracterização e diagnóstico de tripanosomas em diversos níveis taxonômicos com precisão e confiabilidade (DESQUESNES; DÁVILA, 2002). Segundo Silva et al., (2002), esta técnica apresenta alta especificidade e permite detectar pequenas quantidades do parasito nas amostras (1 tripanosoma/mL de sangue). Embora tenham excelentes resultados, os testes por PCR não são satisfatórios para o uso em larga escala no campo uma vez que exigem alto custo em laboratórios bem equipados, pessoal treinado e reagentes (DÁVILA et al., 2003).

Desde os anos 80, técnicas baseadas na identificação do DNA de tripanosomas têm contribuído com o diagnóstico parasitológico (DESQUESNES e DÁVILA, 2002). Diversas sequências de DNA já foram investigadas como possíveis alvos para o diagnóstico das tripanossomíases, especialmente os genes de multi-cópias, como mini-exon, mini-círculos e o DNA satélite nuclear dos mini-cromossomos, sequências curtas e altamente repetitivas (DESQUESNES; DÁVILA, 2002; VENTURA et al., 2001).

Porém, o método do PCR usando iniciadores: espécie ou gêneros específicos e iniciadores aleatórios constitui uma potente ferramenta de diagnóstico (MAJIWA et al., 1993).

Masake et al., (1997) desenvolveram um novo par de iniciadores para diagnóstico (ILO1264, ILO1265) que se anelam a uma região genômica do *T. vivax* que codifica um antígeno de 8kDa, e segundo os autores identificariam um maior número de genótipos de *T. vivax* de diferentes regiões.

Em 2001, Ventura et al. analisaram as sequências SL (*spliced-leader*) do RNA de amostras brasileiras de *T. vivax*, definindo o grau de parentesco entre isolados americanos e africanos, e a posição taxonômica dos isolados brasileiros. A partir disso, desenvolveram iniciadores, denominados TviSL 1 e 2 que amplificam o mini-exon de *T. vivax* – tornando o método de diagnóstico molecular mais específico e sensível. Posteriormente, em estudo feito por Cortez et al. (2006), estes iniciadores amplificaram o DNA de todos os isolados provenientes da América do Sul e do Oeste da África.

Segundo Ventura et al. (2001), os primers direcionados ao diagnóstico molecular de *T. vivax* amplificam um produto de 210pb (pares de bases), sendo que as amostras que amplificam um produto menor que 210pb não são positivas para *T. vivax*.

Bezerra et al. (2008) estudaram a anatomopatologia de testículos e epidídimos de ovinos experimentalmente infectados por *Trypanosoma vivax*. Os animais foram orquiectomizados 30 dias após a infecção. No presente trabalho foi possível a detecção nos tecidos testicular e epididimário, através reação em cadeia da polimerase (PCR), de uma região de 177 bp (pares de bases) do domínio catalítico do gene da Catepsina L, específica para *T. vivax* e conservada entre o diferentes isolados do parasita nos tecidos testicular e epididimário. Desta forma, comprovou-se a participação do parasita no mecanismo etiopatogênico das lesões, onde pela primeira vez, relatou-se a identificação de *T. vivax* no parênquima de órgãos reprodutivos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar se *Trypanosoma vivax* e antígenos podem ser detectados no plasma seminal de bovinos infectados experimentalmente.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a presença de DNA de *T. vivax* no plasma seminal de bovinos por PCR
- Identificar a presença de proteínas de *T. vivax* no plasma seminal de bovinos infectados experimentalmente por eletroforese SDS-PAGE e alvos antigênicos por *Western blotting*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos foram conduzidos no Centro de Reprodução Animal situado no Hospital Veterinário de Uberaba (HVU) e no Laboratório de Imunologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

### 4.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

#### 4.2.1 Infectados com tripomastigotas de *T. vivax*

Quatro bovinos, machos, mestiços a girolando, com idade entre 14-18 meses, e negativos para *T. vivax* nos testes parasitológicos (direto, microhematócrito e *Buffy coat*), exames sorológicos (RIFI) e molecular (PCR) foram inoculados por via SC e IM com 2mL de sangue contendo  $2 \times 10^6$  tripomastigotas de *T. vivax* estimados de acordo com o método de Brener (1961). Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em experimentação animal da Uniube sob o processo nº CEEA 01/ 2013 (ANEXO I).

A amostra de *T. vivax* usada no experimento foi cedida pelo Professor Fernando Paiva do Departamento de Patologia, da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande-MS (Isolado de Aquidauana) proveniente de um surto em bovinos da região. As amostras de *T. vivax* ficaram armazenadas em Nitrogênio Líquido (-196° C).

Os animais foram mantidos em piquetes no Hospital Veterinário da Universidade de Uberaba, alimentados com forragem verde (*Panicum maximum* e feno) e água *ad libitum* durante todo o período experimental.

Foram realizados tratamentos com antiparasitário mosquicida de aplicação *pour on* a base de Diazinon 30% e Clorpirifós 10% (EXPERT® MSD Saúde Animal) nos animais no dia 0, 18°, 45° e 75° dpi.

Os animais foram acompanhados em relação à parasitologia por 90 dias e quinzenalmente amostras de sêmen foram obtidas.

Durante o período experimental, os bovinos que apresentaram anemia (abaixo de 22%) e/ou alterações clínicas como debilidade, apatia, ataxia, sonolência, foram tratados com aceturato de diminazene (Ganaseg plus® Novartis), conforme recomendação do fabricante.

#### 4.2.2 Não infectados por *T. vivax*

Três bovinos, machos, girolando, com idade entre 18-20 meses, e negativos para *T. vivax* nos testes parasitológicos (direto, *Buffy coat*), sorológico (RIFI) e molecular (PCR). Amostras de sangue e sêmen foram colhidas para serem utilizadas como controle negativo.

Os animais foram mantidos em piquetes no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro (IFTM) alimentados com forragem verde (*Panicum maximum* e feno) e água *ad libitum*.

#### 4.3 AVALIAÇÃO PARASITOLÓGICA DOS ANIMAIS INFECTADOS

Para a avaliação parasitológica, foram colhidos de cada animal, 4 mL de sangue por venopunção da jugular, utilizando agulhas 25 x 0,8mm (BD<sup>®</sup>) em tubos *vacutainer* (Vacuette<sup>®</sup>) contendo ácido etilenodiaminotetracético disódico (EDTA) a 10%.

A parasitemia foi avaliada pelo BCT para detectar a presença da forma tripomastigota (MURRAY, 1977). A técnica consistiu no preenchimento de tubo capilar de vidro para cada amostra de sangue com anticoagulante, centrifugação a 10000g (Celm<sup>®</sup> MH) por cinco minutos. Após, foi realizado o esfregaço a partir da amostra obtida de um capilar, quebrando o tubo na fração entre a camada líquida (plasma) e a camada leucocitária. Posteriormente o esfregaço foi corado com Panótico Rápido (Laborclin<sup>®</sup>). A partir dos esfregaços sanguíneos corados, a estrutura geral das formas tripomastigotas pode ser observada em aumento 1000x por microscopia óptica (NIKON<sup>®</sup> Eclipse E200).

A determinação quantitativa de tripomastigotas pelo exame direto do sangue periférico foi realizada pelo método de Brener (1961), realizando a contagem de tripanosomas no sangue periférico dos animais positivos no teste do BCT. Foram pipetados 5 $\mu$ L de sangue e colocados entre lâmina e lamínula (22x22mm). Foi realizado contagem dos tripomastigotas em 50 campos microscópicos em aumento de 400x (Nikon<sup>®</sup> Eclipse E200). O número de parasitos observados foi multiplicado 80, obtendo-se o número de tripanosomas em 5 $\mu$ L de sangue. O resultado foi transformado em tripomastigotas/ $\mu$ L).

#### 4.4 OBTENÇÃO DO PLASMA SEMINAL DOS ANIMAIS INFECTADOS E NÃO INFECTADOS POR *T. vivax*

As coletas de amostras de sêmen dos animais infectados experimentalmente foram realizadas nos dias 1°, 15°, 30°, 45°, 60°, 75°, 90° pós-inoculação (dpi) com eletroejaculador Autojac® (Neovet) (12 V e 200-500 mA) sendo necessários em torno de 10-15 estímulos com intervalo de três segundos entre eles para a ejaculação. O sêmen foi depositado em tubos Falcon® (15ml), envoltos com papel alumínio para proteção contra exposição a luz solar direta e armazenamento até o processamento das amostras. Dos animais não infectados foram obtidas apenas uma amostra de sêmen.

Para obtenção do líquido seminal, o ejaculado foi acondicionado em tubos falcon de 15ml, centrifugado a 1200 g por 10 minutos em centrífuga Excelsa®. Posteriormente, foi adicionado inibidor de protease Complete Ultra Tablets, Mini, Easy Pack® (ROCHE) na proporção de 1:1 para realização da eletroforese e *Western blotting*.

Amostras do líquido seminal também foram conservadas com guanidina na proporção de 1:1 para a realização da PCR.

As amostras conservadas com inibidor de protease e guanidina foram acondicionadas em freezer (-20°C) até o momento de realização dos experimentos.

#### 4.5 AVALIAÇÃO PELA PCR

A PCR foi realizada a partir da extração do DNA de 200µl das amostras de plasma seminal através do Min Elute Gel Extraction Kit (Qiagen®).

Após a quantificação do DNA por espectrofotometria (Nanoplus® 2000) a amplificação pela técnica de PCR, foi realizada utilizando os iniciadores correspondentes às regiões intergênicas dos genes *Spliced-leader* de 210 pares de bases (VENTURA et al 2001).

**Primer 1:** TviSL1 – 5' GCT CTC CAA TCT TAA CCC TA 3' (VENTURA et al., 2001).

**Primer 2:** TviSL2 – 5' GTT CCA GGC GTG CAA AGC TC 3' (adaptado de VENTURA et al., 2001).

As ampliações foram realizadas segundo a metodologia de Ventura et al. (2001) e conduzidas em 50 µl de mistura de reação, contendo: 25µL de Taq (Go Taq® Green Master Mix 2x), 0,6µL de Primer 1(IDT®) a 1x e 0,6µL de Primer 2 (IDT®) a 1x para cada poço. Adicionou-se volume variável da amostra mas mantendo-se a constante de 25 ou 50 ng de DNA e o restante de água (nuclease free water®) até completar 50µL, que é o volume final da reação conforme recomendação do fabricante.

As reações foram efetuadas em um termociclador de DNA XP Cyler Bioer por 35 ciclos. Cada ciclo consistiu de um passo de desnaturação (94°C por 1 minuto), um passo de anelamento (65°C por 2 minutos), um passo de extensão (72°C por 3 minutos), seguido de 10 minutos de extensão final a 72°C. Para certificar-se de que não houve contaminação da PCR, como controle branco foi adicionado água ao invés de DNA, executando-se o mesmo procedimento.

Iniciadores foram utilizados na amplificação do domínio catalítico do gene Catepsina-L de 177 pares de bases na identificação do *T. vivax* no plasma seminal de bovinos. De acordo com metodologia descrita por Bezerra et al.,(2008) os iniciadores foram:

**Primer 3:** Tvi2 (5' GCC ATC GCC AAG TAC CTC GCC GA 3') (BEZERRA et al 2008)  
**Primer 4:** DTO156 (5' TTAGAATTCCCAGGAGTTCTTGATGATCCAGTA3')(BEZERRA et al 2008)

As reações foram realizadas conforme Bezerra et al., (2008) com modificações. Foram utilizados 25 µl de reação onde cada poço recebeu um mix contendo: 12,5µl Taq (Go Taq® Green Master Mix 2x), 0,3µl de Primer 3 (IDT) a 1x, 0,3µl de Primer 4 (IDT) a 1x. Além desse mix é adicionada amostra suficiente para 25 ng de DNA e o restante de água (nuclease free water) até completar 25µL correspondente ao volume final da reação conforme recomendação do fabricante.

As reações foram efetuadas em um termociclador de DNA XP Cyler Bioer por 39 ciclos.

Cada ciclo consistiu de um passo de desnaturação a (94°C por 1 minuto), um passo de anelamento (62°C por 1min.), e extensão (72°C por 1min.), além de uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

Posteriormente as amostras foram aplicadas em um gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio, onde o gel foi imerso em solução de TBE a 1x e a corrida foi realizada a 100v por aproximadamente 4 horas. Utilizou-se o padrão Gene ruler 50 bp DNA ladder® (INVITROGEN).



As visualizações das amplificações dos DNA foram realizadas em transluminador em Benchtop UV Transilluminator<sup>®</sup>(UVP) em campo escuro a 302 nm UV. As soluções utilizadas na PCR estão descritas no ANEXO II.

#### 4.6 DOSAGEM DE PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL DOS ANIMAIS INFECTADOS E NÃO INFECTADOS POR *T. vivax*

A quantificação de proteínas em cada amostra de plasma seminal foi necessária para a padronização da quantidade de proteína a ser aplicada e realização da eletroforese. Após o descongelamento das amostras em Banho Maria a 37°C, as proteínas foram dosadas utilizando o Kit colorimétrico de Proteínas Totais (Labtest<sup>®</sup>) e a leitura realizada em espectrofotômetro automatizado Bioplus 2000<sup>®</sup> com comprimento de onda 545nm conforme recomendação do fabricante.

#### 4.7 DETERMINAÇÃO DO PERFIL ELETROFORÉTICO SDS-PAGE DO PLASMA SEMINAL DOS ANIMAIS INFECTADOS E NÃO INFECTADOS POR *T. vivax*

As preparações dos plasmas seminais foram submetidas à eletroforese de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970), com modificações.

Os géis foram montados entre placas de vidro (160 x 180 mm), separadas por espaçadores de 0,75 mm de espessura (BIO-RAD<sup>®</sup>). Os géis de separação e concentração foram utilizados na concentração de 12,5% e a 4,0% respectivamente.

O plasma seminal foi misturado com igual volume de tampão de amostra completo e aquecido por três minutos em Banho-Maria (80°C). A amostra aplicada por canaleta múltipla foi de 30 µg proteína para os géis corados pelo azul de Coomassie. A corrida foi realizada utilizando-se a voltagem de 60 V no gel de empilhamento e de 120 V no gel de separação.

Em todas as eletroforeses, foram incluídos marcadores padrões com os respectivos pesos moleculares (BIO-RAD<sup>®</sup>): **High:** Miosina (202, 4 kDa), β-galactosidase (116 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovo albumina (47,1 kDa), **Low:** fosforilase B (101 kDa), albumina bovina (72 kDa), ovo albumina (47,8 kDa), anidrase carbônica (33,9), inibidor de tripsina de soja (26,8 kDa), Lisozima (17,6 kDa).

As soluções usadas na eletroforese estão detalhadas no ANEXO III.

#### **4.7.1 Coloração pelo azul de Comassie**

Após eletroforese e rápida lavagem em água destilada, o gel foi transferido para uma solução corante, contendo 0,25% de azul Comassie R-250 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Logo após, foi feita a descoloração, utilizando-se uma solução contendo metanol, ácido acético e água destilada até se obter a visualização das bandas coradas. Após o aparecimento das bandas a interrupção da reação é feita utilizando água destilada. As soluções usadas na coloração pelo azul de comassie estão detalhadas no ANEXO IV.

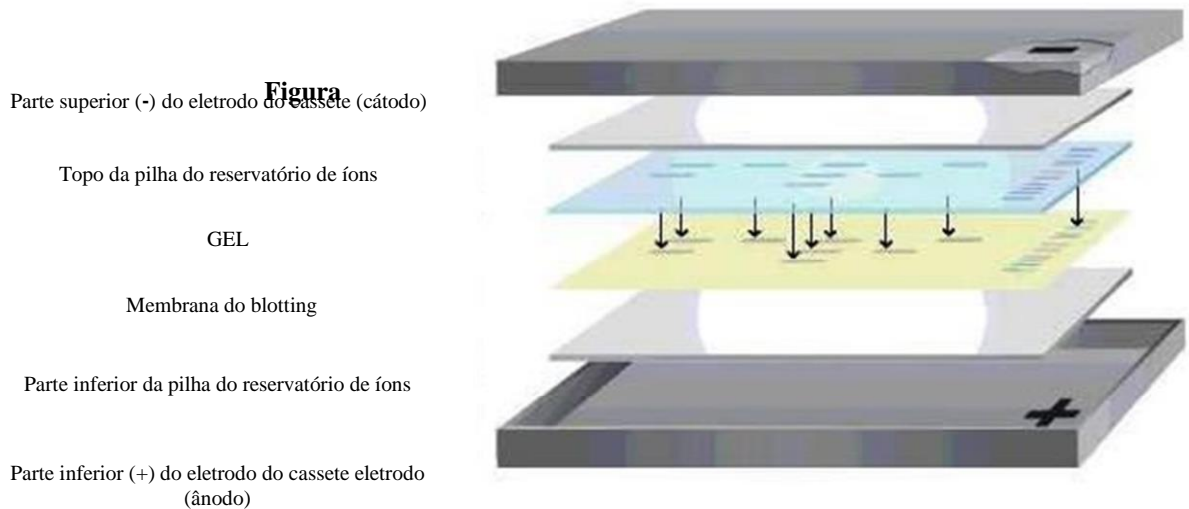
#### **4.7.2 Cálculo dos pesos moleculares aparentes e migração das bandas do perfil eletroforético**

Para calcular os pesos moleculares obtidos na eletroforese, foi realizada a medição em milímetros, onde foram medidas as migrações realizadas pelas bandas de proteínas também em milímetros. Os dados obtidos foram tabulados em planilhas do Microsoft Excel<sup>®</sup> versão 2007 e os pesos calculados por gráfico de dispersão.

#### **4.8 WESTERN BLOTTING**

A eletrotransferência das proteínas para as membranas de nitrocelulose foi realizada de acordo com metodologia descrita por Towbin et al., (1979), com modificações em equipamento Trans-blot turbo<sup>®</sup> (semi seco) (BIO- RAD<sup>®</sup>).

Após a eletroforese os géis foram retirados das placas de vidros, enxaguados com água destilada e fez-se a montagem dos sanduíches na seguinte ordem: Papel de filtro 10,7x 8,5 cm, membrana de nitrocelulose, gel, papel de filtro conforme a Figura 2.



**Figura 2: Montagem adequada de sanduíche do blotting**

**Fonte: Adaptado de Trans blot turbo® (2013).**

Foram utilizados papéis de filtro e membrana umedecidos em tampão de transferência (Trans-Blot Turbo® Mini Nitrocellulose Transfer Packs).

Em seguida começou a transferência segundo a recomendação do fabricante do equipamento Trans-blot Turbo® (10V por 30min).

Após a transferência as membranas de nitrocelulose foram colocadas em placas de petri contendo PBS-Tween/leite em pó 5% para realização do bloqueio dos sítios remanescentes para interações com proteínas por 15 min (sob agitação a temperatura ambiente) e posteriormente lavadas com PBS-T/0,5% duas vezes rápidas e três vezes de cinco minutos sob agitação em agitador orbital, KASVI®(K40-3020) a 60 RPM e colocadas entre papel A4 cortado no tamanho das membranas e embaladas com papel alumínio e armazenadas a -20°C.

Os géis foram colocados em solução corante (comassie) por 15 min sob agitação lenta KASVI®(K40-3020) a 40 RPM e lavados posteriormente com água destilada e submetidos à solução descorante (metanol; ácido acético e água destilada) para comprovar a eficiência da transferência.

Para a realização da reação imunológica utilizou-se soros controle negativo e positivo (soro hiperimune) gentilmente cedidos pela Professora Joely F. Bittar. Os soros controle positivo e negativo foram diluídos 1:40 em PBS-T/ leite em pó 0,5%, adicionados as membranas contendo os plasmas seminais provenientes dos animais negativos ou positivos e

incubados por 2 h, à temperatura ambiente, sob agitação em agitador orbital KASVI®(K403020) a 60 RPM.

Posteriormente, as membranas denitrocelulose foram lavadas rapidamente em PBS-T por duas vezes e por mais três vezes com intervalos de cinco minutos sob agitação e incubadas com conjugado anti IgG bovino peroxidase® (SIGMA) diluído 1:2500 em PBS-T/ leite em pó 0,5% por uma hora a temperatura ambiente, sob agitação em agitador orbital KASVI®(K40-3020).

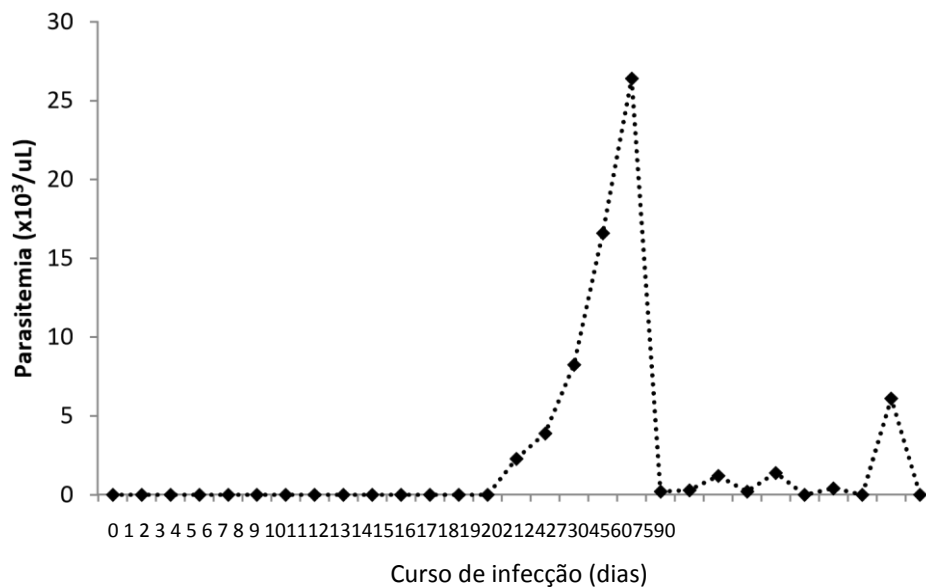
Após este período, as membranas foram lavadas como descrito acima, incubadas até a visualização das bandas com a solução cromogênica SIGMAFAST® 3,3'Diamino-benzidina (DAB) tabletes (SIGMA), utilizando um comprimido para 5 ml de água destilada até a sua completa diluição, após a homogeneização adicionou-se um comprimido de ureia que acompanha o mesmo kit.

A reação foi interrompida com água destilada e as membranas foram colocadas entre papéis de filtro para secagem.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ANÁLISE DA PARASITEMIA

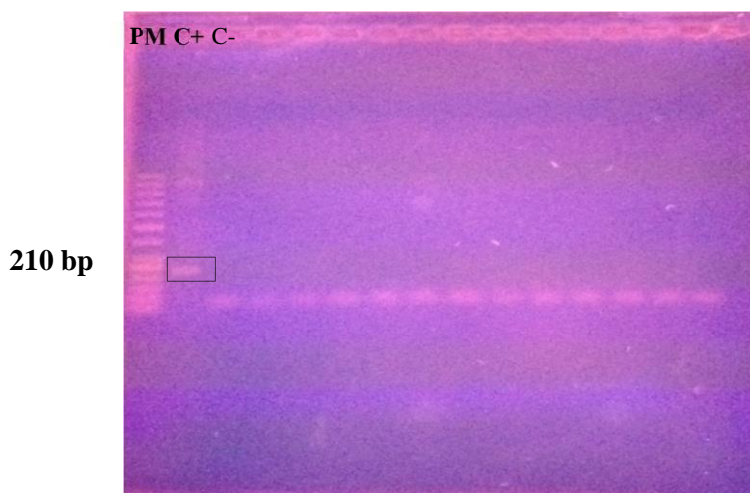
Na avaliação parasitológica dos animais infectados experimentalmente com *T. vivax* pode-se observar tripomastigotas no sangue a partir do 14º dpi ( $2,28 \times 10^3$  tripomastigotas/ $\mu$ l) e pico de parasitemia no 18º dpi ( $26,4 \times 10^3$  tripomastigotas/ $\mu$ l). Devido à debilidade e/ou anemia dos animais houve necessidade de tratamento com aceturato de diminazene (3,5 mg/kg) no 18º dpi. Posteriormente foi detectada discreta parasitemia no 20º dpi ( $0,29 \times 10^3$  tripomastigotas/ $\mu$ l), 27ºdpi ( $1,4 \times 10^3$  tripomastigotas/ $\mu$ l), 45º dpi ( $0,42 \times 10^3$  tripomastigotas/ $\mu$ l), 75 dpi ( $6,12 \times 10^3$  tripomastigotas/ $\mu$ l). Nos outros momentos de análise (30, 60 e 90) houve ausência de parasitemia (Figura 3).



**Figura 3.** Determinação da parasitemia durante a infecção experimental por *T. vivax* nos bovinos púberes.

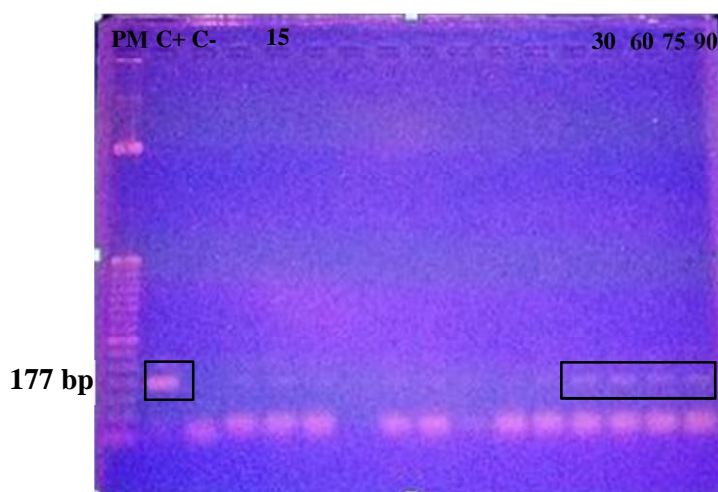
## 5.2 PCR

Os primers TviSL1 e TviSL2 relacionados ao segmento *Spliced-leader*, de 210 bp, não permitiram a identificação de *T. vivax* nas amostras de plasma seminal dos animais infectados durante o período experimental (Figura 4).



**Figura 4:** Gel de Eletroforese (agarose 1,5%, corado com brometo de etídio 0,5 mg amostras de DNA extraídas de plasma seminal (PM) Marcador molecular DNA Ladder (Invitrogen®); (C+) controle positivo amostra de *T. vivax* isolada de surto em Veríssimo(C-) Controle negativo (água destilada).

Os primers Tvi2 e DTO156 relacionados a Catalepsina-L permitiu amplificar 177bp do *T. vivax* no plasma seminal dos animais infectados nos momentos 15°, 60°, 75° e 90° dpi (Figura 5).



**Figura 5:** Gel de Eletroforese (agarose 1,5%, corado com brometo de etídio 0,5 mg/ml), amostras de DNA extraídas de plasma seminal (PM) Marcador molecular DNA Ladder (Invitrogen®); (C+) controle positivo amostra de *T. vivax* isolada de surto em Veríssimo; (C-) Controle negativo (água destilada) 1 (30° dpi) 2(60° dpi) 3 (75° dpi) 4(90° dpi).

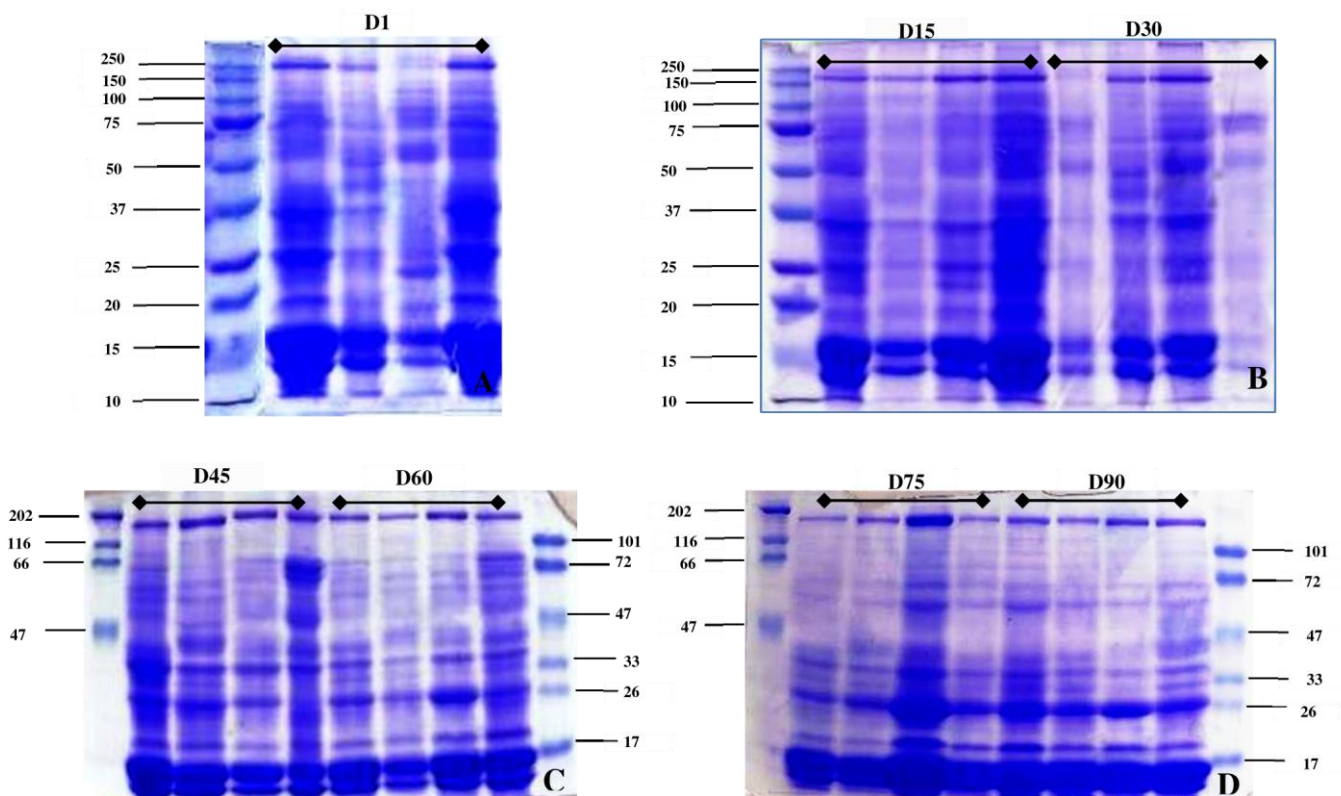
### 5.3 PERFIL ELETROFORÉTICO

A análise do perfil eletroforético do plasma seminal dos bovinos infectados experimentalmente pode-se observar bandas de proteínas de peso molecular variando de 186,68 a 7,7 kDa descritas no Anexo VI.

No 1° e 15° dpi pode-se observar respectivamente 48 bandas de proteínas de 131,9 a 11,44 kDa e 56 de 131,9 a 9,16 kDa. (Figura 6A)

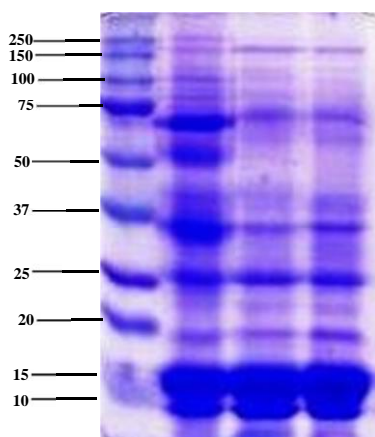
No 30° e 45° dpi pode-se observar 44 bandas de proteínas de 167,35 a 7,73 kDa e de 50 bandas variando de 186,68 a 9,94 kDa (Figura 6B).

No 60°, 75° e 90° dpi notou-se 44 bandas de proteínas (147,48 a 10,47 kDa) 44(161,47 a 10,94 kDa) e 42 proteínas de 153,17 a 10,66 kDa, respectivamente (Figura 6C, D).



**Figura 6:** Eletroforese SDS-PAGE do plasma seminal de bovinos experimentalmente infectados por *Trypanosoma vivax* no 1° dpi (A), 15°-30°dpi (B), 45°-60° (C) e 75°- 90°dpi (D).

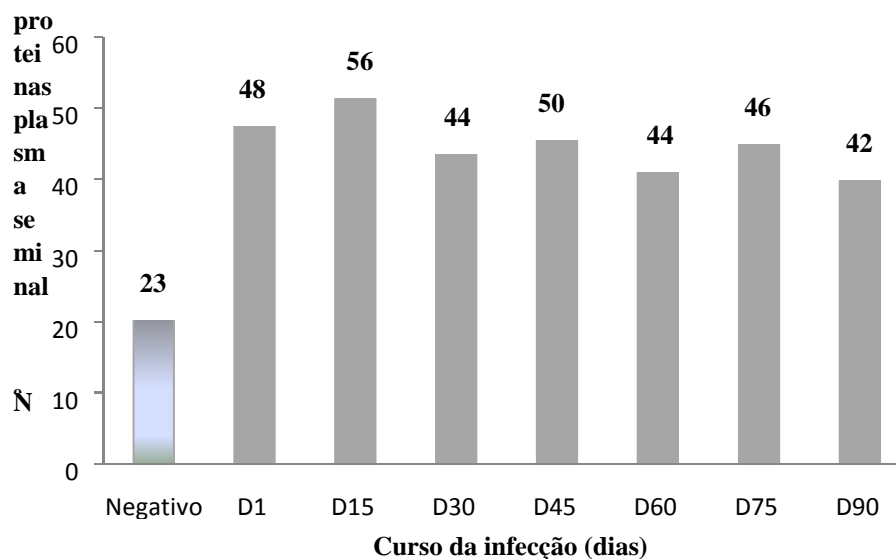
Nos animais não infectados foram observadas 23 bandas de proteínas com peso molecular variando de 130,65 a 10,17 kDa conforme apresentado na Figura 7.



**Figura 7:** Bandas de proteínas obtidas do plasma seminal de bovinos não infectados submetidos a SDS-PAGE.

Nos animais experimentalmente infectados o menor peso molecular observado foi 7,73 kDa e nos animais não infectados o menor peso molecular foi de 10,17 kDa. Já o maior peso molecular encontrado nos animais infectados experimentalmente foi de 186,68 kDa e nos animais não infectados foi de 130,65 kDa (Anexo VI)

Na figura 8 pode-se visualizar o número de bandas de proteínas observadas nos animais não infectados e experimentalmente infectados durante o período experimental.



**Figura 8:** Número de bandas proteicas observadas no perfil eletroforético do plasma seminal dos animais infectados experimentalmente e não infectados (negativos).

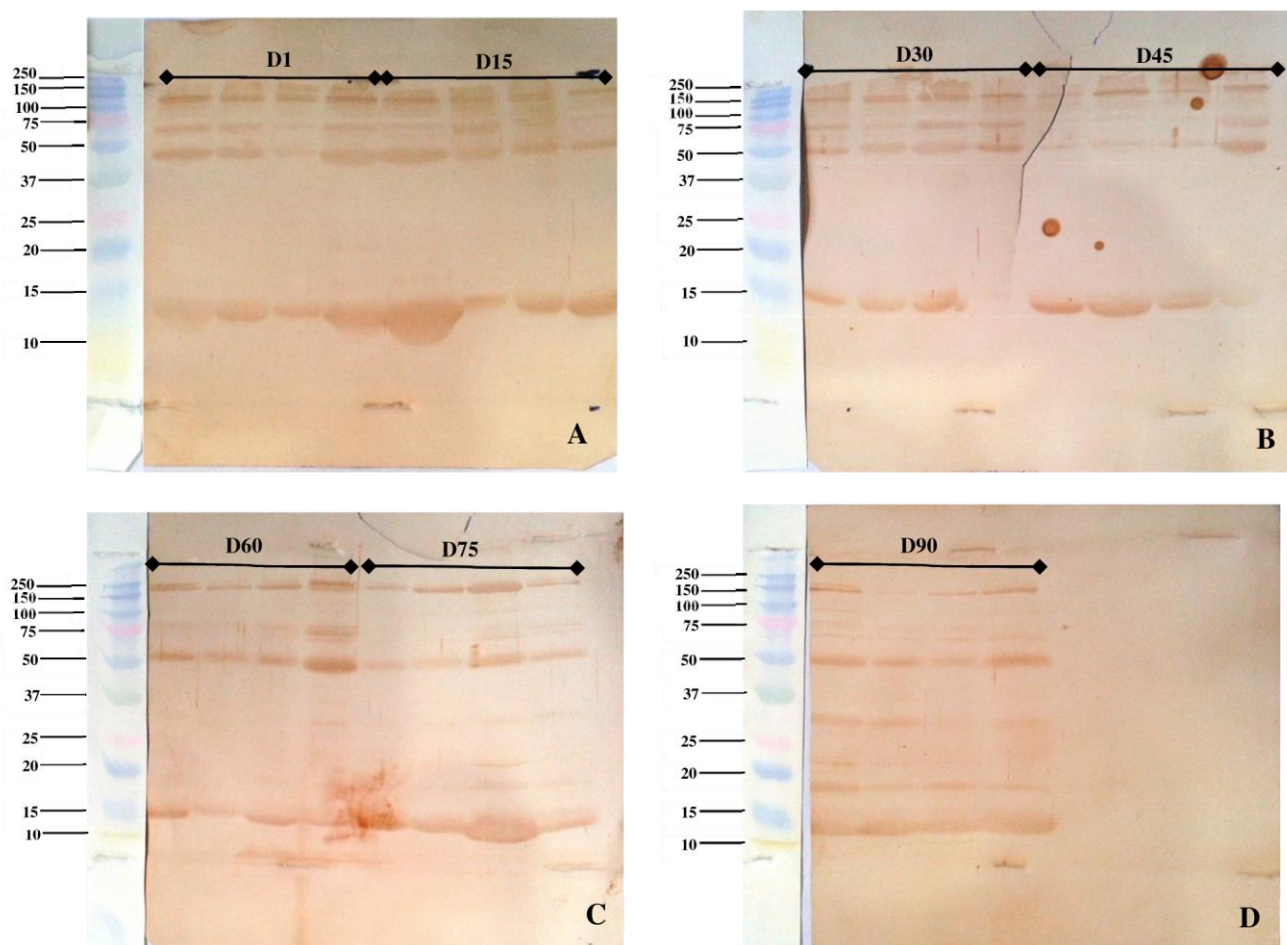


## 5.4 PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO PLASMA SEMINAL DE BOVINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE

### 5.4.1 PELO SORO HIPERIMUNE

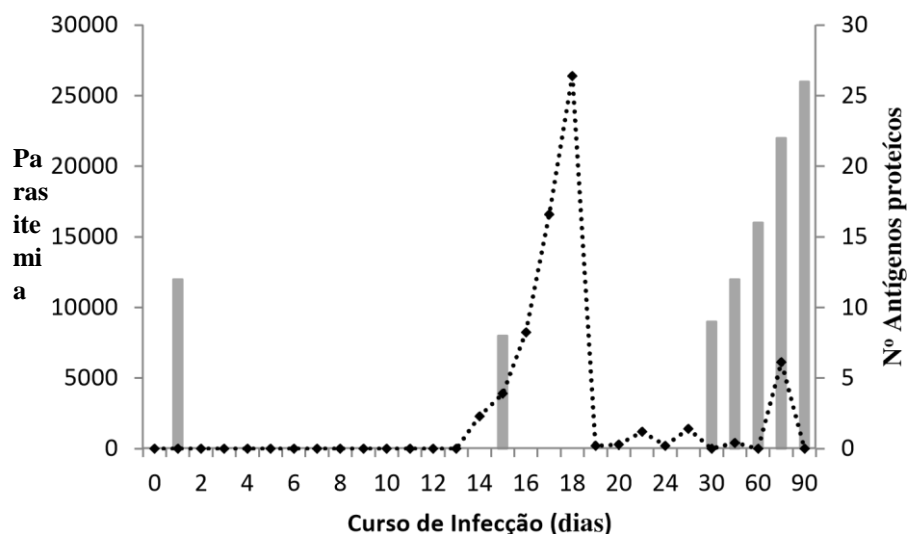
Após a incubação do plasma seminal com o soro hiperimune pode-se observar que no 1º dpi os animais apresentaram 12 bandas de proteínas com peso molecular variando de 108,1 a 11,8 kDa, no 15º dpi apresentaram 8 bandas de proteínas variando de 108,1 a 12,6 kDa (Figura 9A). No 30º dpi e 45º dpi apresentaram 9 bandas de proteínas de 115 a 12,7 kDa e 12 proteínas variando de 115 a 11,9 kDa respectivamente (Figura 9B).

No 60º dpi apresentaram 16 bandas de proteínas de 125,6 a 10,2 kDa e no 75º dpi apresentaram 22 bandas de proteínas variando de 125,6 a 8,95 kDa (Figura 9C). No 90º dpi apresentaram 26 bandas de proteínas de 131,8 a 9,9 kDa (Figura 9D).



**Figura 9:** Identificação de antígenos proteicos em plasma seminal de bovinos experimentalmente infectados. 1º e 15º dpi (9 A), 30º e 45º dpi (9B), 60º e 75º dpi (9C) e 90º dpi (9D).

Pode-se observar que o número de antígenos proteicos foi maior na fase crônica da doença (Figura 10).



**Figura 10:** Análise da atividade parasitária e perfil de antígenos proteicos dos animais experimentalmente infectados por tripomastigotas de *T. vivax*. A linha pontilhada demonstra a parasitemia e as colunas o perfil de antígenos proteicos detectados durante os 90 dias de infecção.

Os antígenos protéicos identificados no plasma seminal dos animais infectados estão apresentados no Quadro 1.

Os antígenos proteicos de peso molecular variando de 108,12 a 57,52 e de 13,55 a 11,87 foram observados durante todo o período experimental. E os de 131,82 a 110,05, de 55,78 a 16,79 e de 11,51 a 8,95 apareceram após o 30º dpi e permaneceram até o 90º dpi, correspondendo a fase crônica da doença.

PM	D1	D15	D30	D45	D60	D75	D90
131,82							
125,55							
124,12							
117,90							
116,87							
115,03							
110,71							
110,05							
108,12							
107,59							
103,97							
103,62							
101,51							
100,63							
97,57							
95,30							
94,13							

PM	D1	D15	D30	D45	D60	D75	D90
91,68							
89,47							
88,04							
86,51							
86,09							
84,00							
82,35							
81,46							
80,85							
78,86							
77,03							
76,70							
75,92							
72,22							
71,29							
67,39							
66,95							
65,26							
63,04							
61,27							
60,30							
59,04							
58,96							
57,52							
56,78							
55,44							
47,40							
43,11							
42,03							
35,70							
35,09							
33,04							
31,11							
29,56							
27,76							
24,45							
23,03							
22,99							
21,68							
19,22							
19,04							
18,10							
17,88							
17,04							
16,79							
13,55							
13,47							
13,05							
12,68							
12,65							
12,62							
12,26							
11,86							
11,87							
11,51							
10,81							
10,15							

10,53							
9,92							
9,53							
8,95							

**Quadro 1:** Antígenos protéicos identificados no plasma seminal de bovinos infectados experimentalmente com *Trypanosoma vivax* e reconhecidas pelo soro hiperimune.

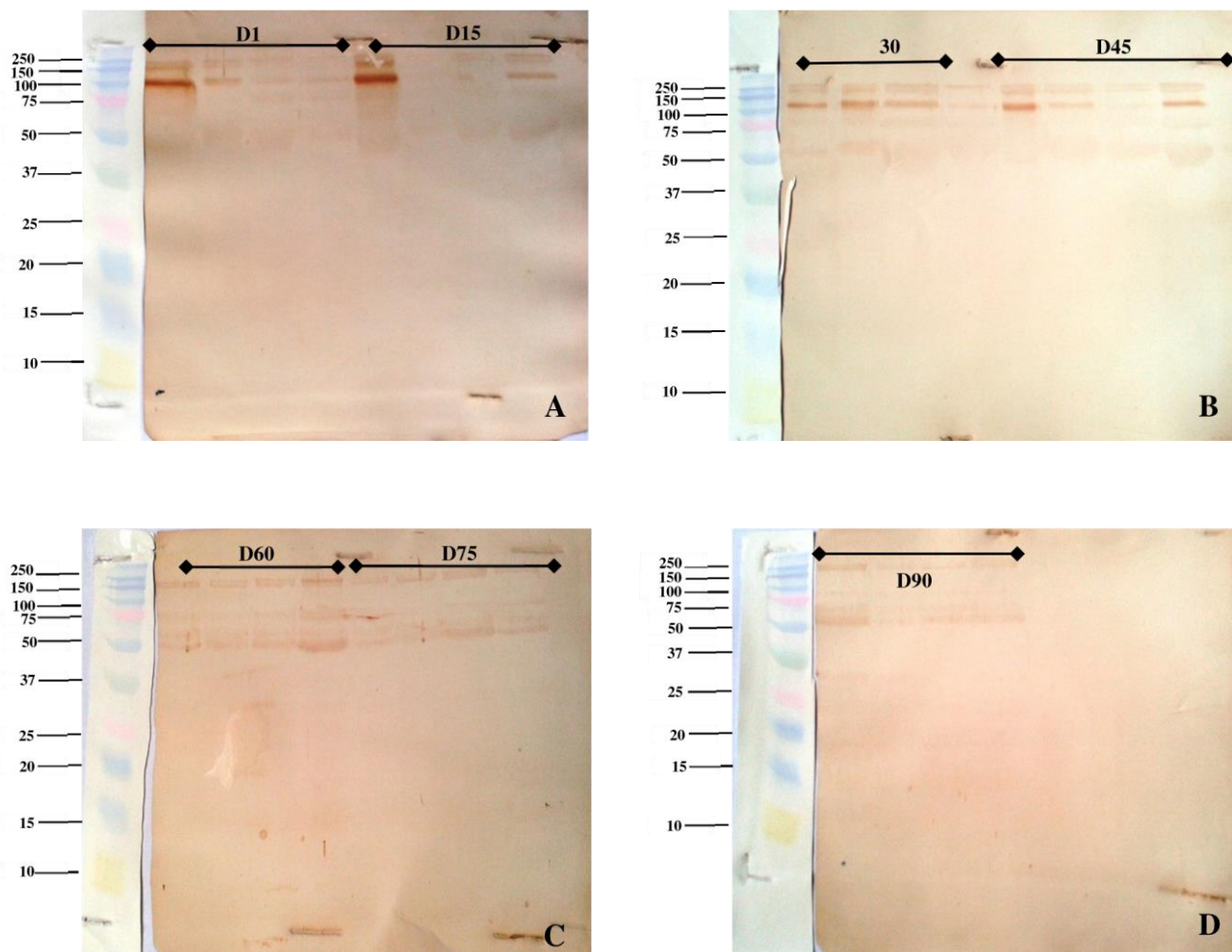
#### 5.4.2 PELO SORO NEGATIVO

As bandas de proteínas reconhecidas pelo soro de animal negativo para *T. vivax* estão apresentadas no Quadro 2. Pode-se notar a identificação de bandas de proteínas de 115,70 a 55,87 kDa e o não reconhecimento de bandas de proteínas de baixo peso molecular, inferior a 55,87 kDa.

PM	D1	D15	D30	D45	D60	D75	D90
115,70							
113,16							
113,11							
112,24							
108,71							
107,55							
107,52							
106,76							
102,26							
102,15							
101,55							
97,24							
92,46							
91,89							
87,92							
87,40							
84,71							
83,60							
83,25							
79,49							
79,09							
79,08							
75,59							
75,15							
71,87							
71,40							
70,26							
67,84							
64,74							
64,45							
62,02							
61,79							
61,59							
61,24							
58,76							
55,87							

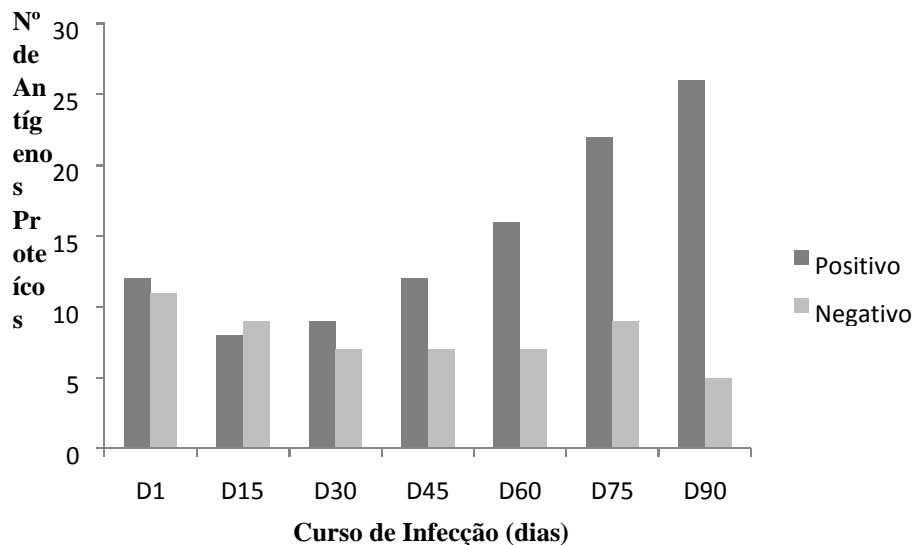
**Quadro 2:** Bandas de proteínas identificadas no plasma seminal de bovinos infectados experimentalmente e reconhecidas pelo soro negativo.

No 1º dpi observou-se bandas de proteínas de 113,1 a 55,9 kDa, no 15º dpi de 113,1 a 58,8 kDa (Figura 11A). No 30º dpi e 45º dpi apresentaram bandas de proteínas de 106,8 a 61,6 kDa e 112,2 a 61,6 kDa respectivamente (Figura 11B). No 60º dpi apresentaram bandas de proteínas de 113,2 a 61,2 kDa e 75º dpi foram observadas de 113,2 a 61,2 kDa (Figura 11 C). No 90º dpi apresentou bandas de proteínas de 115,7 a 62 kDa (Figura 11 D).



**Figura 11:** Identificação de bandas de proteínas do plasma seminal de bovinos não infectados pelo soro negativo para *T. vivax* no 1º e 15ºdpi (11 A), 30º e 45º dpi (11B), 60º e 75º dpi (11 C) e 90º dpi (11D).

Analisando o número de bandas de proteínas identificadas pelo soro negativo pode-se notar que no 1º, 15º, 30º, 45º, 60º, 75º e 90º dpi foram observados respectivamente 11, 9, 7, 7, 7, 9 e 5. A comparação entre os números de bandas de proteínas identificadas no plasma seminal de animais infectados experimentalmente frente ao soro negativo e hiperimune está apresentada na Figura 12.



**Figura 12:** Número de bandas de proteínas detectadas no plasma seminal dos animais infectados experimentalmente incubados com soro hiperimune e soro negativo.

### 5.5 BANDAS DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO PLASMA SEMINAL DE ANIMAIS NÃO INFECTADOS

Na análise do plasma seminal dos animais não infectados após incubação com soros hiperimune ou negativo foram reconhecidas bandas de proteínas de 130,80 a 20,10 kDa.

Após a incubação do plasma seminal dos animais não infectados com soro hiperimune observou-se o reconhecimento de 5 bandas de proteínas variando de 130,80 a 60,49 kDa. Quando o plasma seminal dos animais não infectados foi incubado com o soro negativo observou-se o reconhecimento de 7 bandas de proteínas de 130,80 a 20,10 kDa (QUADRO 3).

Proteínas plasma seminal dos animais não infectados	Soro negativo	Soro hiperimune
130,80		
79,67		
75,40		
63,92		
60,49		
23,71		
20,10		

**Quadro 3:** Bandas proteicas identificadas no plasma seminal de bovinos não infectados durante o período experimental e reconhecidas pelos soros negativos e soro hiperimune respectivamente.

As bandas de proteínas identificadas no plasma seminal de animais não infectados e infectados experimentalmente com *T. vivax* estão apresentadas no Anexo VII.

## 6 DISCUSSÃO

O curso da infecção por *T. vivax* depende de uma série de fatores, entre eles o hospedeiro (espécie, raça, idade), presença do vetor biológico ou mecânico e patogenicidade do inóculo. Segundo Osório et al., (2008), a parasitemia apresenta flutuações irregulares, até mesmo durante o dia o que corrobora com os achados no presente estudo, onde notou-se períodos de ausência (30, 60 e 90 dpi) e presença do parasita em esfregaço sanguíneo (14°, 15°, 45°, 75° dpi).

Neste estudo, o período pré-patente (14 dias) e pico de parasitemia (18° dpi) foi maior ao observado por Adamu et al. (2007), que realizou infecção experimental em seis touros zebus na Nigéria e foram identificadas as formas tripomastigotas de *T. vivax* no sangue de touros infectados dentro de 4-5 dias pós-infecção. O pico de parasitemia foi registrado seis dias após a infecção e os touros infectados permaneceram com parasitemia intermitente por 56 dias (curso do experimento), semelha aos achados deste estudo (90 dias). O período prépatente superior ao observado por Adamu et al. (2007), pode ser justificado pela amostra de *T. vivax* utilizada (isolado Aquidauana-MS) e ausência do vetor biológico (mosca tsé-tsé). E também ao estudo realizado por Souza e Serra-Freire (1987), onde numa infecção experimental em bovinos observaram-se períodos de incubação que variaram de dois a 31 dias, sendo que as parasitemias foram bastante flutuantes, inclusive com períodos de ausência de tripanosomas no sangue periférico que variou entre um e 58 dias.

A detecção do parasita nos tecidos normalmente é realizada por PCR por ser sensível e específica. Segundo Desquesnes, (1997) e Clausen et al., (1998) na fase aguda da infecção, tanto a PCR quanto as técnicas parasitológicas possuem sensibilidades semelhantes, mas na fase crônica da doença a PCR pode ser de três a quatro vezes mais sensível.

No presente trabalho a detecção do DNA do parasita no plasma seminal foi possível a partir da utilização dos iniciadores correspondentes ao domínio catalítico de 177 pb do gene Catepsina-L (BEZERRA et al., 2008). Os iniciadores baseados nas regiões intergênicas dos genes SL (*spliced-leader*) de 210bp (VENTURA et al., 2001) não permitiu a detecção do *T. vivax*. Isso pode ser justificado pelo fato de protozoários do gênero *Trypanosoma* sp. liberarem proteases tais como a cruzipáina, catepsina L e catepsina B, relacionadas aos danos teciduais desencadeados por estes parasitas (NIKOLSKAIA et al., 2006; ABDULLA et al., 2008). Segundo NIKOLSKAIA et al., (2006) e ABDULLA et al., (2008) as catepsinas B e L

são mais conservadas e relacionam-se à penetração do *Trypanosoma brucei* pela barreira hemato-encefálica em modelos humano e murino.

Mas, com a identificação do DNA de *T.vivax* no plasma seminal de bovinos, novos questionamentos começam a ser feitos sobre a transmissão da doença via sêmen. Sabendo-se que o plasma seminal é um fluido constituído de proteínas, carboidratos, lipídeos, sais minerais e vitaminas com a função de transportar e proteger os espermatozoides do momento da ejaculação até o trato genital feminino, a presença do *T. vivax* poderia influenciar negativamente na reprodução.

Os prejuízos econômicos da tripanossomíase relacionados à fertilidade dos machos infectados, especialmente os animais geneticamente superiores e sobre a fertilidade dos rebanhos servidos por esses machos já estão descritas (GOMES, 1991).

Segundo Anosa (1983), os machos acometidos pela tripanossomíase por *T. vivax* apresentam várias desordens reprodutivas quer seja em infecções naturais ou experimentais. Tais alterações são reportadas quase que exclusivamente em ruminantes domésticos, e de acordo com Sekoni et al., (1990) touros infectados com *T. vivax* podem apresentar degeneração testicular leve, moderada ou severa.

Em alguns animais pode-se observar que a infecção por *T. vivax* pode acarretar a destruição celular dentro dos tecidos intersticiais e dos túbulos seminíferos. Degeneração leve a moderada no tecido epididimário com redução significativa de suas reservas espermáticas entre 20 e 50%, além da degeneração moderada das vesículas seminais, glândulas prostáticas e ampolas (SEKONI et al., 1990,).

Adamu et al. (2007), estudaram os danos progressivos em testículos e epidídimos de zebuínos experimentalmente infectados por *T. vivax*. Esses órgãos foram estudados anatomopatologicamente aos 14, 28 e 56 dias pós-infecção. Observou-se que com o decorrer da infecção, ocorreu depleção das células espermatógenicas e destruição do tecido intersticial (túbulos seminíferos hipoplásicos além do desaparecimento das células de sertoli). No epidídimo, os danos chegaram a 60% de comprometimento do parênquima, verificando-se áreas focais de necrose e ainda metaplasia escamosa do epitélio epididimário, com reserva espermática avaliada em 0% aos 56 dias pós-infecção. Os citados autores demonstraram que os danos no sistema reprodutor masculino já estão presentes em fases precoces da doença, aos 14 dias pós-infecção.

Os métodos moleculares possuem alta sensibilidade na identificação de patógenos (SAMPAIO, 2013), mas não são capazes de prever a gravidade e fase na qual se encontra a infecção, bem como o prognóstico e resposta ao tratamento. Já se sabe que perfis



eletroforéticos específicos são encontrados para determinadas infecções, assim como para a fase desta infecção, podendo também prever o prognóstico e a resposta à terapia (PASSOS et al., 2011; ALMEIDA et al., 2012).

A eletroforese permite a evidência de proteínas e representa uma ferramenta importante para o estudo das interações ocorridas entre o parasita-hospedeiro através da determinação do seu peso molecular (BRUNE et al., 1998).

No perfil eletroforético do plasma seminal dos animais infectados experimentalmente dos momentos 15ºdpi, 45ºdpi e 75ºdpi foram detectados maior expressão de proteínas, que pode estar relacionada às flutuações da parasitemia (elevação) e atividade do parasita. Bandas de proteínas de 66-55 kDa foram observadas somente em animais infectados. Segundo Rocha (1974) a proteína de 66 kDa trata-se da albumina seminal, cujas variações na concentração estão associadas em geral a alterações na espermiogênese e hipoplasia testicular. A albumina absorve peróxidos de lipídeos o que contribui para a preservação do espermatozoide. (MOURA, 2009).

De acordo com Teixeira et al., (2012), a ceruloplasmina sérica (115kDa) em bovinos infectados por *T. evansi* se elevou nos momentos em que a parasitemia não era mais detectada. Em caprinos (PATELLI et al., 2008) não verificaram a presença desta proteína, já em ovinos infectados (PASSOS, 2004) observou elevações do 5º ao 7º dpi. Assim, certifica-se que os teores de ceruloplasmina em animais infectados com *T. evansi* variam consideravelmente com a evolução da doença, não fornecendo subsídios confiáveis como métodos auxiliares de diagnóstico dessa tripanossomíase. No presente estudo, bandas de proteínas de 115,03 kDa foram identificadas no 30º dpi por SDS-PAGE, sugerindo a semelhança com a ceruloplasmina descrita por Teixeira et al., (2012).

Teixeira et al., (2012) ainda descreveu aumentos significativos da glicoproteína ácida sérica (40kDa) na fase tardia da infecção. Estas são proteínas de fase aguda dos ruminantes que se elevam no curso de doenças inflamatórias e metabólicas; estando ausentes ou em níveis muito baixos em animais sadios, sendo, portanto de valor para determinar o prognóstico e monitorar o tratamento de enfermidades (GANHEIM et al., 2007; GONZÁLES et al., 2007). Passos (2004) verificou elevações e diminuições desta proteína em vários períodos em ovinos infectados com *T. evansi*. No presente estudo, bandas de proteínas de 40, 94 a 40,68 kDa foram observadas nos momentos 30º, 45º e 75º dpi.

No 15º, 45º, 60º dpi foram observadas bandas de proteínas de 58,97 a 58,39 kDa e bandas de proteínas de 27,84 a 27,27 kDa no 15º e 30º dpi. De acordo com Sampaio (2013), o proteinograma sérico de bovinos infectados naturalmente por *T. vivax*, pode apresentar

variação na expressão de imunoglobulinas de cadeia pesada (58 kDa) e cadeia leve (27 kDa) de acordo com a fase da infecção e resposta imunológica ao parasita. É sabido que as tripanossomíases africanas induzem pronunciadas respostas de anticorpos (LE RAY, 1975), porém, a resposta imune do hospedeiro, na tentativa de eliminação do parasito, provoca danos teciduais e por vezes pode levar à morte (NAGLE et al., 1974).

Proteínas com peso molecular de 10 kDa foram observadas no plasma seminal dos animais não infectados e infectados experimentalmente, estando ausente somente no 1º dpi. Segundo Sampaio (2013), a proteína soro amiloide A (SAA) é uma proteína de fase aguda que possui peso molecular entre 9-14 kDa, e não foi detectada no proteinograma sérico de animais naturalmente infectados por *T. vivax*. Desta forma, torna-se necessário um estudo mais detalhado deste proteinograma seminal para o isolamento das proteínas relacionadas ao *T. vivax*, devido a escassez de informações relacionadas à sua presença no plasma seminal.

Na fase crônica da infecção (30ºdpi ao 90º dpi) foram detectados no plasma seminal dos animais infectados antígenos proteicos de 55,78 a 16,79 kDa pelo soro hiperimune. Segundo Yadav et al., (2013) em trabalho conduzido para identificação de antígenos imunodominantes para *T.evansi* em equinos, foram identificados antígenos proteicos de 62 a 66 kDa, 52 a 55 kDa e 41 a 43 kDa através do imunoblot. Dentre esses polipeptídeos os de 41-43 kDa foram reconhecidos como cisteína proteases, ativadas apenas em pH ácido. Proteínas semelhantes foram reconhecidas nos dias 60º dpi (43 kDa) e 90º dpi (42,03kDa) no plasma seminal dos bovinos infectados experimentalmente.

No dia 75º dpi, foi identificado um antígeno proteico de 66,95 kDa. Yadav et al., (2013) também purificou antígenos isolados do primeiro pico de parasitemia dos equinos de 62kDa a 66 kDa, e o desempenho deste semi antígeno purificado em ELISA e *Western blot* foi consistente e igualmente sensível e específico como o antígeno em lisado de células inteiras na detecção de infecção crônica em eqüinos.

Bolivar et al., (2007), realizou o fracionamento da porção citoplasmática de formas sanguinícolas de *T. evansi* e *T. vivax* o que permitiu a detecção de dois polipeptídeos de 29 kDa e 64 kDa, quando foi revelado com soro equino anti *T. evansi* e proteínas antigênicas de 34 kDa e 70 kDa, incubados com soro bovino anti- *T. vivax* , indicando a semelhança antigênica entre as duas espécies de *Trypanosoma* spp. O fato de que ele pode distinguir entre infecções naturais contra *T. evansi* e infecções naturais contra *T. vivax*, permite considerar estas proteínas como um marcador bioquímico candidato para identificar e diferenciar as duas infecções parasitárias em áreas onde os dois são endêmicos a tripanossomíase. Antígenos protéicos de 55,44 a 24,45 kDa foram reconhecidos no 75º e 90º dpi. Tal fato nos permite

inferir que a detecção de antígenos proteicos do parasita no plasma seminal deve ser analisada como uma possível ferramenta diagnóstica nas infecções por *Trypanosoma vivax*.

## 7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

- *T. vivax* está presente no plasma seminal de animais infectados durante todo o período experimental, com início no 15º dpi.
- *T. vivax* aumenta a expressão de proteínas no plasma seminal
- A expressão de antígenos proteicos de *T. vivax* aumenta com a cronicidade da infecção.
- Antígenos protéicos de 13,47 a 11,87kDa aparecem somente na fase da aguda da infecção. - Antígenos protéicos de 116,87 a 125,55 kDa, 55,78 a 16,79 kDa e 11,51 a 8,95 kDa aparecem somente na fase crônica da infecção.

## REFERÊNCIAS

- ABRÃO, D.C; CARVALHO, A.U; FACURY FILHO, E.J; BARTHOLOMEU, D. C; RIBEIRO, M.F.B. Aspectos clínicos e patológicos da infecção natural em bovinos leiteiros por *Trypanosoma vivax* em Minas Gerais, Brasil. **Ciência Animal Brasileira** – Suplemento 1, 2009 .Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria.
- ADAMU, S.; FATIHU, M.Y.; USEH, N.M.; MAMMAN, M.; SEKONI, V.O.; ESIEVO K.A.N. Sequential testicular and epididymal damage in zebu bulls experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. **Veterinary Parasitology**, v.143, p. 29–34. 2007.
- AGUIAR, V.G; ARAÚJO, A.A; MOURA, A.A.A. Desenvolvimento testicular, espermatogênese e concentrações hormonais em touros Angus. **R. Bras. Zootec.**, v.35, n.4, p.1629-1638, 2006.
- ALMEIDA, K. A.; COSTA, A.F.; SILVA, P.C.; FAGLIARI, J.J; MACHADO, R.Z; NASCIMENTO, A.A. Acute phase proteins: a potential approach for diagnosing chronic infection by *Trypanosoma vivax*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** , v. 21, n. 2, p. 97-100. 2012.
- ALMEIDA, K. S.; FREITAS, F. L. C.; TEBALDI, J. H.; ALESSI, A. C.; MACHADO, R. Z.; NASCIMENTO, A. A. Alterações clínicas, histopatológicas e enzimáticas em ovinos infectados experimentalmente por *Trypanosoma vivax*. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 669-676. 2010.
- ANDREWS, A.T. **Electrophoresis; theory, techniques, and biochemical applications**. 2 ed. Oxford, Clarendon Press, 1988. 452 p.
- ANOSA, V.; ISOUN, T. Further observation on the testicular pathology in *Trypanosoma vivax* infection of sheep and goats. **Res. Vet. Sci.** v. 28, p.151-160.1980
- APTED, P.I.C. Clinical manifestations and diagnosis of sleeping sickness. In: Mulligan, E.W., Potts, W.H. (Eds.), **The African Trypanosomiasis**. Allen and Unwin, London, p. 661 – 683. 1970.
- AQUINO, L.P.C.; MACHADO, R.Z.; LEMOS, K.R.; MARQUES, L.C.; GARCIA, M.VALERIO.; BORGES, G.P. Antigenic characterization of *Trypanosoma evansi* using sera from experimentally and naturally infected bovines, equines, dogs, and coatis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 112-118. 2010.
- BARAL , T. N. Immunobiology of African Trypanosomes: Need of alternative interventions. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, n.389153, 24 p. 2010.
- BATISTA, J.S.; RIET-CORREA, F.; BARBOSA, R.C.; GUERRA, J.L. Infecção experimental por *Trypanosoma vivax* em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n.1, p. 31-37. 2006.
- BATISTA, J. S.; RIET-CORREA, F.; TEIXEIRA, M. M. G.; MADRUGA, C. R.; SIMÕES, S. D. V.; MAIA, T. F. Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian

semiárid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. **Veterinary Parasitology**, v.143, p.174-181. 2007.

BATISTA, J. S.; BEZERRA, F. S. B.; LIRA, R. A.; CARVALHO, J. R. G.; ROSADO NETO, A. M.; PETRI, A. A.; TEIXEIRA, M. M. G. Aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da infecção natural em bovinos por *Trypanosoma vivax* na Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 63-69. 2008.

BATISTA, J. S.; RODRIGUES, C. M. F.; GARCÍA., H. A.; BEZERRA, F. S. B.; OLINDA, R. G.; TEIXEIRA, M. M. G.; SOTO-BLANCO, B. Association of *Trypanosoma vivax* in extracellular sites with central nervous system lesions and changes in cerebrospinal fluid in experimentally infected goats. **Veterinary Research**, v.42, n.63, p.7. 2011.

BATISTA, J. S.; RODRIGUES, C. M. F.; OLINDA, R. G.; SILVA, T. M. F.; VALE, R. G.; CÂMARA, A. C. L.; REBOUÇAS, R. E. S.; BEZERRA, F. S. B.; GARCÍA, H. A.; TEIXEIRA, M. M. G. Highly debilitating natural *Trypanosoma vivax* infections in Brazilian calves: epidemiology, pathology, and probable transplacental transmission. **Parasitology Research**, v.110, p.73–80. 2012.

BETANCOURT, A. Transmission prenatal del *Trypanosoma vivax* de bovinos em Colômbia. **Rev. ICA Bog.**, n. 13, p.127-129, 1978.

BETANCOURT, A. E.; JULIO, T.M. La tecnica de centrifugacion en tubo capilar el diagnostico de infecciones naturales por *Trypanosoma* sp. **Rev ICA Bogota**, v.14, p.105-108. 1979.

BEZERRA, F. S. B; BATISTA, J. S. Efeitos da infecção por *Trypanosoma vivax* sobre a reprodução: uma revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.2, n.3, p.61-66, 2008.

BOLY, H., HUMBLLOT, P., TILLET, Y., THIBIER, M. Effects of *Trypanosoma congolense* infection on the pituitary gland of Baoule bulls: Immunohistochemistry of LH and FSH – secreting cells and response of plasma LH and testosterone to combine testosterone to combined dexamethasone and GnRH treatment. **J. Rep. Fer**, v.100, p.157–162.1994.

BOLÍVAR, A.M; REYNA-BELLO, A; GARCÍA, F; GARCÍA-LUGO, P; CRISANTE, G; ROJAS, A; AÑEZ, N. Uso de proteínas como alternativa diagnóstica para discriminar infecciones entre *Trypanosoma vivax* y *Trypanosoma evansi*. **Boletín de Malariología y Salud Ambiental**, v.47, n.1, p.1-7. 2007.

BRENER, Z. **Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas**. Tese (Livre Docência) – 100 f. Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Minas Gerais, 1961.

BROWN, R.K. Immunological techniques (general). **Methods Enzymol**, v.11, p. 917-927. 1967.

BRUNE, W., ALFENAS, A.C. & JUNGHANS, T.G. Identificação específicas de enzimas em géis. In: *Alfenas, A.C.* (Ed.) Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV. p. 201-317. 1998.

- CADIOLI, F. A. **Estudos metabólicos, hematológicos e anatomopatológicos em ratos Wistar infectados com *Trypanosoma evansi***. 2005. 92 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2005.
- CHRAMBACH, A.; RODBARD, D. Polyacrylamide gel electrophoresis. **Science**, v. 30, p.440-51, 1971.
- CORTEZ A.P.; VENTURA R.M.; RODRIGUES, A.C.; BATISTA, J.S.; PAIVA, F.; AÑEZ N.; MACHADO R.Z.; GIBSON W.C. e TEIXEIRA M.M.G. The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South América and África. **Parasitology**, v.133, p.159-169. 2006.
- COUROT, M.; HOCHEREAU-de RIVIERS, M.T.; ORTAVANT, R. Spermatogenesis. In: JOHNSON, A.D.; GOMES W.R.; VANDEMARK, N.L. (Eds.) **The testis**. New York and London: Academic Press, v.1, p.339-432.1970.
- CUGLOVICI, D. A., BARTHOLOMEU, D. C.; REIS-CUNHA, J. L.; CARVALHO, A. U.; RIBEIRO, M. F. B. Epidemiologic aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.11, n.3-4, p.320-326. 2010.
- CURTIS, S.K.; AMANN, R.P. Testicular development and establishment of spermatogenesis in Holstein bulls. **Journal of Animal Science**, v.53, n.6, p.1645-1657, 1981.
- DÁVILA, A. M. R., RAMIREZ, L., SILVA R. A. M. S. Morphological and biometrical differences among *Trypanosoma vivax* isolates from Brazil and Bolivia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.92, p.357-358. 1997.
- DÁVILA, A. M. R.; HERRERA, H. M.; SCHLEBINGER, T.; SOUZA, S. S.; TRAUBCSEKO, Y.M. Using PCR for unraveling the cryptic epizootiology of livestock trypanosomosis in the Pantanal. **Brazilian Veterinary Parasitology**, v.117, p.1–13. 2003.
- DELAFOSSÉ, A.; THEBAUD, E.; DESQUESNES, M.; MICHAUX, Y. Epidemiology of *Trypanosoma vivax* infection in cattle in the tse-tse free area of Lake Chad. **Preventive Veterinary Medicine**, v.74, p.108–119. 2006.
- DESQUESNES, M.; GARDINER, P. R. Epidémiologie de la trypanosomose bovine (*Trypanosoma vivax*) en Guyane française. **Revue d'élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux**, v.46, n.3, p.463-470. 1993.
- DESQUESNES, M.; TRESSE, L. Evaluation de la sensibilité du test de Woo pour la détection de *Trypanosoma vivax*. **Revue d'élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux**, v.49, p.315-321. 1996.
- DESQUESNES, M.; DÁVILA, A. M.R. Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. **Veterinary Parasitology**, v.109, p.213–231. 2002.
- DESQUESNES, M. **Livestock trypanosomoses and their vectors in Latin America**. OIE & CIRAD, Paris, 190 p. 2004.

- DESQUESNES, M.; DIA, M.L. Mechanical transmission of *Trypanosoma vivax* in cattle by the African tabanid *Atylotus fuscipes*. **Veterinary Parasitology**, v.119, p.9-19. 2004.
- GANHEIM, C.; ALENIUS, S.; WALLER, K. P. Acute phase proteins as indicators of calf herd health. **Veterinary Journal**, v.173, p.645-651. 2007.
- GARDINER P.R. Recent studies of the biology of *Trypanosoma vivax*. **Advances in Parasitology**, v.28, p.229-317. 1989.
- GODSON, D. L.; CAMPOS, M.; ATTAH-POKU, S. K., REDMOND, M. J.; CORDEIRO, D. M.; SETHI, M. S; HARLAND, R. J.; BABIUK, L. A. Serum haptoglobin as an indicator of the acute phase response in bovine respiratory disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.51, p.277-292. 1996.
- GOMES, M.J.P. Isolamento e identificação de *Chlamydia psittaci* de reprodutores bovinos com adenite vesicular, no Estado do Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 95p. 1991.
- GONZÁLES, F. H. D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; CERÓN. J. J. et al. Haptoglobina en ruminantes: generalidades y posibles aplicaciones clinicas. **An. Vet.**, v.23, p.17, 2007.
- GRIFFIN, J.E. Male reproductive function. In: GRIFFIN, J.E.; OJEDA, S.R (Eds.). **Textbook of endocrine physiology**. New York: Oxford University Press, p.165-185. 1988.
- HOARE, C. A. **The Trypanosomoses of mammals**, Oxford: Blackwell, 1972. 749p.
- IKEDE, B. O.; LOSOS, G. J. Hereditary transmission of *Trypanosoma vivax* in sheep. **Bri. Vet. Jou.**, v. 128, p. 1-2, 1972.
- IKEDE, B.O.; LOSOS, G.J. Pathogenesis of *T. brucei* infection in sheep; hypophyseal and other endocrine lesions. **J. Comp. Pathol**, v.85, p.37-44. 1975.
- ISOUN, T.T.; ANOSA, V.O. 1974. Lesions in the reproductive organs of sheep and goats experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. **Z. Tropenmed. Parasitol.**, v.25, p.469-476. 1974.
- JELKMANN, W. Proinflammatory cytokines lowering erythropoietin production. **J. Interferon Cytokine Res**, v.18, p.555-559. 1998.
- JOBIM, M.I.M; OBERST, E.R; SALBEGO, C.G; SOUZA, D.O; WALD, V.B; MATTOS, R.C. Proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen através de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 31, n.1, p. 21-30. 2003.
- JOBIM, M.I.M; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Proteínas do plasma seminal relacionadas a congelabilidade do sêmen bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n.6, p.25-31, 2009.
- JONES, T.; DÁVILA, A. M. R. *Trypanosoma vivax* out of África. **Trends in Parasitology**, v.2, n.17, p.99-101. 2001.



- KENT, J. Acute phase proteins: their use in veterinary diagnosis. **British Veterinary Journal**, v.48, p.279- 282, 1992.
- KIMETO, B. A.; MUGERA, G. M.; NYAGA, P. N. Haemorrhagic pancarditis in cattle infected with *Trypanosoma vivax*. **Veterinary Parasitology**, v.34, p.295-301.1990.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LARROCHE, C.; MOUTHON, L. Pathogenesis of hemophagocytic syndrome (HPS). **Autoimmun. Rev**, v.3, p.69–75. 2004.
- LE RAY, D. Structures antigeniques de *Trypanosoma brucei* (protozoa, Kinetoplastida). Analyse immunoelectrophoretique et étude comparative. **Société Belge de Médecine Tropicale.**, v.55, p.129- 311, 1975.
- LINHARES, G. F. C.; FILHO, F. C. D.; FERNANDES, P. R.; DUARTE, S. C. Tripanossomíase em bovinos no município de Formoso do Araguaia, Tocantins: relato de caso. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 4, p. 455-460, 2006.
- MACIEL, A.B.B. **Proposta de avaliação da condição corporal em vacas holandesas e nelores**. 2006, 103f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, 2006.
- MCENTEE K. Reproductive pathology in domestic mammals. San Diego: **Academic Press**. 401p.1990.
- MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; CAVALCANTE-GOES, G.; MARTINS, C.; PFEIFER,, I.B.; RIBEIRO, L. R.; KESSLER, R. H.; SOARES, C. O.; MIGUITA, M.; MELO, E. P. S.; ALMEIDA, R. F. C.; LIMA J. R, M.M. The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* antibodies and its use in epidemiological surveys. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 7. 2006.
- MASAKE, R.A. The pathogenesis of infection with *Trypanosoma vivax* in goats and cattle. **Veterinary Record**, v.107, p.551–557. 1980.
- MATTIOLI, R. C.; WILSON, R. T. Trypanosomes, tsetse and trypanotolerance: coevolution in Tropical Africa. **Parassitologia**, v. 38, p. 531-535. 1996.
- MELLENDEZ, R.D.; FORLANO, M.; FIGUERO, A.W. Perinatal infection with *Trypanosoma vivax* in a calf in Venezuela. **Jou. Par.**, v.79, p.293-294, 1993.
- MOLYNEUX, D.H. Diagnostic methods in animal trypanosomiasis. **Vet Parasitol**, v.1, p.517. 1975.
- MOLOO, S. K.; GRAY, M. A. New observations on the cyclical development of *Trypanosoma vivax* in *Glossina*. **Acta Tropica**, Basel, v.4, p.167–172,1989.

- MOURA, A.A.; ERICKSON, B.H. Testicular development, histology, and hormone profiles in three yearling Angus bulls with spermatogenic arrest. **Theriogenology**, v.55, p.1469- 1488, 2001.
- MOURA, A.A. Seminal plasma proteins and fertility indexes in the bull: The case for osteopontin. **Animal Reproduction**, v.2. n.1, p.3-10. 2005.
- MURRAY, M. An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.71, n.4, p.325-326. 1977.
- MURRAY, M.; DEXTER, T. M. Anaemia in bovine African trypanosomiasis: A review. **Acta Tropica**, v.45, p.389-432. 1988.
- MUTAYOBA, B.M.; ECKERSALL, P.D.; JEFFCOATE, I.A.; CESTNIK, V.; HOLMES, P.H. Effects of *Trypanosoma congolense* infection in rams on the pulsatile secretion of testosterone and response to injection of GnRH. **J. Rep. Fer** v.102, p. 425–431.1994
- NAGLE, R. B.; WARD, P. A.; LINDSEY, H. B; SADUN, E. H.; JOHNSON, A. J.; BERKAW, R. E.; HILDEBRANDT, P. K. Experimental infections with African trypanosomes. VI. Glomerulo-nephritis involving the alternative pathway of complement activation. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, v.23, p.15-26, 1974.
- OSÓRIO, A. L. A. R., MADRUGA, C. R., DESQUESNES, M., SOARES, C. O., RIBEIRO, L. R. R. AND DA COSTA, S. C. G. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World - a Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, p. 1–13.2008.
- OGWU, D.; NURU, S. Transplacental transmission of trypanosomes in animals and man. **Veterinary Bulletin**, v.51, p.381-384. 1981.
- OGWU, D. et al. Effects of experimental *Trypanosoma vivax* infection on first, second, and third-trimester pregnancy in heifers. **Theriogenology**, v. 25, p.383-398, 1986.
- OKECH, G. et al. The effect of *Trypanosoma vivax* infection on late pregnancy and postpartum return to cyclicity in boran cattle. **Theriogenology**, v. 46, p. 859-869, 1996.
- PAIVA, P.; LEMOS, R. A. A.; NAKAZATO, L.; MORI, A. E.; BRUM, K. B.; BERNARDO, C. *Trypanosoma vivax* em bovinos no pantanal do estado do Mato Grosso do Sul, Brasil: acompanhamento clínico, laboratorial e anatomopatológico de rebanhos infectados. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.9, n. 2, p. 135-141. 2000.
- PAIVA, E. S. **Tripanossomíase por *Trypanosoma vivax* em pequenos ruminantes: descrição de surtos e infecção experimental da doença**. 2009. 84 f. Dissertação de Mestrado (Sanidade e Produção Animal- Ciência Animal) Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró. 2009.
- PASSOS, P. B. **Infecção experimental em ovinos com *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885) (*Sarcomastigophora: Trypanomatidae*)**. 2004. 236 f. Tese de Doutorado (Medicina Veterinária – Clínica Veterinária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2004.

- PASTORET, P. P.; GRIEBEL, P.; BAZIN, H.; GOVAERTS, A. **Handbook of Vertebrate Immunology**. Published by Academic Press, 439-484p. 1998.
- PATELLI, T. H. C.; MARQUES, L. C.; FAGLIARI, J. J.; SILVA, P. C. Perfil eletroforético das proteínas de fase aguda em caprinos experimentalmente infectados com *Trypanosoma evansi*. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science.**, v.45, p.481- 487, 2008.
- PERRY, B. D.; RANDOLPH, T. F.; McDERMOTT, K. R.; SONES, K. R.; THORNTON, P. K. *Investing in animal health research to alleviate poverty*. ILRI (International Livestock Research Institute), Nairobi, Quênia, 2002. 148 p.
- PIMENTEL, D. S.; RAMOS, C. A. N.; RAMOS, R. A. N.; ARAÚJO, F. R.; BORBA, M. L.; FAUSTINO, M. A. G.; ALVES, L.C. First report and molecular characterization of *Trypanosoma vivax* in cattle from state of Pernambuco, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.185, p.286-289. 2012.
- ROCHA, M.C; GARCIA, O.S; FERREIRA NETO, J.M; SCHONS, J.A.B. Proteína total e seu fracionamento eletroforético em plasma seminal de touros zebus com alterações reprodutivas. **Arquivos da Escola Veterinária UFMG**, v.26, p-223-233. 1974.
- RUSSEL, L.D.; FRANÇA, L.R. Building a testis. **Tissue & Cell**, v.27, n.2, p.129-146, 1995.
- SAMPAIO, P.H **Resposta imune-humoral e proteinogramas séricos de bovinos naturalmente infectados pelo *Trypanosoma vivax***. 2013. 58 f. Dissertação de Mestrado (Medicina Veterinária – Clínica Veterinária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2013.
- SARGENT, J.R; GEORGE, S.G.**Methods in zone electrophoresis**. 3 ed. Poole, BHD Chemicals, 1975. 219 p.
- SCHENK, M. A.M.; MENDONÇA, C. L.; MADRUGA, C. R.; KOHAYAGAWA, A.; ARAÚJO, F. R. Avaliação clínico laboratorial de bovinos Nelore infectados experimentalmente com *Trypanosoma vivax*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n.4, p. 157-161. 2001.
- SEKONI, V.O. Effect of *Trypanosoma vivax* infection on semen characteristics of yankasa rams. **British Veterinary Journal**, v. 148, n.6, p.501-506.1992.
- SEKONI V.O., REKWOT P.I.; BAWA E.K. Effects of *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma congolense* infections on the reaction time and semen characteristics of Zebu (Bunaji) x Friesian crossbred bulls. **Theriogenology**, v. 61, p.55-62. 2004.
- SERRA-FREIRE, N. M.; REZENDE, A. M. L. *Stomoxys calcitrans*, um vetor mecânico do *Trypanosoma vivax* no Brasil e notas sobre o comportamento do parasito no vetor. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v.11, n.1, p.77-82, 1988.
- SETCHELL, B.P. The parkes lecture heat and the testis. **J. Reprod. Fertility** , v.114, p.174-194.1978

- SHARPE, R.M. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. (Eds.). **The physiology of reproduction**. 2.ed. New York: Raven Press, 1994. v.1, p.1364-1434.
- SHAW, J. J.; LAINSON, R. *Trypanosoma vivax* in Brazil. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 66, p.25-32. 1972.
- SILVA, R. A. M. S.; RAMIREZ, L.; SOUZA, S. S.; ORTIZ, A. G.; PEREIRA, S. R.; DÁVILA, A. M. R. Hematology of natural bovine trypanosomosis in the Brazilian Pantanal and Bolivian wetlands. **Veterinary Parasitology**, v.85, p.87–93. 1999.
- SILVA, R. A. M. S.; SEIDL, A.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A. M. R. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*– **Biologia, diagnóstico e controle**. EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), Corumbá, Brasil, 2002. 140 p.
- SILVA, R. A. M. S.; PELLEGRIN, A. O.; LIMA, E. S. S.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A. M. R. **Abortos por *Trypanosoma vivax* no Pantanal Mato-Grossense e Bolívia**. Embrapa, Corumbá-MS, 2004, 21p.
- SILVA, A. S.; COSTA, M. M.; POLENZ, M. F.; POLENZ, C. H.; TEIXEIRA, M. M. G.; LOPES, S.T.A.; MONTEIRO, S. G. First report of *Trypanosoma vivax* in bovines in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Ciência Rural**, v.39, n.8, p.2550-2554. 2009.
- TAYLOR, K.; AUTHIÉ, E.M.-L. Pathogenesis of Animal Trypanosomiasis. In: MAUDLIN, I.; HOLMES, P.; MILES, M. **The Trypanosomiasis**. 1. ed, Wallingford: CABI Publishing, 2004. cap. 18, p. 334.
- TEIXEIRA, M. C. A.; MARQUES, L. C.; CADIOLI, F. A.; FAGLIARI, J. J; MACHADO, R. Z; SILVA, P. C. Proteinogramas séricos de ratos Wistar experimentalmente infectados com *Trypanosoma evansi*. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v.60, p.1447-1453, 2008.
- TEIXEIRA, M. C. A; MARQUES,L.C; FAGLIARI,J.J;MACHADO, R.Z; SILVA, P.C; PORTUGAL,E.S, SANTOS,C.E.P; GIRARDI, A.M. Proteinograma sérico de bovinos experimentalmente infectados com *Trypanosoma evansi*. **Ars Veterinaria**, v.28, n.3, p.153160, 2012.
- TIZARD, I. A. N.; NIELSEN, K. H.; SEED, J. R.; HALL, J. E. Biologically active products from African Trypanosomes. **Microbiological Reviews**, v. 42, n. 4, p. 661-681, 1978.
- THOMPSON, J. H. et al. **Microbiologia médica**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. p. 280-282.
- VAN DEN INGH, T. S. G. A. M.; ZWART, D.; SCHOTMAN, A. J. H.; VAN MIERT, A. S. J. P. A. M.; VEENENDAAL, G. H. The pathology and patogenesis of *Trypanosoma vivax* infection in the goat. **Research in Veterinary Science**, v. 21, p. 264-270, 1976.
- VENTURA, R. M.; PAIVA, F.; SILVA, R. A. M. S.; TAKEDA, G.F.; BUCK, G. A.; TEIXEIRA, M. M. G. *Trypanosoma vivax*: Characterization of the Spliced-Leader Gene of a Brazilian Stock and Species-Specific Detection by PCR Amplification of an Intergenic Spacer Sequence. **Experimental Parasitology**, v. 99, p. 37–48. 2001.

WILLIAMS, D. J. L.; TAYLOR, K. A.; NEWSON, J.; GICHUKI, B. The role of antivariable surface glycoprotein antibody responses in bovine trypanotolerance. **Parasite Immunology**, v.18, p. 209-218. 1996.

WOO, P. T. K. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomosis. **Acta Tropica**, v.27, p.384-386, 1970.

YADAV , S.C. ; KUMAR ,R; KUMAR , V; JAIDEEP , GUPTA, A.K ; BERA,B.C; TATU U. Identification of immuno-dominant antigens of Trypanosoma evansi for detection of chronic trypanosomosis using experimentally infected equines.**Research in Veterinary Science**, v. 95, p.522–528. 2013.

## ANEXO I- CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA



Ofício CEEA-022/2013

Uberaba, 06 de junho de 2013

### CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 001/2013 relativo ao projeto intitulado "**Caracterização do perfil sorológico e imunofenotípico de linfócitos periféricos de bovinos infectados experimentalmente por Trypanosoma vivax**" que tem como responsável **Profa. Joely Ferreira Figueiredo Bittar**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA/UNIUBE) regido pela lei nº 11.794/08.

### CERTIFICATE

We hereby certify that the protocol nº 006/2013 related to the project entitled "**Serological and immunological profile of peripheral lymphocyte bovine experimentally infected with trypanosome vivax**", under the supervision of **Profa. Joely Ferreira Figueiredo Bittar**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEEA/UNIUBE) according to the law nº 11.794/08.

Atenciosamente,



**Prof. Dr. André Belico de Vasconcelos**  
Vice-Coordenador do CEEA-UNIUBE

## ANEXO II- SOLUÇÕES PARA PCR

- Para o preparo do TBE ( Tris/Borato/EDTA) 5x

54g de Tris base  
27g de ácido bórico  
20mL de 0,5M de EDTA pH 8,0  
Água destilada

- Para o preparo do gel de agarose 1,5%

200 mL de H<sub>2</sub>O destilada  
50mL de TBE a 5X (obtenho assim TBE 1x)  
3,75 gramas de agarose,

Preparo realizado no microondas, com intervalos de 30 segundos para homogeneização, não permitindo a ebulição da mistura.

- Coloração com Brometo de Etídio

100 ml de água destilada  
5µl de Brometo de Etídio

## ANEXO III-SOLUÇÕES PARA ELETROFORESE SDS-PAGE

### Acrilamida-bisacrilamida

Acrilamida 30% (p/v)	29,2 g
Bisacrilamida	0,8 g
H <sub>2</sub> O bidestilada qsp	100 mL

- Dissolver com auxílio de agitador magnético por cerca de 20 minutos
- Filtrar com seringa e filtro de 0,22 µm
- Armazenar em frasco escuro a 4°C

### Tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 (concentração)

Tris	6,0 g
H <sub>2</sub> O bidestilada qsp	100 mL
HCl 6 N	

- Dissolver o Tris (usar banho maria a 56°C, se necessário)
- Ajustar o pH para 6,8 e completar o volume
- Armazenar em frasco escuro a 4°C
- Acertar o pH para 6,8 com HCl 5N (HCl concentrado).

### Tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 (resolução)

Tris	18,15 g
H <sub>2</sub> O bidestilada qsp	100 mL
HCl 6 N	

- Dissolver o Tris
- Ajustar o pH para 8,8 e completar o volume
- Armazenar em frasco escuro a 4°C • Acertar o pH para 8,8 com HCl 5N.

### Dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%

SDS	10 g
H <sub>2</sub> O bidestilada qsp	100 mL

- Dissolver em banho maria a 56°C (não agitar)
- Armazenar à temperatura ambiente

### Persulfato de amônio (PA) 10%

Persulfato de amônio	0,5 g
H <sub>2</sub> O bidestilada qsp	5 mL

- Aliquotar e armazenar a -20°C

### TEMED (*N,N,N',N'*-Tetramethylethylenediamine)

- Pronto para uso. Manter a 4°C.



**Tampão de corrida pH 8,3 (estoque 10X)**

Tris	30 g
Glicina	144 g
H <sub>2</sub> O bidestilada qsp	1 L

- Dissolver os sais em ± 900 mL de água
- Ajustar o pH em 8,3-8,35 e completar o volume para 1 L

**Tampão de corrida para uso**

- 50 mL do tampão 10X
- 5 mL de SDS 10%
- Completar o volume com H<sub>2</sub>O bidestilada qsp 500 mL
- Desprezar após o uso

<b>Tampão de amostra</b>	<b>[ ] 2X</b>	<b>vol (mL)</b>
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	0,0625 M	1,25
Glicerol	25 %	2,5
SDS 10%	2 %	2
Azul de Bromofenol 1%	0,01 %	0,1
2-mercaptoetanol	5 %	0,5
H <sub>2</sub> O bidestilada qsp		3,65
V final		10

- Aliquotar e armazenar a -20°C

**GEL**

	<b>[ ] estoque</b>	<b>[ ] final</b>
Gel de empilhamento	<b>Tris-HCl 0,5M pH 6,8</b>	125 mM
Gel de corrida	<b>Tris-HCl 1,5M pH 8,8</b>	375 mM
SDS	10%	0,1%

<b>Reagentes / %</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>12,5</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>
<b>Acrilamida/bis 30%</b>														
<b>(mL)</b>	1	1,3	1,7		2	2,3	2,7		3	3,3	3,7		4	4,17
<b>Tris-HCl (mL)</b>		2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5		2,5	2,5
<b>SDS 10% (mL)</b>		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1		0,1	0,1
<b>H<sub>2</sub>O bidestilada (mL)</b>		6,4	6,1	5,7	5,4	5,1	4,7	4,4	4,1	3,7	3,4	3,23	3,1	2,7
<b>V final</b>	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Para polimerização adicionar

- 50 µL de PA 10%
- 10 µL de TEMED

**ANEXO IV- COLORAÇÃO PELO AZUL DE COMASSIE****Azul de Coomassie (coloração do gel)**Solução corante

Comassie Brilliant Blue R-250	0,625 g
Metanol	50 mL
Ácido acético glacial	17,5 mL
H <sub>2</sub> O bidestilada qsp	250 mL

\*Solução reutilizável. Armazenar em frasco escuro à temperatura ambiente Solução  
descolorante

Metanol	5%	25 mL
Ácido acético glacial	7,5%	37,5 mL
H <sub>2</sub> O bidestilada qsp		500 mL

## Coloração:

- Colocar o gel na solução corante por 10 minutos, sob agitação lenta.
- Retirar o corante e colocar a solução descolorante (trocar a solução até evidenciar as bandas)

## ANEXO V- SOLUÇÕES PARA WESTERN BLOTTING

- **Tampão fosfato salino (PBS)**

	[ ] 10X	P/ 1 L
NaCl	140 mM	81,8 g
KCl	2,7 mM	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM	14,3 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 mM	2,4 g
H <sub>2</sub> O qsp		1000 mL

Pesar todos os sais e colocar em um béquer acrescentando 500 ml de água destilada. Utilizar o agitador magnético para dissolver os sais. Completar o volume para 1 litro de água destilada em balão volumétrico. Acertar o pH para 7,2. Colocar em vidro transparente, coberto com papel alumínio, com identificação e conservar em temperatura de 2 a 8°C.

- **PBS-TWEEN 20/0,5%**

100 mL do PBS 10X

0,5 mL de TWEEN 20

899,5 mL de água destilada

- **SOLUÇÃO DE BLOQUEIO**

100 mL do PBS-TWEEN 20/0,5%

5 g de leite desnatado (Molico®)

- **REAÇÃO IMUNOLÓGICA**

500 mL do PBS-TWEEN 20/0,5%

2,5 g de leite desnatado (molico)

**ANEXO VI – BANDAS DE PROTEÍNAS OBSERVADAS NO PLASMA SEMINAL DOS BOVINOS PELA ELETROFORESE**

Proteínas (kDa) Plasma seminal Animal negativo	Proteínas (kDa) Plasma seminal animal positivo						
	D1	D15	D30	D45	D60	D75	D90
130,65	131,90	131,90	167,35	186,68	147,48	161,48	153,17
114,45	128,68	128,68	157,37	147,48	143,67	149,18	149,18
108,93	116,58	122,48	139,16	139,95	136,34	145,30	145,30
103,68	113,74	116,58	134,94	136,34	129,38	134,24	141,51
98,68	110,96	110,96	130,86	129,38	126,03	127,34	127,34
93,93	108,58	108,26	126,90	116,51	122,78	120,79	124,02
89,40	100,53	105,62	115,71	104,92	119,60	114,58	120,79
85,09	99,05	103,04	112,21	97,00	116,51	111,60	111,60
80,99	98,07	100,53	108,81	94,49	110,57	108,69	108,69
80,99	95,68	95,68	102,32	92,05	104,92	95,25	100,42
73,37	91,07	93,35	96,22	89,67	102,21	92,77	97,80
69,84	90,36	91,07	90,48	85,09	99,57	88,00	95,25
42,61	86,68	88,85	87,74	80,75	97,00	85,71	92,77
40,56	84,99	84,57	85,08	76,63	94,49	83,48	90,36
34,97	82,51	82,51	82,51	72,72	89,67	81,30	88,00
33,29	80,49	80,49	80,01	69,01	87,35	73,16	83,48
30,16	76,62	78,53	62,56	65,48	82,89	67,59	81,30
24,75	74,75	74,75	57,05	58,97	76,63	65,83	77,12
23,56	72,92	72,92	53,64	53,11	74,65	60,82	67,59
20,31	66,52	69,41	52,02	51,73	72,72	44,31	65,83
16,67	60,68	59,85	44,61	45,38	70,84	43,16	54,73
12,39	53,69	58,39	40,68	43,07	62,14	42,03	49,24
10,17	49,12	54,22	39,44	40,87	58,97	40,94	46,71
	46,76	51,61	35,97	39,81	49,09	38,83	42,03
	41,32	49,12	34,88	38,78	46,59	34,94	39,87
	39,53	47,92	31,80	34,93	43,07	34,03	35,88
	39,33	45,61	27,27	34,02	38,78	33,15	34,94
Proteínas (kDa) Plasma seminal Animal negativo	Proteínas (kDa) Plasma seminal animal positivo						
	D1	D15	D30	D45	D60	D75	D90

	34.97	44.50	24.12	33.14	37.78	30.62	30.62
	34.76	42.36	21.99	31.45	35.85	29.82	29.82
	26.50	41.32	20.05	30.64	34.02	28.29	24.79
	25.85	39.33	17.73	28.33	30.64	25.46	22.31
	25.75	37.44	17.19	25.51	26.88	24.79	21.16
	22.29	36.52	15.20	24.21	26.18	22.91	20.08
	20.70	35.63	14.74	23.58	25.51	22.31	18.06
	18.96	34.76	12.64	22.97	24.85	21.16	17.14
	17.85	33.09	11.89	22.38	18.15	19.04	16.69
	16.57	31.49	11.18	20.69	17.22	18.06	13.16
	15.01	29.98	10.84	18.63	16.78	17.59	12.48
	14.84	27.84	10.51	18.15	16.34	17.14	11.53
	14.29	25.85	9.89	17.22	13.60	15.42	11.23
	13.94	25.85	9.30	16.34	12.91	13.87	10.94
	13.60	24.00	8.74	15.92	12.25	13.51	10.66
	13.54	21.75	8.22	12.91	11.03	13.16	
	12.95	18.29	7.73	12.58	10.47	12.82	
	12.32	17.41		12.25		11.84	
	11.98	14.29		11.63		11.53	
	11.73	13.60		10.75		11.23	
	11.44	13.27		10.47		10.94	
		12.32		10.47			
		12.02		9.94			
		11.44					
		11.16					
		10.89					
		9.39					
		9.16					











