

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ESTUDO DA INTERAÇÃO “IN VITRO” ENTRE *Tritrichomonas*
foetus E ESPERMATOZOIDES BOVINOS

CLÁUDIA DE MELLO RIBEIRO

Botucatu – SP
Novembro – 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ESTUDO DA INTERAÇÃO “IN VITRO” ENTRE *Tritrichomonas*
foetus E ESPERMATOZOIDES BOVINOS

CLÁUDIA DE MELLO RIBEIRO

Tese apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título de
Doutor.

Orientador: Prof. Dr. José Rafael Modolo
Coorientador: Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo
Coorientador: Prof. Dr. Fernando Costa e
Silva Filho

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE
AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE
BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Ribeiro, Cláudia de Mello.

Estudo da interação “in vitro” entre *Tritrichomonas foetus* e espermatozoides bovinos / M C Ribeiro. – Botucatu [s.n.], 2008.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2008.

Orientador: José Rafael Modolo

Assunto CAPES: 50502042

1. Bovino - Doenças
2. Doenças transmissíveis em animais
3. Infertilidade

CDD 636.20896

Palavras-chave: Apoptose; Motilidade espermática;
Tritrichomonas foetus

Nome do Autor: Cláudia de Mello Ribeiro

Título: ESTUDO DA INTERAÇÃO “IN VITRO” ENTRE *Tritrichomonas foetus* E
ESPERMATOZOIDES BOVINOS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Rafael Modolo
Presidente e Orientador
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a. Dr^a Eunice Oba
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Alessandro Francisco Talamini do Amarante
Membro
Departamento de Parasitologia
IB – UNESP – Botucatu

Prof^a. Dr^a. Semíramis Guimarães Ferraz Viana
Membro
Departamento de Parasitologia
IB– UNESP – Botucatu

Prof^a. Dr^a Fabiana Ferreira de Souza
Membro
Departamento de Cirurgia e Anestesiologia
Universidade de Franca

Data da Defesa: 19 de novembro de 2008.

Agradeco

Ao orientador Prof. Dr. José Rafael Modolo – Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública – FMVZ - UNESP – Botucatu

Ao co-orientador Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo – Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ - UNESP – Botucatu

Ao co-orientador Prof. Dr. Fernando Costa e Silva Filho – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho — Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Ao Prof. Dr. João Pessoa Araújo Júnior – Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biociências - UNESP – Botucatu.

Aos alunos de pós-graduação Marcell Barbosa Falleiros e Leandro Rodello – Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ - UNESP – Botucatu.

Aos alunos do Laboratório de Diagnóstico Molecular – Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biociências - UNESP – Botucatu.

À técnica de laboratório Tânia Maria Martins – Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública – FMVZ - UNESP – Botucatu

À auxiliar de laboratório Adriana Cristina Pavan Vieira – Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública – FMVZ - UNESP – Botucatu

Ao Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento deste projeto (Processo 06/60514-5)

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Percentagem de espermatozoides móveis, analisada pelo sistema CASA, durante manutenção no meio SOF (controle) ou no extrato de incubação de *T. foetus* nos momentos 0,1, 2 e 3 horas..... 18
- Tabela 2 - Percentagem de espermatozoides viáveis (AN-/PI-), espermatozoides em apoptose (AN+/PI-), espermatozoides em início de necrose (AN+/PI+) e espermatozoides em necrose (AN-/PI+), mantidos em SOF (controle) ou em extrato de incubação de *T.foetus* nos momentos 0, 1, 2 e 3 horas..... 20

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Análise da expressão gênica de CP8 de *T. foetus*, correspondendo a uma banda de 456pb (a) e da expressão gênica de CP8 durante a interação *T.foetus*-espermatozoide (b), nos momentos 0 (h0), 1 (h1), 2 (h2) e 3 (h3) horas..... 17
- Figura 2 - Histogramas obtidos pela análise da citometria de fluxo dos espermatozoides mantidos em SOF (controle), nos momentos 0 (I) e 3 horas (II) ou no extrato de incubação de *T. foetus* nos momentos 0 (III) e 3 horas (IV). (a) Espermatozoides viáveis (AN-/PI-). (b) Espermatozoides em apoptose (AN+/PI). (c) Espermatozoides em início de necrose (AN+/PI+). (d) Espermatozoide em necrose (AN-/PI+). Observe que há uma maior população de espermatozoides em apoptose após três horas de manutenção, no extrato de incubação de *T. foetus* (IV)..... 21

LISTA DE ABREVIATÖES E SÍMBOLOS

°C	- Graus Centígrado
CO ₂	- Dióxido de carbono
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
cDNA	- DNA complementar
g	- Gravidade
HeLa	- Células do carcinoma cervical humano
kDa	- Kilo Dalton
MDCK	- Células do rim de cão
mL	- Milílitro
µL	- Microlitro
pb	- Pares de Base
%	- Percentual
pmol	- Picomolar
RNA	- Ácido ribonucleico
RT-PCR	- Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa
SOF	- Meio sintético de fluido de oviduto
SYBR	- Corante fluorescente
TYM	- Trypticase Yest Medium
UV	- Ultravioleta

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Tricomoníase bovina.....	3
2.2 <i>Tritrichomonas foetus</i>	4
2.3 Interação de <i>T. foetus</i> com as células do hospedeiro.....	5
2.3.1 Fatores de virulência.....	7
2.3.1.1 Cisteínas peptidases de <i>T. foetus</i>	8
2.4 Espermatozoides.....	9
3 OBJETIVOS.....	11
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4.1 <i>Tritrichomonas foetus</i>	12
4.2 Extrato da incubação de <i>T. foetus</i>	12
4.3 Espermatozoides.....	12
4.4. Desenho experimental.....	13
4.5 Análise da expressão de CP8 de <i>T. foetus</i> durante a interação com espermatozoides bovinos.....	13
4.5.1 Extração do RNA.....	13
4.5.2. RT-PCR.....	14
4.6 Avaliação da motilidade espermática	14
4.7 Avaliação da viabilidade espermática pela técnica de citometria de fluxo.....	15
4.8 Análise estatística.....	15
5 RESULTADOS.....	16
5.1 Espermatozoides bovinos aderem a <i>T. foetus</i>	16
5.2 <i>T. foetus</i> expressa o gene para CP8 durante interação com espermatozoides.....	16
5.3 A motilidade progressiva espermática foi alterada por produtos extracelulares secretados por <i>T. foetus</i>	16

5.4 Viabilidade espermática após manutenção em extrato da incubação de <i>T. foetus</i>	19
6 DISCUSSÃO.....	22
7 CONCLUSÕES.....	27
8 BIBLIOGRAFIA.....	28
9 TRABALHO CIENTÍFICO.....	38

RIBEIRO, C.M. **Estudo da interação “in vitro” entre *Tritrichomonas foetus* e espermatozoides bovinos**. Botucatu, 2008. 85p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Tritrichomonas foetus é o agente etiológico da tricomoníase bovina, enfermidade infecto-contagiosa de transmissão venérea que causa abortamento e infertilidade nestes animais. No touro, a infecção se estabelece na superfície epitelial do pênis e do prepúcio. Entretanto, são escassas as informações da susceptibilidade dos espermatozoides bovinos a este parasita. A proposta deste trabalho foi estudar, *in vitro*, a interação entre *T. foetus* e espermatozoides bovinos, bem como avaliar o efeito dos produtos extracelulares secretados pelo parasita sobre espermatozoides bovinos. Com esse objetivo, foi utilizado sêmen comercial criopreservado de cinco touros férteis (*Bos taurus taurus*, raça holandesa). Os espermatozoides foram selecionados pela técnica do gradiente de percoll. Posteriormente, foram mantidos por três horas com *T. foetus* ou com o extrato da cultura de *T. foetus*, contendo produtos extracelulares secretados pelo parasita. Nos momentos 0, 1, 2 e 3 horas de manutenção, foram analisadas a motilidade espermática progressiva e a viabilidade espermática. Os resultados foram avaliados pela técnica da análise de variância não-paramétrica complementada com o teste de comparações múltiplas de Dunn. Observou-se que *T. foetus* adere a espermatozoides bovinos e expressa o seu gene para cisteína peptidase. Os produtos extracelulares secretados pelo *T. foetus* foram citotóxicos para os espermatozoides, causando a diminuição da motilidade espermática progressiva, embora não tenham ocasionado significativa diminuição da viabilidade espermática.

Palavras-chave: Apoptose; Motilidade espermática; *Tritrichomonas foetus*.

RIBEIRO, C.M. **Study of “in vitro” interaction between *Tritrichomonas foetus* and bovine spermatozoa.** Botucatu, 2008. 85p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACTS

Tritrichomonas foetus is the etiologic agent of bovine trichomoniasis, a contagious infectious disease of venereal transmission, which causes abortion and infertility in cattle. In bulls, the infection starts in the epithelial surface of the penis and prepuce. However, there is scarce information on bovine sperm susceptibility to such parasite. Thus, the aim of this work was to study, *in vitro*, the interaction between *T. foetus* and bovine sperm cells, as well as to evaluate the effect of extracellular products secreted by the parasite on these cells. Cryopreserved commercial semen was obtained from five fertile bulls (*Bos taurus taurus*, Holstein). Spermatozoa were selected through the Percoll gradient technique and kept for three hours with *T. foetus* or *T. foetus* culture extract containing extracellular products secreted by the parasite. At 0, 1, 2 and 3 h, the progressive motility and the viability of spermatozoa were assessed. Results were evaluated through non-parametric analysis of variance complemented with Dunn's test for multiple comparison. *T. foetus* adhered to the bovine spermatozoa, expressing its gene for cysteine peptidase. The extracellular products secreted by *T. foetus* were cytotoxic to the spermatozoa, decreasing their progressive motility although viability was not significantly decreased.

Keywords: Apoptosis; Sperm motility; *Tritrichomonas foetus*.

1 INTRODUÇÃO

Tritrichomonas foetus, protozoário parasita, é encontrado na superfície da mucosa urogenital dos bovinos, causando a tricomoniase bovina. Esta enfermidade causa prejuízos econômicos pelos efeitos diretos sobre a performance reprodutiva e, conseqüentemente, sobre a produtividade dos rebanhos infectados (ANDERSON et al., 1996; BONDURANT, 1997). Os sintomas clínicos da tricomoniase nas fêmeas incluem infertilidade, vaginite, piometra, morte embrionária, abortamento e infertilidade (PARSONSON et al., 1976; RHYAN, 1988).

No touro, *T. foetus* aloja-se preferencialmente na mucosa do pênis e do prepúcio, onde estabelece uma infecção crônica e assintomática (PARSONSON et al., 1974; RHYAN et al., 1999). A transmissão ocorre principalmente durante o coito de um touro infectado assintomático com uma fêmea susceptível (BONDURANT, 1997; MARDONES et al., 2008), porém, a transmissão mecânica iatrogênica do parasita pode ocorrer mediante instrumentos ginecológicos (YULE et al., 1989; RAE et al., 2004). Além disso, tem-se sugerido que *T. foetus* pode sobreviver em sêmen fresco e criopreservado e ser transmitido pela inseminação artificial (BARTLETT et al., 1947). Este evento pode ser considerado uma via em potencial para a introdução do parasita no processo da fertilização *in vitro*. Em um estudo preliminar, relatou-se que *T. foetus* não impediu o processo de fertilização *in vitro* e o desenvolvimento de embriões bovinos (BIELANSKI et al., 2004).

Entretanto, foi exposto que *T. foetus* pode aderir e provocar danos a células reprodutivas bovinas *in vitro*. O parasita foi capaz de aderir aos espermatozoides bovinos e, após duas horas de interação, foram observadas diminuição da motilidade e aglutinação espermática (BENCHIMOL et al., 2008). A exposição de oócitos ao *T. foetus* causou uma rápida adesão dos parasitas à zona pelúcida. Após seis horas de interação, os oócitos exibiram características morfológicas compatíveis com apoptose (BENCHIMOL et al., 2007). Porém, *T. foetus* pode também exercer seus efeitos citopáticos por meio de fatores de virulência secretados no meio de interação. Foi demonstrado que as cisteínas peptidases (CPs), que são secretadas pelo parasita, têm um efeito citopático sobre as células do trato reprodutivo bovino. CP8 obtido do

sobrenadante da cultura de *T. foetus* induz células epiteliais vaginais e uterinas bovinas à apoptose (SINGH et al., 2004; SINGH et al., 2005).

A infecção pelo *T. foetus* pode resultar na infertilidade transitória ou permanente da fêmea bovina. Tem sido sugerido que esta aparente infertilidade é em razão da morte embrionária, resultante da infecção pelo parasita (RHYAN et al., 1988). Entretanto, é possível que *T. foetus* tenha efeitos citopáticos sobre os espermatozoides, impedindo, desta maneira, o processo de fertilização. Por isso, são necessários mais estudos do mecanismo patogênico deste parasita para melhor compreensão da interação parasita-hospedeiro.

Este estudo foi proposto no sentido de contribuir para a compreensão da ação de *T. foetus* na patogenia da tricomoníase, face à escassez de informações específicas que tratem deste tema.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Tricomoníase bovina

A tricomoníase bovina é uma doença parasitária, infecto-contagiosa, de transmissão venérea que acomete os bovinos. É causada pelo protozoário parasita *T. fetus* que habita a superfície do epitélio do trato urogenital dos bovinos (HONIGBERG, 1978).

A tricomoníase bovina apresenta ampla distribuição mundial, ocorrendo de forma endêmica, principalmente em regiões em que o controle sanitário é deficiente ou o sistema de produção é extensivo, com utilização de monta natural (BONDURANT, 1997).

No Brasil, a tricomoníase foi diagnosticada pela primeira vez por Roehe (1948), que identificou o agente no sêmen de touros doadores de sêmen em central de inseminação artificial, no município de Montenegro, Rio Grande do Sul. Estudos posteriores registraram a incidência da tricomoníase bovina nos estados do Ceará, Paraíba, Pernambuco, Bahia (MELLO, 1954), São Paulo (RABELLO, 1955), Minas Gerais (MEGALE, 1963; PELLEGRIN e LEITE, 2003), Rio Grande do Sul (GOMES et al., 1991) e Rio de Janeiro (JESUS et al., 2004).

A transmissão de *T. fetus* acontece principalmente durante a cópula ou ainda pela inseminação artificial, já que *T. fetus* pode sobreviver em sêmen criopreservado (BIELANSKI et al., 2004)..

Nas fêmeas, o aparelho genital é totalmente colonizado, via vaginal, em duas semanas após a infecção, sendo o útero inicialmente o principal sítio de infecção (PELLEGRIN e LEITE, 2003). Os sintomas clínicos da tricomoníase nas fêmeas incluem infertilidade, vaginite, cervicite, endometrite, piometra, morte embrionária, repetição de cios a intervalos irregulares, abortamento e maceração fetal (BONDURANT, 1997).

No touro, os locais preferenciais da infecção são o pênis, o prepúcio e o orifício da uretra. Logo após a infecção, pode desenvolver-se um corrimento prepucial associado a pequenos nódulos na membrana prepucial. Depois disto, não existe qualquer sintomatologia clínica e a libido não é afetada. Desta maneira, o touro torna-se portador assintomático, podendo disseminar a doença (PARSONSON et al., 1974; BONDURANT, 1997). Touros com idade superior a cinco anos são duas vezes mais susceptíveis a *T. fetus*, uma vez

que com a idade aumenta-se a profundidade das criptas prepuciais, local na mucosa onde o parasita tem o seu nicho ecológico (RAE et al., 2004).

Alguns autores afirmam que certas raças são mais susceptíveis a *T. foetus*. Estudos revelaram que touros *Bos taurus taurus* têm risco aproximadamente seis vezes maior de infecção pelo parasita do que *Bos taurus indicus*. A maior suscetibilidade do grupo genético *Bos taurus taurus* está relacionada, possivelmente, à conformação anatômica do prepúcio dos touros (RAE et al., 2004; JESUS et al., 2004).

Uma vez que os sinais clínicos não são patognomônicos, é importante realizar o diagnóstico laboratorial. Este pode ser feito pela pesquisa direta em microscopia óptica de *T. foetus* em material fetal (fluidos do feto abortado e suas membranas fetais), em smegma de prepúcio e pênis de touros e em muco cervico-vaginal das fêmeas. Para a coleta do material pode ser realizado um lavado prepucial ou vaginal (BONDURANT, 1997; COBO et al., 2007). Outras técnicas têm sido empregadas no diagnóstico da tricomoniase bovina, tais como amplificação por reação em cadeia pela polimerase (PCR) e imunofluorescência indireta (CORBEIL et al., 2008).

Vários métodos podem ser utilizados para o controle da tricomoniase em rebanhos, como descarte periódico de touros acima de 5-6 anos; pesquisa do protozoário nos touros duas semanas antes da estação de monta e após o seu término; repouso sexual das fêmeas por, no mínimo, três ciclos consecutivos; descarte de todos os touros positivos e das fêmeas que falharem na concepção, abortarem ou apresentarem piometra, assim como as que forem comprovadamente positivas; e o não-aproveitamento de touros utilizados em parcerias (PELLEGRIN e LEITE, 2003).

2. 2 *Tritrichomonas foetus*

Segundo a classificação feita por Honigberg (1963), *T. foetus* pertence à família Trichomonadidae, ordem Trichomonadida, classe Zoomastigophora, filo Sarcomastigophora e reino Protista. Entretanto, uma classificação filogenética mais recente dos protozoários baseada na organização microtubular do citoesqueleto classifica *T. foetus* como pertencente à classe Parabasalia, filo Metamonada e reino Protista (DACKS et al., 2008).

T. foetus, *Tritrichomonas suis* (parasita do tubo digestivo e cavidade nasal de suínos) e *Tritrichomonas mobilensis* (parasita do tubo digestivo de macacos, principalmente ceco e cólon) foram considerados, após análise das sequências gênicas, como prováveis cepas ou variantes de uma mesma espécie (TACHEZY et al., 2002; KLEINA et al., 2004).

O hospedeiro da espécie *T. foetus* é o bovino. O parasita localiza-se na vagina e no útero da fêmea e na cavidade prepucial do macho. No local da infecção, os parasitas aderem à superfície apical das células epiteliais do hospedeiro (PARSONSON et al., 1976).

O organismo é piriforme, com aproximadamente 20 x 10µm, possuindo um único núcleo e quatro flagelos, cada um deles se originando num corpo basal localizado na extremidade anterior arredondada. Três dos flagelos são livres anteriormente, enquanto o quarto estende-se para trás, formando uma membrana ondulante ao longo do comprimento do organismo, continuando, posteriormente, como flagelo livre. Um dos principais mecanismos de nutrição de *T. foetus* é pela endocitose. A reprodução de *T. foetus* é assexuada por divisão binária. Em preparações frescas, o organismo é móvel, avançando por meio de movimentos espasmódicos giratórios; os flagelos vibráteis e os movimentos da membrana ondulante são facilmente observados. Às vezes observam-se formas imóveis, arredondadas, provavelmente degenerativas (URQUHART et al., 1998).

T. foetus apresenta geralmente forma de trofozoita, embora possa apresentar também forma de pseudocisto, que não tem motilidade em virtude da internalização dos flagelos. A transformação do parasita na forma trofozoíta para pseudocisto pode ocorrer quando o parasita encontra-se em situações de estresse ou em decorrência da oscilação da temperatura (MARIANTE et al., 2004).

2. 3 Interação de *T. foetus* com as células do hospedeiro

Para entender melhor a patogenia da tricomoníase bovina, é importante conhecer o processo de interação de *T. foetus* com as células do hospedeiro. Sabe-se que os tricomonadídeos aderem às superfícies inertes (CAPPUCCINELLI e VARESIO, 1975), bem como a células mamíferas (ROCHA-AZEVEDO et al., 2005). A adesão de *T. foetus* a matriz extracelular e

a células epiteliais é um processo essencial para a manutenção do parasita no hospedeiro (PETRÓPOLIS et al., 2008). Silva Filho e De Souza (1988) observaram que *T. foetus* adere às células do rim de cão (MDCK). Rocha-Azevedo et al. (2005) observaram que o parasita adere às células do carcinoma cervical humano (HeLa). Além disso, *T. foetus* adere fortemente a eritrócitos (DA SILVA et al., 1996). Estes protozoários interagem com as células do sistema imunológico como macrófagos e eosinófilos; porém, *T. foetus* é fagocitado por estas células (DE AZEVEDO et al., 1991; DE AZEVEDO e DE SOUZA, 1996).

Receptores para a laminina estão localizados em toda a superfície do parasita, inclusive em seu flagelo recorrente e têm papel fundamental no processo de adesão (SILVA FILHO et al., 1988). Petrópolis et al. (2008) demonstraram que *T. foetus* adere fortemente às células HeLa, quando o meio de interação foi suplementado com laminina.

T. foetus exerce seus efeitos citotóxicos pelo contato físico estabelecido entre as duas superfícies celulares, durante o processo de adesão, pela liberação de fatores de virulência lançados no meio de interação ou em ambos os processos (SILVA FILHO e DE SOUZA, 1988; KENNETT e HOOK, 2002). Segundo Rocha-Azevedo et al. (2005), quanto maior o contato entre o parasita e a célula do hospedeiro, maior a indução da secreção de fatores de virulência pelo parasita.

Singh et al. (1999) observaram que, *in vitro*, *T. foetus* adere a células epiteliais vaginais bovinas e causa ruptura severa desta monocamada celular após 48 horas de interação. Quando retirados os parasitas, a monocamada celular restabeleceu-se. Este resultado sugere que o efeito citotóxico de *T. foetus* é dependente de contato.

O mecanismo pelo qual o protozoário exerce sua citotoxicidade, isto é, se é dependente ou independente de contato, pode variar entre os subtipos do parasita. Rocha-Azevedo et al. (2005) analisaram a interação de células HeLa e parasitas da cepa K, subtipos K1, K2, K3, K4 e K5. Os autores observaram que diferentes subtipos de *T. foetus* apresentaram diferentes graus de citotoxicidade, sendo os subtipos K1 e K5 os mais citotóxicos, pois destruíram a monocamada celular. Entretanto, o sobrenadante da cultura de *T. foetus*

subtipo K2 continha uma peptidase, secretada pelo parasita, com alta atividade proteolítica capaz de destruir a monocamada de células HeLa.

Estudos foram relatados sobre a interação de *T. foetus* e as células do hospedeiro bovino, facilitando a compreensão da patogenia da tricomoníase. Em um deles, Benchimol et al. (2006) isolaram ovidutos de fêmeas bovinas e inocularam *T. foetus* na porção do istmo. Após o período de interação, os ovidutos foram abertos e fixados para análise em microscopia eletrônica. Como resultado, constatou-se que *T. foetus* adere a células epiteliais não-ciliadas do oviduto. Evidências morfológicas de apoptose celular foram observadas nessas células, como condensação da cromatina e vacuolização do citoplasma.

Em outro relato, oócitos de fêmeas bovinas foram colhidos e, em alguns deles, as células do complexo cumulus-oócito foram removidas; em outros, estas células foram mantidas. Os oócitos foram incubados com diferentes concentrações de *T. foetus*. Os parasitas aderiram aos oócitos após uma hora de interação e foram capazes de atravessar a zona pelúcida e deslocá-la, formando um grande espaço entre as células do cumulus e a zona pelúcida. Mudanças morfológicas das células do cumulus foram visualizadas pela microscopia eletrônica de transmissão, como condensação da cromatina e intensa vacuolização do citoplasma, alterações estas compatíveis com apoptose (BENCHIMOL et al., 2007).

Exposição de embriões bovinos ao protozoário *T. foetus* resultou na aderência de muitos parasitas à zona pelúcida destes embriões. Alguns parasitas causaram fenestras na zona pelúcida pela ação de seus flagelos; porém, o parasita não conseguiu interferir no desenvolvimento embrionário. Os autores concluíram que *T. foetus* pode não afetar o processo de fertilização e o desenvolvimento embrionário (BIELANSKI et al., 2004).

2. 3.1 Fatores de virulência

A citotoxicidade de *T. foetus* está diretamente relacionada aos seus fatores de virulência. Este protozoário produz uma variedade de fatores de virulência que incluem proteases intracelulares e extracelulares importantes na invasão e na degradação dos tecidos do hospedeiro (KENNET e HOOK, 2002).

T. foetus sintetiza adesinas que são fatores de virulência. Alguns autores sugerem que os lipofosfoglicanos presentes na superfície da membrana de *T.*

foetus são adesinas de superfície (SHAIA et al., 1998) e permitem ao parasita aderir às células (DA SILVA et al., 1999). Entretanto, a expressão das adesinas pode variar entre as diferentes linhagens do protozoário (SHAIA et al., 1998).

Fatores de virulência, como as neuraminidases, estão presentes na membrana plasmática do protozoário (DIAS FILHO et al., 1999) e podem ser secretadas no meio de interação, sendo capazes de degradar o ácido siálico da superfície de eritrócitos (SILVA FILHO et al., 1989).

T. foetus também libera, no meio de interação, hemolisinas capazes de causar a lise de eritrócitos bovinos (BURGESS et al., 1990) e hemaglutininas aptas a aglutinar estes eritrócitos (KENNET e HOOK, 2002).

Além destes fatores de virulência, o parasita também secreta cisteínas peptidases (CPs) que estão associadas à citotoxicidade exercida sobre as células do hospedeiro (SINGH et al., 2005).

2. 3. 1.1 Cisteínas peptidases de *T. foetus*

T. foetus possui, pelo menos, 10 cisteínas peptidases com massa molecular entre 18 e 120 kDa (LOCKWOOD et al., 1987), as quais podem ser secretadas pelo parasita no meio de interação (THOMFORD et al., 1996; KENNETT e HOOK, 2002). Elas são semelhantes à catepsina L e à catepsina B, apresentam, respectivamente, atividade endopeptidase e carboxipeptidase e são ativas sob o pH ácido dos lisossomos (MALLINSON et al., 1995).

Estas peptidases são codificadas por, no mínimo, sete genes. O gene correspondente a CP8 é o mais transcrito em *T. foetus* e codifica uma proteína de 30 kDa (MALLINSON et al., 1995; Singh et al., 2004). Pela análise da sequência de aminoácidos, constatou-se que CP8 é um membro da família da catepsina L (LUCAS et al., 2008).

Várias funções biológicas são propostas para as cisteínas peptidases de tricomonandídeos, incluindo evasão da resposta imunológica e aquisição de nutrientes (KUMMER et al., 2008). Além disso, são capazes de degradar fibronectina, fibrinogênio, lactoferrina, albumina, imunoglobulinas do tipo G, A e M (TALBOT et al., 1991) e o componente C3 do sistema complemento (KANIA et al., 2001).

Descrições de citotoxicidade relacionada à atividade de CP8 de *T. foetus* foram relatadas. Singh et al. (2004) demonstraram que *T. foetus* ou CP8,

secretada por esse parasita e presente no sobrenadante da cultura, induz células epiteliais vaginais bovinas à apoptose. A citotoxicidade dependeu da concentração de parasitas ou de CP8. Em outro relato, Singh et al. (2005) observaram que CP8, presente no sobrenadante da cultura de *T. foetus*, induz células epiteliais uterinas bovinas à apoptose. A citotoxicidade também dependeu do tempo de incubação e da concentração de CP8.

2.4 Espermatozoides

Os espermatozoides originam-se nos testículos a partir de células primordiais da linhagem espermatogênica localizadas nos túbulos seminíferos, num processo denominado espermatogênese. Do ponto de vista biológico, os espermatozoides cumprem suas funções por meio da cauda (motilidade), acrossoma (atividade enzimática preparatória da fecundação) e núcleo (transmissão do patrimônio genético) (MIES FILHO, 1987). Para serem férteis, os espermatozoides devem apresentar pelo menos quatro atributos básicos, tais como: metabolismo para a produção de energia, motilidade progressiva, enzimas acrossomais intactas e membrana plasmática intacta (AMANN e PICKET, 1987).

A motilidade espermática representa a percentagem de espermatozoides com movimentos progressivos. A motilidade é essencial para o transporte dos espermatozoides pelo trato reprodutivo da fêmea e para a penetração do espermatozoide no oócito, durante a fertilização, sendo ela uma das características mais importantes do espermatozoide associada à habilidade de fertilizar, e uma expressão da viabilidade e da integridade estrutural do espermatozoide (DONNELLY et al., 1998).

A integridade da membrana plasmática espermática parece exercer papel crítico na sobrevivência do espermatozoide no trato genital da fêmea e é pré-requisito importante para o sucesso da fertilização (CROSS e HANKS, 1991). Entretanto, é uma das principais estruturas afetadas pela criopreservação (ANZAR et al., 2002). No início da fase de distúrbio da membrana, ocorre inicialmente uma assimetria dos fosfolipídios da membrana, ou seja, a translocação da fosfatidilserina da parte interna para a externa da membrana, sem que ocorra a ruptura desta, e nesta fase o espermatozoide sofre a apoptose (VERMES et al., 1995; MARTIN et al., 1995). Em um estágio

posterior, os espermatozóides, já em necrose, perdem a integridade da membrana plasmática. Espermatozoides em necrose não apresentam motilidade, já que são células mortas. É importante citar que a percentagem de espermatozoides vivos e viáveis no sêmen está relacionada à fertilidade (JANUSKAUSKAS et al., 2003).

Está documentado que microrganismos patogênicos presentes no trato urogenital de homens e animais machos são uma importante causa de infertilidade. Muitos desses microrganismos influenciam a motilidade e a viabilidade espermática. A diminuição da motilidade espermática pode estar associada a metabólitos citotóxicos e/ou fatores de virulência, liberados pelos microrganismos presentes no trato urogenital (SYLLA et al., 2005). Em um estudo, Liu et al. (2002) observaram que *Staphylococcus aureus* não adere a espermatozoides de homens, nem induz mudanças morfológicas ou aglutinação espermática; entretanto, este microrganismo diminuiu significativamente a motilidade espermática após quatro horas de incubação com os espermatozoides. Em bovinos, *Mycoplasma mycoides ssp. mycoides* diminuiu a motilidade espermática, porque esse microrganismo desestabiliza a organização dos microtúbulos do axonema desses espermatozoides (SYLLA et al., 2005).

Tuttle et al. (1977) incubaram *Trichomonas vaginalis*, oriundo de mulheres com tricomoníase, em diferentes concentrações com espermatozoides de homens não-infectados. A análise dos espermatozoides foi feita por microscopia óptica, e os autores observaram a diminuição da motilidade espermática, que foi dependente da concentração de parasitas e do tempo de incubação. Não houve aglutinação destes espermatozoides após a interação com o parasita.

Em um único estudo com *T. foetus* e espermatozoides bovinos criopreservados, foi observado que os parasitas aderiram aos espermatozoides e, após duas horas de incubação, houve intensa aglutinação espermática e morte de espermatozoides (BENCHIMOL et al., 2008).

3 OBJETIVOS

A proposta deste trabalho é estudar os efeitos de interação entre *T. foetus* e espermatozoides bovinos sobre a expressão gênica da cisteína peptidase (CP8) de *T. foetus* e análise do efeito direto do extrato da incubação do parasita sobre a motilidade e a viabilidade espermáticas de sêmen bovino criopresevado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 *Tritrichomonas foetus*

T. foetus cepa K (SILVA FILHO et al., 1986) foi mantido em meio TYM Diamond's (DIAMOND, 1957), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Nutricell – Nutrientes celulares, Campinas, SP - Brasil), a 37°C com 5% CO₂, e cultivado a cada 24 horas no Laboratório de Diagnóstico Molecular, Departamento de Microbiologia e Imunologia - Instituto de Biociências (UNESP, Botucatu, Brasil). Para o experimento, *T. foetus* foi colhido na fase log de crescimento, centrifugado a 900 X g por 15 minutos em meio TYM Diamond's sem soro e depois suspenso em meio sintético de fluido de oviduto (SOF) (Nutricell – Nutrientes celulares, Campinas, SP - Brasil) (HOLM et al., 1999). O número de *T. foetus* foi padronizado a 1×10^6 parasitas/mL.

4.2 Extrato da incubação de *T. foetus*

Após a incubação de 1×10^6 *T. foetus*/mL em meio SOF por três horas a 37°C, obteve o sobrenadante por centrifugação a 400 X g por 10 minutos, o qual foi filtrado em membrana com poro de 0,22 µm estéril.

4.3 Espermatozoides

Para o experimento, foram utilizados semens criopreservados de cinco touros (*Bos taurus taurus*, raça holandesa) com fertilidade comprovada em programas comerciais de inseminação artificial. Todas as amostras (20 palhetas de 250 µL) eram da mesma partida comercial. O descongelamento dos semens foi feito em banho-maria a 40°C por 20 segundos. Em seguida, os espermatozoides foram selecionados pela técnica de centrifugação em gradiente de percoll como descrito por Gorus e Pipeleers (1981), a qual consistiu em adicionar as amostras de sêmen sobre a preparação do gradiente contendo 1 mL de percoll a 90% (Nutricell – Nutrientes celulares, Campinas, SP – Brasil) e 1 mL de percoll a 45% (Nutricell – Nutrientes celulares, Campinas, SP – Brasil). Após a centrifugação a 900 X g por 30 minutos, o pellet contendo os espermatozoides foi ressuspensionado em 3 mL de meio X-Cell® (IMV Technologies, USA) e centrifugado a 400 X g por cinco minutos. Em seguida, após a remoção do sobrenadante, aos espermatozoides do pellet foram adicionados 200 µL de meio SOF. Para a constatação das interações

dos espermatozoides ou do extrato de cultura de protozoário, o número de espermatozoides foi padronizado a 1×10^6 espermatozoides/mL. Os procedimentos experimentais foram realizados separadamente para cada touro.

4.4 Desenho experimental

Para a análise da interação de *T. foetus* com os espermatozoides, por meio da expressão de CP8 de *T. foetus*, os parasitas a uma concentração de 1×10^6 /mL foram adicionados em 1 mL de meio SOF, contendo 1×10^6 espermatozoides/mL, e incubados por até três horas a 37°C com 5% de CO₂.

Para a análise do efeito direto do extrato da cultura do parasita sobre a motilidade e viabilidade espermática, 1×10^6 espermatozoides/mL foram suspensos em 1 mL do extrato da cultura de *T. foetus* ou 1 mL do meio SOF (controle) por até três horas a 37°C.

4.5 Análise da expressão de CP8 de *T. foetus* durante a interação com espermatozoides bovinos

A análise da expressão gênica da cisteína peptidase de *T. foetus* (número de acesso X87781) foi realizada pela PCR, após transcrição reversa (RT-PCR) das amostras nos momentos 0, 1, 2 e 3 horas de incubação. Esses procedimentos foram realizados no Laboratório de Diagnóstico Molecular, Departamento de Microbiologia e Imunologia - Instituto de Biociências (UNESP, Botucatu, Brasil).

4.5.1 Extração do RNA

Para a extração do RNA de *T. foetus* foi utilizado o Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corporation, USA) conforme protocolo recomendado pelo fabricante. Ambas, concentração e pureza do RNA, foram monitoradas por um espectrofotômetro (Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer; NanoDrop, USA). Em seguida, as amostras de RNA foram tratadas com RQ1 RNase-Free DNase Kit (Promega, USA).

4.5.2 RT-PCR

A síntese do cDNA foi realizada com a enzima ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega, USA) conforme protocolo recomendado pelo fabricante. Para a amplificação do cDNA pela PCR foram empregados o forward primer (5'– TCT CAG CTA TCC AAG CTG CCG AAT) e o reverse primer (5'– TGG TTG AAC CTT CAG CAC CGA AAC) que amplificam um produto de 456 pb da região de CP8 de *T. foetus*. Os primers foram desenhados pelo programa PrimerQuest (www.idtdna.com). A reação foi desenvolvida para um volume final de 25 µL, utilizando o kit Go Taq Green Master Mix (Promega, USA) com a adição de 4 µL de cDNA por reação e 10pmol de cada primer. A amplificação foi feita pelo termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf Scientific, Inc., Westbury, NY, USA) e as condições da reação foram: 94 °C / 5 minutos, 40 ciclos de 94 °C / 1 minuto, 60 °C / 1 minuto e 72 °C / 1 minuto seguidos 72 °C / 5 minutos. Após visualização em gel de agarose corado com SYBR Safe dye (Invitrogen, USA) sob transiluminador UV, foram consideradas positivas as amostras com banda de 456 pb. Como controle positivo, foi utilizada uma amostra de DNA extraída de *T. foetus* e, como controle negativo, foi utilizada água ultrapura estéril.

4.6 Avaliação da motilidade espermática

Para a análise da motilidade progressiva (%) durante a incubação com o extrato da cultura do parasita ou em meio SOF foi usado Computer-Assisted Sêmen Analysis – CASA modelo IVOS-12 – Hamilton Thorne Biosciences (IMV Technologies, USA), adequadamente padronizado com o set-up para sêmen bovino, no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (UNESP, Botucatu, Brasil). As análises foram realizadas a partir de alíquotas de 5 µL de sêmen incubado nos diferentes tempos, transferidas a Makler counting Chamber (Sefi-medical Instruments, Haifa, Israel). Objetos incorretamente identificados como espermatozoides eram desconsiderados na análise. Nos momentos 0, 1, 2, e 3 horas de incubação dos espermatozoides no sobrenadante ou no meio SOF (controle) foi avaliada a motilidade espermática progressiva dos espermatozoides. O resultado foi expresso em percentagem.

4.7 Avaliação da viabilidade espermática pela técnica de citometria de fluxo

Com 0, 1, 2 e 3 horas de incubação dos espermatozoides no extrato da cultura do parasita ou em meio SOF (controle), a viabilidade espermática foi analisada pela técnica da citometria de fluxo com Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen, USA) no Laboratório de Citometria de Fluxo, Hemocentro – Faculdade de Medicina (UNESP, Botucatu, Brasil). Para isso, espermatozoides (1×10^5 espermatozoides/mL) foram adicionados em tubos para citometria de fluxo contendo 200 μ L do tampão de ligação fornecido pelo kit. Em seguida, os espermatozoides foram centrifugados a 900 X g por 15 minutos. Posteriormente, em cada tubo foram adicionados 5 μ L de anexina V-FITC (AN) e 5 μ L de iodeto de propídio (IP). Os tubos contendo os espermatozoides foram agitados e incubados por 15 minutos no escuro. Em seguida, 400 μ L do tampão de ligação foram adicionados em cada tubo e as amostras analisadas pelo aparelho FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). A população de espermatozoides foi delimitada mediante histograma bidimensional dos parâmetros FSC (forward light scatter), o qual confere informações sobre o tamanho celular, versus SSC (side light scatter) que emite informações sobre a granulosidade celular interna. Desta maneira, restringiu-se somente à análise dos espermatozoides. Foi padronizada a aquisição de dez mil eventos dentro da população de espermatozoides. Para os espermatozoides selecionados dentro da população de interesse, a percentagem foi definida nos quadrantes: espermatozoides viáveis (AN-/PI-), espermatozoides em apoptose (AN+/PI-), espermatozoides em início de necrose (AN+/PI+), espermatozoides em necrose (AN-/PI+) (ANZAR et al., 2002).

4.8 Análise estatística

Foi utilizada a técnica da análise de variância não-paramétrica para o modelo com dois fatores, complementada com o teste de comparações múltiplas de Dunn (ZAR, 1999). Todas as comparações foram realizadas no nível de 5% de significância.

5 RESULTADOS

5.1 Espermatozoides bovinos aderem a *T. foetus*

Aos 30 minutos de manutenção da mistura de 1×10^6 espermatozoides/mL selecionados por centrifugação em gradiente de percoll com 1×10^6 /mL de *T. foetus* em meio SOF a 37°C com 5% de CO₂, observou-se que os espermatozoides bovinos aderiram, pela cabeça e cauda, ao corpo celular do *T. foetus*, demonstrando haver uma interação entre ambos.

5.2 *T. foetus* expressa o gene para CP8 durante interação com espermatozoides

A expressão do gene para CP8 de *T. foetus* foi avaliada nos momentos 0, 1, 2, e 3 horas de incubação do parasita em meio SOF (controle) ou em meio SOF, contendo espermatozoides bovinos. Como resultado, demonstrou-se que o gene para CP8 é continuamente expresso por *T. foetus* incubado em meio SOF, independente da presença dos espermatozoides (Figura 1).

5.3 A motilidade progressiva espermática foi alterada por produtos extracelulares secretados por *T. foetus*

O resultado da análise da motilidade espermática progressiva pelo sistema CASA é visualizado na tabela 1. Observou-se não haver diminuição da motilidade progressiva dos espermatozoides mantidos no meio SOF (controle) durante as três horas de experimento. Entretanto, os espermatozoides mantidos no extrato da incubação de *T. foetus* apresentaram diminuição da motilidade progressiva após uma hora. A percentagem de espermatozoides com motilidade progressiva após três horas foi menor no grupo do extrato da incubação que a do grupo controle.

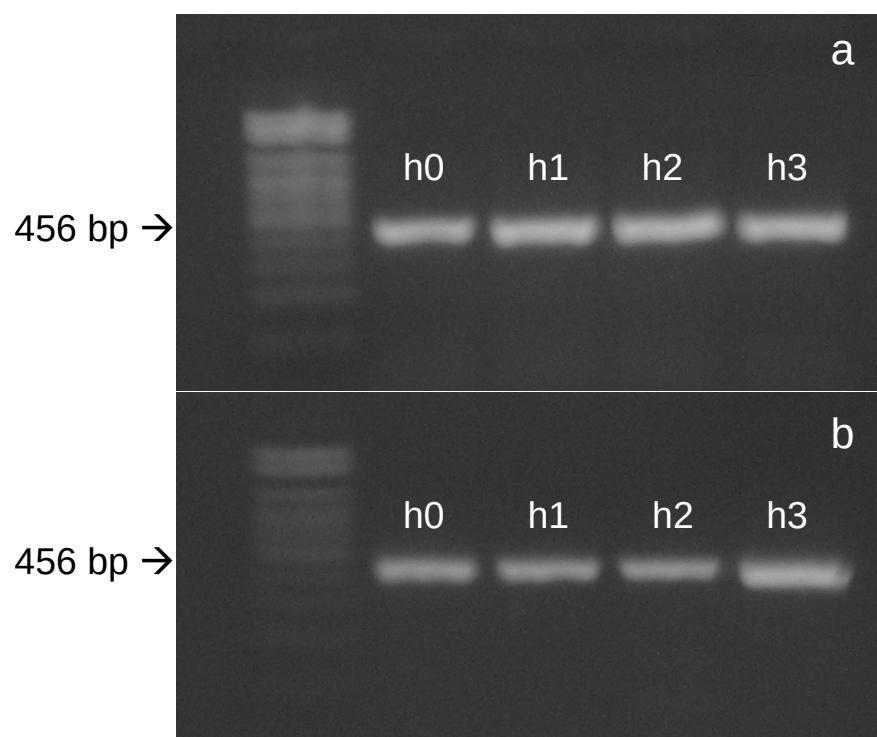


FIGURA 1: Análise da expressão gênica de CP8 de *T. foetus*, correspondendo a uma banda de 456pb (a) e da expressão gênica de CP8 durante a interação *T.foetus*-espermatozoide (b), nos momentos 0 (h0), 1 (h1), 2 (h2) e 3 (h3) horas.

TABELA 1: Percentagem de espermatozoides móveis, analisada pelo sistema CASA, durante manutenção no meio SOF (controle) ou no extrato de incubação de *T. foetus* nos momentos 0,1, 2 e 3 horas.

Grupo	Tempo de manutenção (horas)			
	0	1	2	3
SOF(controle)	65,0	63,0	60,0 ^a	50,0 ^a
(n=5)	(50,0-86,0)*	(58,0-67,0)	(42,0-64,0)	(38,0-57,0)
Extrato	67,0 ^A	42,0 ^{AB}	38,0 ^{bAB}	20,0 ^{bB}
(n=5)	(50,0-80,0)	(20,0-54,0)	(23,0-42,0)	(17,0-33,0)

Valores com diferentes letras minúsculas na mesma coluna ou com diferentes letras maiúsculas na mesma linha diferem significativamente ($P > 0.05$).

SOF: meio sintético de fluido de oviduto

() * limite (mín-máx)

5.4 Viabilidade espermática após manutenção em extrato da incubação de *T. foetus*

Os resultados da análise da viabilidade espermática obtidos em citometria de fluxo com annexin V-FITC (AN) e iodeto de propídio (PI) durante a manutenção em extrato da incubação do parasita ou em meio SOF estão sumarizados na tabela 2. Após três horas de manutenção, a percentagem de espermatozoides viáveis (AN-/PI-) diminuiu em ambos os grupos avaliados. A partir das duas horas, a percentagem de espermatozoides viáveis no extrato da incubação de *T. foetus* foi maior do que no grupo controle.

Em todos os tempos de manutenção e para ambos os grupos, foi observada percentagem reduzida de células anexina-V FITC positivas (AN+/PI-), indicando haver poucos espermatozoides em apoptose. O sêmen de um touro em particular apresentou um aumento da percentagem de células em apoptose (10,6%) após três horas de manutenção no extrato da incubação de *T. foetus*; entretanto, isso não foi suficiente para causar diferença significativa entre os grupos estudados que apresentaram diferença apenas no momento inicial (Figura 2). Os espermatozoides mantidos no extrato da incubação de *T. foetus* apresentaram maior percentagem de espermatozoides em apoptose no final do experimento em relação ao momento inicial.

A maioria das células anexina-V FITC positivas foi também iodeto de propídio positivas (AN+/PI+). Estas células eram espermatozoides em início de necrose com membranas plasmáticas comprometidas. A percentagem de espermatozoides em início de necrose não foi significantemente diferente entre os grupos, em nenhum dos momentos do experimento, e ambos os grupos tiveram elevação de espermatozoides desta classe no momento final em relação ao inicial.

Foi observado um aumento do número de espermatozoides em necrose (AN-/PI+) durante o período experimental em ambos os grupos, o que corresponde a um decréscimo na viabilidade espermática ao longo do período de manutenção.

TABELA 2: Percentagem de espermatozoides viáveis (AN-/PI-), espermatozoides em apoptose (AN+/PI-), espermatozoides em início de necrose (AN+/PI+) e espermatozoides em necrose (AN-/PI+), mantidos em SOF (controle) ou em extrato de incubação de *T.foetus* nos momentos 0, 1, 2 e 3 horas.

Espermatozoides	Grupo	Tempo de manutenção (horas)			
		0	1	2	3
AN-/PI-	SOF(controle) (n=5)	64,8 ^A	52,6 ^A	38,1 ^{bAB}	28,1 ^{bB}
		(47,1-73,5)*	(41,1-54,8)	(34,5-49,5)	(21,0-34,8)
	Extrato (n=5)	69,4 ^A	66,0 ^A	51,4 ^{aAB}	33,2 ^{aB}
		(60,4-74,2)	(52,6-64,3)	(49,7-52,6)	(32,8-46,9)
AN+/PI-	SOF(controle) (n=5)	0,69 ^a	1,01	0,49	0,67
		(0,47-1,68)	(0,44-1,08)	(0,19-0,93)	(0,60-1,26)
	Extrato (n=5)	0,38 ^{bB}	0,57 ^{AB}	0,75 ^{AB}	0,99 ^A
		(0,15-0,76)	(0,51-1,43)	(0,48-1,88)	(0,53-10,60)
AN+/PI+	SOF(controle) (n=5)	28,7 ^B	36,0 ^{AB}	45,1 ^{AB}	55,5 ^A
		(20,5-44,8)	(34,7-47,7)	(38,9-50,5)	(39,3-62,1)
	Extrato (n=5)	24,6 ^B	34,4 ^{AB}	36,2 ^{AB}	45,2 ^A
		(20,1-33,4)	(25,9-36,0)	(32,4-52,6)	(39,2-51,3)
AN-/PI+	SOF(controle) (n=5)	6,1 ^B	10,1 ^{AB}	14,1 ^A	16,2 ^A
		(5,0-6,5)	(9,2-12,6)	(11,4-16,6)	(15,7-25,0)
	Extrato (n=5)	5,6 ^B	9,0 ^{AB}	11,0 ^{AB}	12,7 ^A
		(4,9-6,1)	(8,7-12,1)	(8,6-14,6)	(6,8-21,1)

Valores com diferentes letras minúsculas na mesma coluna ou com diferentes letras maiúsculas na mesma linha diferem significativamente ($P > 0.05$).

SOF: meio sintético de fluido de oviduto

() * limite (mín–máx)

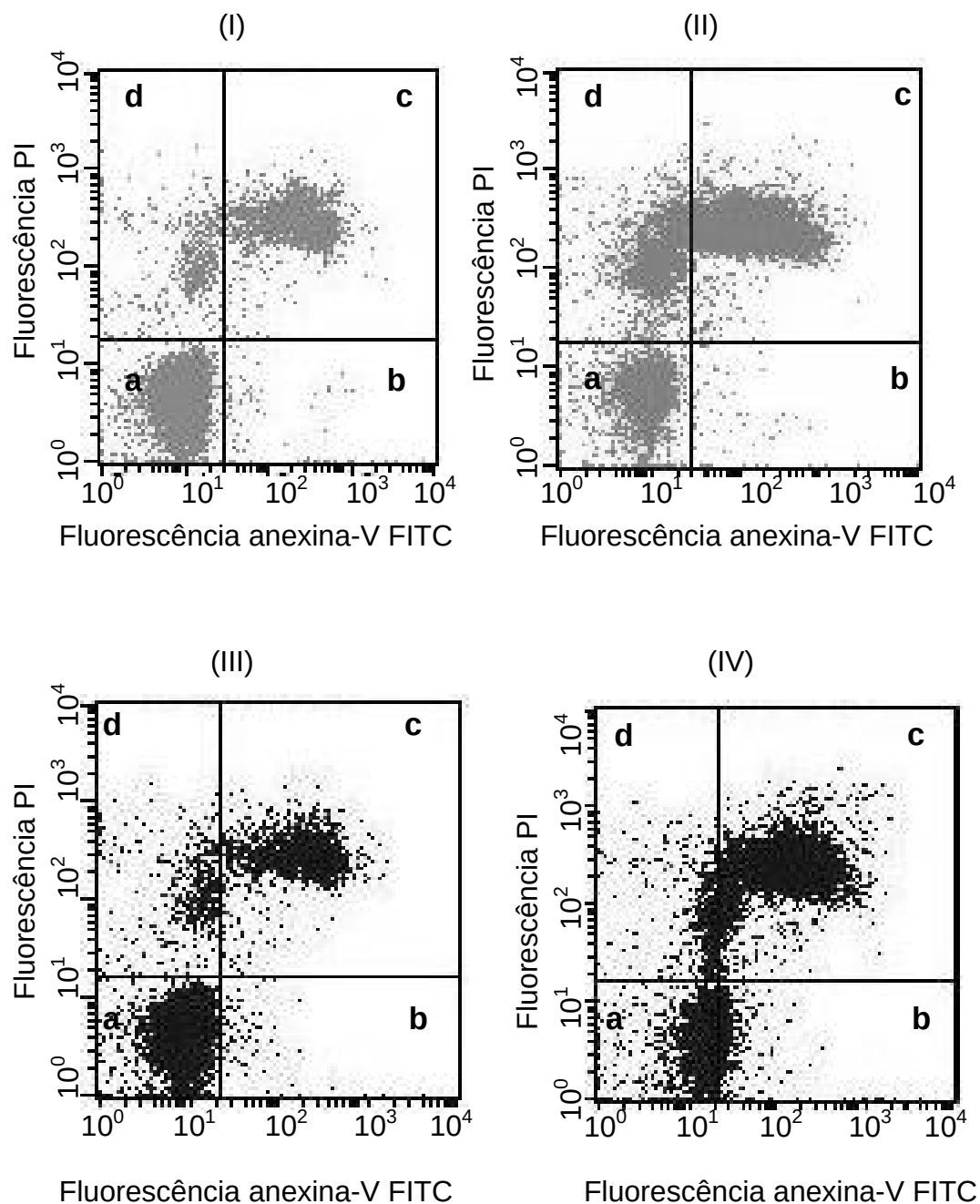


FIGURA 2: Histogramas obtidos pela análise da citometria de fluxo dos espermatozoides mantidos em SOF (controle), nos momentos 0 (I) e 3 horas (II) ou no extrato de incubação de *T. foetus* nos momentos 0 (III) e 3 horas (IV). (a) Espermatozoides viáveis (AN-/PI-). (b) Espermatozoides em apoptose (AN+/PI-). (c) Espermatozoides em início de necrose (AN+/PI+). (d) Espermatozoide em necrose (AN-/PI+). Observe que há uma maior população de espermatozoides em apoptose após três horas de manutenção, no extrato de incubação de *T. foetus* (IV).

6 DISCUSSÃO

Embora seja bem conhecido e documentado que *T. foetus* cause infertilidade em bovinos, são escassos os estudos sobre os mecanismos pelos quais *T. foetus* pode provocar infertilidade nesses animais (CLARK et al., 1986; RHYAN et al., 1988). É provável que a infecção por *T. foetus* impeça o processo de fertilização ou interrompa a gestação antes do reconhecimento materno; porém, muitos destes casos não são notificados.

Os resultados do presente estudo revelados na tabela 1 indicam que, após duas horas de manutenção dos espermatozoides no extrato da incubação de *T. foetus*, os produtos extracelulares secretados por *T. foetus* causaram diminuição significativa da motilidade progressiva dos espermatozoides *in vitro* em relação ao controle. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Benchimol et al. (2007), que observaram uma diminuição da motilidade de espermatozoides bovinos após duas horas de interação com *T. foetus*, bem como com os resultados encontrados por Han et al. (2004), que investigaram *in vitro* os efeitos dos metabólitos produzidos pelo *T. vaginalis* em espermatozoides humanos, constatando uma diminuição da motilidade espermática proporcional ao tempo de incubação dos espermatozoides no sobrenadante da cultura do parasita.

A motilidade é essencial para o transporte dos espermatozoides pelo trato reprodutivo da fêmea e para a penetração destes no oócito durante a fertilização (DONNELLY et al., 1998). Kathiravan et al. (2008) encontraram uma correlação positiva entre a motilidade espermática progressiva e a percentagem de fertilização. Entretanto, microrganismos patogênicos presentes no trato urogenital dos bovinos podem causar a diminuição da motilidade espermática. Sylla et al. (2005) observaram que *Mycoplasma mycoides ssp. mycoides* desestabilizou a organização dos microtúbulos do axonema de espermatozoides bovinos e alterou o mecanismo de transporte destas células, o que resultou na diminuição da habilidade de fertilização dos espermatozoides *in vitro*.

Baseado nos relatos anteriores de que a motilidade espermática é importante para o processo de fertilização, sugere-se, neste estudo, a hipótese de que *T. foetus* possa reduzir a taxa de concepção por interferir na motilidade espermática. Constatou-se que os produtos extracelulares de *T. foetus*

causaram diminuição da motilidade espermática e o contato direto dos espermatozoides com o parasita causou intensa aglutinação, podendo ter fortes implicações sobre o mecanismo de transporte deste espermático. A confirmação desta hipótese requer investigações futuras.

Os tricomonandídeos produzem uma variedade de fatores de virulência que podem ser importantes para a invasão e a destruição do tecido do hospedeiro, incluindo adesinas (SHAIA et al., 1998), proteases (THOMFORD et al., 1996), hemaglutininas (NAGAO et al., 2000), hemolisinas (BURGESS et al., 1990) e cisteína peptidase (MALLINSON et al., 1995). As CPs de *T. foetus* têm sido observadas na mucosa cervical de novilhas experimentalmente infectadas com o parasita (BASTIDA-CORCUERA et al., 2000).

Kania et al. (2001) demonstraram que a transcrição do gene para CP8 pode ser detectada por RT-PCR. Os autores observaram que esse gene foi expresso dentro do útero de fêmeas experimentalmente infectadas por *T. foetus*. No presente estudo, após análise da transcrição do gene para CP8 pela RT-PCR, visualizada na figura 1, sugere-se a hipótese de que os produtos extracelulares secretados por *T. foetus* presentes no sobrenadante constituem fatores de virulência do parasita no meio de interação. Um desses fatores de virulência pode ser CP8 de *T. foetus*, já que o parasita expressou continuamente o gene para essa peptidase, na presença ou na ausência de espermatozoides bovinos. Entretanto, os efeitos do extrato da incubação de *T. foetus* podem não ter sido exclusivamente mediados pelo CP8, podendo estar presentes diversos outros produtos extracelulares secretados por *T. foetus*.

Singh et al. (2004) e Singh et al. (2005) demonstraram que CP8 pode induzir apoptose em culturas de células epiteliais vaginais e uterinas bovinas. Os autores sugerem que a indução de apoptose, em vez de necrose, pode ser benéfica para o parasita por limitar a resposta inflamatória, que poderia ser prejudicial para este

Baseado nestes relatos, este estudo analisou se os produtos extracelulares secretados pelo *T. foetus* causariam a perda da viabilidade espermática e induziriam espermatozóides bovinos a apoptose ou necrose por meio da técnica da citometria de fluxo com o uso das sondas fluorescentes anexina-V FITC e iodeto de propídio, que detectam simultaneamente espermatozoides em apoptose ou necrose.

A anexina-V é uma proteína que tem afinidade para fosfolipídios e, quando conjugada com o fluorocromo fluorescente isotiocianato (FITC), apresenta maior afinidade para a fosfatidilserina localizada na parte externa da membrana do espermatozoide em apoptose, enquanto o iodeto de propídio é capaz de penetrar no espermatozoide que perdeu a integridade da membrana (VERMES et al., 1995). A associação destas sondas fluorescentes para a análise da viabilidade espermática foi descrita por Januskauskas et al. (2003). Estes autores utilizaram a técnica da citometria de fluxo associada à anexina-V FITC e ao iodeto de propídio para demonstrarem que sêmen criopreservado de touros apresenta, após o descongelamento, um aumento do número de espermatozoides em início de necrose, isto é, células anexina-V FITC e iodeto de propídio positivas (AN+/IP+).

No presente estudo, considerando-se os resultados da tabela 2, observa-se que não houve perda significativa da viabilidade espermática após três horas de manutenção dos espermatozoides com o extrato da incubação de *T. foetus* de forma distinta daquela observada no grupo-controle. Esses resultados diferem dos encontrados por Benchimol et al. (2007), que demonstraram que, após duas horas de interação de *T. foetus* com espermatozoides bovinos, os parasitas causaram perda significativa da viabilidade dos espermatozoides bovinos (>90%). Entretanto, estes autores demonstraram os efeitos diretos da interação espermatozoides/parasita, e não do extrato contendo produtos extracelulares secretados pelo *T. foetus* como no presente trabalho.

Essa divergência de resultados pode ser ainda em decorrência dos diferentes procedimentos utilizados para a preparação dos espermatozoides. No presente estudo, foi aplicada a técnica do gradiente de percoll para obtenção de espermatozoides livres do meio diluidor de preservação, para aqueles com cinética adequada e para aqueles com maior percentual de membrana plasmática íntegra. Entretanto, Benchimol et al. (2007) estudaram os efeitos de *T. foetus* sobre sêmen criopreservado descongelado, sem utilização de uma técnica de separação espermática e empregaram a técnica de coloração com eosina/negrosina.

No sêmen criopreservado descongelado, o número de espermatozoides em apoptose com membrana plasmática íntegra pode aumentar até 30-40%

(ANZAR et al., 2002). Esses espermatozoides podem não ser corados com eosina; desta maneira, pode-se superestimar a percentagem de espermatozoides viáveis imediatamente após a descongelação do sêmen.

Os espermatozoides em apoptose representam uma fase transitória entre os viáveis e os necrosados. Durante a fase inicial de distúrbios da função da membrana, ocorre uma assimetria dos fosfolipídios, antes da integridade da membrana a ser perdida (JANUSKAUSKAS et al., 2003). Portanto, os espermatozoides em apoptose tornam-se necrosados rapidamente após a incubação a 37°C (ANZAR et al., 2002).

No presente experimento, foi usado o meio SOF para manter os espermatozoides durante os testes de interação com o extrato da incubação de *T. foetus*. No estudo de Benchimol et al. (2007), foi usado o meio de cultura TCM 199. Martins et al. (2007) observaram que o meio de TCM 199 confere pouca proteção ao espermatozoide, causando uma alta taxa de danos ao DNA, com consequente diminuição da viabilidade espermática. Este efeito pode estar implicado na baixa percentagem de viabilidade espermática após duas horas de interação com *T. foetus*, observada por Benchimol et al. (2007).

Pode-se observar, na tabela 2, que não houve diferença significativa na percentagem de espermatozoides em apoptose ou em necrose entre o grupo de espermatozoides incubados com o extrato da incubação de *T. foetus* ou em meio SOF. Entretanto, como visualizado na figura 2, o sêmen de um touro em particular apresentou um aumento na percentagem de espermatozoides em apoptose após o período de três horas de incubação com o extrato. É possível que os espermatozoides deste touro fossem mais susceptíveis aos efeitos dos produtos extracelulares de *T. foetus*. Resultados como estes ainda não foram relatados na literatura consultada e requerem investigações futuras para elucidar suas implicações.

Neste estudo, constatou-se que *T. foetus* sobrevive e expressa seu gene para CP8 na presença ou não de espermatozoides bovinos em meio SOF e, embora os produtos extracelulares secretados pelo parasita não causem diminuição da viabilidade espermática, levaram à diminuição da motilidade espermática progressiva que, aliada à aglutinação espermatozoide/parasita, pode prejudicar a habilidade de fertilização *in vitro* dos espermatozoides. Por

hipótese, é possível que este processo ocorra também *in vivo*, podendo estar implicado no processo de infertilidade dos bovinos infectados pelo *T. foetus*.

7 CONCLUSÕES

Nas condições de realização deste estudo, chega-se às seguintes conclusões:

- *T. foetus* expressa o gene para cisteína peptidase independentemente da interação com espermatozoides bovinos.

- Os produtos extracelulares de *T. foetus* têm efeito citotóxico sobre os espermatozoides, refletindo em diminuição da motilidade.

- Os produtos extracelulares de *T. foetus* não têm efeitos citotóxicos sobre a viabilidade espermática *in vitro*, após três horas de manutenção.

8 BIBLIOGRAFIA

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Vet. Sci.*, v.7, p.145-173, 1987.

ANDERSON, M.L.; BONDURANT, R.H.; CORBEIL, R.R.; CORBEIL, L.B. Immune and inflammatory responses to reproductive tract infection with *Tritrichomonas foetus* in immunized and control heifers. *J. Parasitol.*, v.82, p.594-600, 1996.

ANZAR, M.; HE, L.; BUHR, M.M.; KROETSCH, T.G.; PAULS, K.P. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biol. Reprod.*, v.66, p.354-360, 2002.

BARTLETT, D.W.; TEETER, K.G.; UNDERWOOD, P.C. Artificial insemination as a means of transmission of bovine venereal trichomoniasis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.11, p.114-115, 1947.

BASTIDA-CORCUERA, F.; BUTLER, J.E.; HEYERMANN, H.; THOMFORD, J.W.; CORBEIL, L.B. *Tritrichomonas foetus* extracellular cysteine proteinase cleavage of bovine IgG2 allotypes. *J. Parasitol.*, v.86, p.328-332, 2000.

BENCHIMOL, M.; DIAS, A.J.B.; DA SILVA FONTES, R. Interaction of *Tritrichomonas foetus* and the bovine oviduct in an organ culture model. *Vet. Parasitol.*, v.140, p.244-250, 2006.

BENCHIMOL, M.; DA SILVA FONTES, R.; DIAS, A.J.B. *Tritrichomonas foetus* damages bovine oocytes in vitro. *Vet. Res.*, v.38, n.3, p.399-408, 2007.

BENCHIMOL, M.; DE ANDRADE ROSA, I.; DA SILVA FONTES, R.; DIAS, A. J.B. Trichomonas adhere and phagocytose sperm cells: adhesion seems to be a prominent stage during interaction. *Parasitol. Res.*, v.102, n.4, p.597-604, 2008.

BIELANSKI, A.; GHAZI, D.F.; PHIPPS-TOODD, B. Observations on the fertilization and development of preimplantation bovine embryos *in vitro* in the presence of *Tritrichomonas foetus*. *Theriogenology*, v.61, p.821-829, 2004.

BONDURANT, R.H. Pathogenesis, diagnosis, and management of trichomoniasis in cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, v.13, n.2, p.345-361, 1997.

BURGESS, D.E.; KNOBLOCK, K.F.; DAUGHERTY, T.; ROBERTSON, N.P. Cytotoxic and hemolytic effects of *Tritrichomonas foetus* on mammalian cell. *Infect. Immun.*, v.58, n.11, p.3627-3632, 1990.

CAPPUCCINELLI, P.; VARELIO, L. The effect of cytochalasin B, colchicine and vinblastine on the adhesion of *Trichomonas vaginalis* to glass surfaces. *Int. J. Parasitol.*, v.5, n.1, p.57-61, 1975.

CLARK, E.H.; DUFTY, J.H.; PARSONSON, I.M. The frequency of infertility and abortion in cows infected with *Tritrichomonas foetus* var. brisbane. *Aust. Vet. J.*, v. 63, n.1, p.31-32, 1986.

COBO, E.R.; FAVETTO, P.H.; LANE, V.M.; FRIEND, A.; VANHOOSER, K.; MITCHELL, J.; BONDURANT, R.H. Sensitivity and specificity of culture and PCR of smegma samples of bulls experimentally infected with *Tritrichomonas foetus*. *Theriogenology*, v.68, p.853-860, 2007.

CORBEIL, L.B.; CAMPERO, C.M.; VAN HOOSER, K.; BONDURANT, R.H. Detection of trichomonad species in the reproductive tracts of breeding and virgin bulls. *Vet. Parasitol.*, v.154, p.226-232, 2008.

CROSS, N.L.; HANKS, S.E. Effects of cryopreservation on human sperm acrosomes. *Hum. Reprod.*, v.6, p.1279-1283, 1991.

DACKS, J.B.; WALKER, G.; FIELD, M.C. Implications of the new eukaryotic systematics for parasitologists. *Parasitol. Int.*, v.57, n.2, p.97-104, 2008.

DA SILVA, N.S.; DIAS FILHO, B.P.; DE SOUZA, W. Structural changes at the site of *Tritrichomonas foetus*-erythrocyte interaction. *Cell Struct. Funct.*, v.21, n.4, p.245-250, 1996.

DA SILVA, N.S.; DIAS FILHO, B.P.; DE SOUZA, W. Identification and localization of an adhesin on the surface of *Tritrichomonas foetus*. *Parasitol. Res.*, n.85, p.984-992, 1999.

DE AZEVEDO, N.L.; SILVA FILHO, F.C., DE SOUZA, W. The interaction of *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis* with macrophages. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, v.23, n.2, p.319-326, 1991.

DE AZEVEDO, N.L.; DE SOUZA, W. An ultrastructural and cytochemical study of *Tritrichomonas foetus*-eosinophil interaction. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, v.28, n.2, p.243-249, 1996.

DIAMOND, L.S. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J. Parasitol.*, v.43, p.488-490, 1957.

DIAS FILHO, B.P.; BENCHIMOL, M.; ANDRADE, A.F.; ANGLUSTER, J.; DE SOUZA, W. Purification and immunocytochemical localization of neuraminidase from *Tritrichomonas foetus*. *Parasitology*, v.118, p.17-25, 1999.

DONNELLY, E.T.; LEWIS, S.E.; MCNALLY, J.A.; THOMPSON, W. *In vitro* fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology in IVF outcome. *Fertil. Steril.*, v.70, p. 305–314, 1998.

GOMES, M.J.P.; FERNANDES, J.C.T.; SILVA, C.E.; SOUSA, S.T.B. Identificação do *Tritrichomonas foetus* em bovinos do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Arq. Fac. Vet. UFRGS.*, v.19, p.103-111, 1991.

GORUS, F.K.; PIPELEERS, D.G. A rapid method for the fractionation of human spermatozoa according to their progressive motility. *Fertil Steril.*, v.35, n.6, p.662-665, 1981.

HAN, Q.; LIU, J.; WANG, T.; XIAO, H.; FANG, Z. Influence of the metabolite produced by *Trichomonas vaginalis* on human sperm motility *in vitro*. *Zhonghua Nan Ke Xue.*, v.10, n.4, p.272-275, 2004.

HOLM, P.; BOOTH, P.J.; SCHMIDT, M.H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOF medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology*, v. 52, p.683-700, 1999.

HONIGBERG, B.M. Evolutionary and systematic relationships in the flagellate order Trichomonadida Kirby. *J. Protozool.*, v.10, p.10-63, 1963.

HONIGBERG, B.M. Trichomonads of veterinary importance. In: KRIER, J. P. *Parasitic Protozoa*. New York :Academic Press, 1978. v.2, chap.3, p.153-273.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology*, v.60, p.743-758, 2003.

JESUS, V.L.T.; PEREIRA, M.J.S.; ALVES, P.A.M.; DA FONSECA, A.H. Fatores intrínsecos do hospedeiro associados à prevalência de tricomonose genital bovina. *Braz. J. Vet. Parasitol.*, v.13, n.4, p.159-163, 2004.

KANIA, S.A.; REED, S.L.; THOMFORD, J.W.; BONDURANT, R.H.; HIRATA, K.; CORBEIL, R.R.; NORTHE, M.J.; CORBEIL, L.B. Degradation of bovine complement C3 by trichomonad extracellular proteinase. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, n.78, p.83-96, 2001.

KATHIRAVAN, P.; KALATHARAN, J.; JOHN EDWIN, M.; VEERAPANDIAN, C. Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with *in vitro* fertility in zona-free hamster oocytes. *Anim. Reprod. Sci.*, v.104, p.9-17, 2008.

KENNETT, M.J.; HOOK, R.R. *Tritrichomonas foetus*: characterization of isolates and partial purification of a secreted cytotoxin. *Exp. Parasitol.*, n.102, p.1-8, 2002.

KLEINA, P.; BETTIM-BANDINELLI, J.; BONATTO, S.L.; BENCHIMOL, M.; BOGO, M. Molecular phylogeny of Trichomonadidae family inferred from ITS-1, 5.8S rRNA and ITS-2 sequences. *Int. J. Parasitol.*, v.34, n.8, p.963-970, 2004.

KUMMER, S.; HAYES, G.R.; GILBERT, R.O.; BEACH, D.H.; LUCAS, J.J.; SINGH, B.N. Induction of human host cell apoptosis by *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases is modulated by parasite exposure to iron. *Microb. Pathog.*, v.44, n.3, p.197-203, 2008.

LIU, J.H.; LI, H.Y.; CAO, Z.G.; DUAN, Y.F.; LI, Y.; YE, Z.Q. Influence of several uropathogenic microorganisms on human sperm motility parameters *in vitro*. *Asian J. Androl.*, v.4, n.3, p.179-182, 2002.

LOCKWOOD, B.C.; NORTH, M.J.; SCOTT, K.I.; BREMNER, A.F.; COOMBS, G.H. The use of a highly sensitive electrophoretic method to compare the proteinases of trichomonads. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.24, n.1, p.89-95, 1987.

LUCAS, J.J.; HAYES, G.R.; KALSI, H.K.; GILBERT, R.O.; CHOE, Y.; CRAIK, C.S.; SINGH, B.N. Characterization of a cysteine protease from *Tritrichomonas foetus* that induces host-cell apoptosis. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.477, n.2, p.239-243, 2008.

MALLINSON, D.J.; LIVINGSTONE, J.; APPLETON, K.M.; LEES, S.J.; COOMBS, H.G.; NORTH, M.J. Multiple cysteine proteases of the pathogenic protozoon *Tritrichomonas foetus*: identification of seven diverse and differentially expressed genes. *Microbiology*, v.141, p.3077-3085, 1995.

MARDONES, F.O.; PEREZ, A.M.; MARTINEZ, A.; CARPENTER, T.E. Risk factors associated with *Tritrichomonas foetus* infection in beef herds in the Province of Buenos Aires, Argentina. *Vet. Parasitol.*, v.153, p.231-237, 2008.

MARIANTE, R.M.; LOPES, L.C.; BENCHIMOL, M. *Tritrichomonas foetus* pseudocysts adhere to vaginal epithelial cells in a contact-dependent manner. *Parasitol. Res.*, v.92, p.303–312, 2004.

MARTIN, S.J.; REUTELINGSPERGER, C.P.M.; MCGAHON, A.J.; RADER, J.A.; VAN SCHIE, R.C.A.A.; LAFACE, D.M.; GREEN, D.R. Earlier distribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.*, v.182, p.1545-1556, 1995.

MARTINS, C.F.; DODE, M.N.; BÁO, S.N.; RUMPF, R. The use of the acridine orange test and the TUNEL assay to assess the integrity of freeze-dried bovine spermatozoa DNA. *Genet. Mol. Res.*, v.6, n.1, p.94-104, 2007.

MEGALE, F. Identificação do *Trichomonas foetus* em Minas Gerais. *Arq. Esc. Vet. UFMG*, n.15, p.405, 1963.

MELO, M.R. Dados sobre a incidência da tricomonose bovina em alguns estados do Brasil. *Bol. Insemin. Artif.*, n.6, p.16-23, 1954.

MIES FILHO, A. *Reprodução dos Animais*. 6. ed. Porto Alegre: Sulina, 1987. p.314.

NAGAO, E.; YAMAMOTO, A.; IGARASHI, T.; GOTO, N.; SASA, R. Two distinct hemolysins in *Tritrichomonas tenax* ATCC 30207. *Oral Microbiol. Immunol.*, v.15, n.6, p.355-359, 2000.

PARSONSON, I.M.; CLARK, B.L.; DUFTY, J. The pathogenesis of *Tritrichomonas foetus* infection in the bull. *Aust. Vet. J.*, v.50, n.10, p.421-423, 1974.

PARSONSON, I.M.; CLARK, B.L.; DUFTY, J.H. Early pathogenesis and pathology of *Tritrichomonas foetus* infection in virgin heifers. *J. Comp. Pathol.*, v.86, p.59-66, 1976.

PELLEGRIN, O.A.; LEITE, C.R. *Atualização sobre tricomonose genital bovina*. 2003. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/publicações/online/DOC54>>. Acesso em: 18 abr. 2008.

PETRÓPOLIS, D.B.; FERNANDES RODRIGUES, J.C.; DA ROCHA-AZEVEDO, B.; SILVA FILHO, F.C. The binding of *Tritrichomonas foetus* to immobilized laminin-1 and its role in the cytotoxicity exerted by the parasite. *Microbiology*, v.154, p.2283-2290, 2008.

RABELLO, E.X. Incidência de *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller, 1928) em touros usados para inseminação artificial no Estado de São Paulo. *Rev. Fac. Med. Vet. São Paulo*, v.5, n.3, p.539-548, 1955.

RAE, D.O.; CREWS, J.E.; GREINER, E.C.; DONOVANA, G.A. Epidemiology of *Tritrichomonas foetus* in beef bull populations in Florida. *Theriogenology*, v.61, p.605-618, 2004.

RHYAN, J.C.; STACKHOUSE, L.L.; QUINN, W.J. Fetal and placental lesions in bovine abortion due to *Tritrichomonas foetus*. *Vet. Pathol.*, v.25, p.350-355, 1988.

RHYAN, J.C.; WILSON, K.L.; WAGNER, B.; ANDERSON, M.L.; BONDURANT, R.H.; BURGESS, D.E.; MUTWIRI, G.K.; CORBEIL, L.B. Demonstration of *Tritrichomonas foetus* in the external genitalia and of specific antibodies in preputial secretions of naturally infected bulls. *Vet. Pathol.*, v.36, p.406-411, 1999.

ROCHA-AZEVEDO, R.; DE MELO-BRAGA, M.B.; SILVA-FILHO, F.C. Intra-strain clonal phenotypic variation of *Tritrichomonas foetus* is related to the cytotoxicity exerted by the parasite to cultured cells. *Parasitol. Res.*, v.95, p.106-112, 2005.

ROEHE, R. Tricomoniase bovina. *Bol. Dir. Prod. Anim.*, v.4, n.6, p.21-26, 1948.

SHAIA, C.I.; VOYICH, J.; GILLIS, S.J.; SINGH, B.N.; BURGESS, D.E. Purification and expression of the Tf190 adhesin in *Tritrichomonas foetus*. *Infect. Immun.*, v.66, n.3, p. 1100-1105, 1998.

SILVA FILHO, F.C.; ELIAS, C.A.; SOUZA, W. Effect of far-ultraviolet radiation and near-ultraviolet radiation on the surface of the protozoan *Tritrichomonas foetus*. *Photoch. Photobiol.*, v.43, p.505-507, 1986.

SILVA FILHO, F.C.; DE SOUZA, W. The interaction of *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus* with epithelial cells in vitro. *Cell Struct. Funct.*, v.13, n.4, p.301-10, 1988.

SILVA-FILHO, F.C.; DE SOUZA, W.; LOPES, J.D. Presence of laminin-binding proteins in trichomonads and their role in adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, n.85, p.8042-8046, 1988.

SILVA FILHO, F.C.; TOSTA, M.X.; SARAIVA, E.B.; DE SOUZA, W. *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus* secrete neuraminidase into culture medium. *Mol. Biochem. Parasitol.*, n.35, p.73-78, 1989.

SINGH, B.N.; LUCAS, J.J.; BEACH, D.H.; SHIN, S.T.; GILBERT, R.O. Adhesion of *Tritrichomonas foetus* to bovine vaginal epithelial cells. *Infect. Immun.*, v.67, n.8, p.3847-3854, 1999.

SINGH, B.N.; LUCAS, J.J.; HAYES, G.R.; KUMAR, I.; BEACH, D.H.; FRAJBLAT, M.; GILBERT, O.; SOMMER, U.; COSTELLO, C.E. *Tritrichomonas foetus* induces apoptotic cell death in bovine vaginal epithelial cells. *Infect. Immun.*, v.72, n.7, p.4151-4158, 2004.

SINGH, B.N.; HAYES, G.R.; LUCAS, J.J.; BEACH, D.H.; GILBERT, R.O. *In vitro* cytopathic effects of a cysteine protease of *Tritrichomonas foetus* on cultured bovine uterine epithelial cells. *Am. J. Vet. Res.*, v.66, n.7, p.1181-1186, 2005.

SYLLA, L.; STRADAIOLI, G.; MANUALI, E.; ROTA, A.; ZELLI, R.; VINCENTI, L.; MONACI, M. The effect *Mycoplasma mycoides ssp. mycoides* LC of bovine origin on in vitro fertilizing ability of spermatozoa and embryo development. *Anim. Reprod. Sci.*, v.85, p.81-93, 2005.

TACHEZY, J.; TACHEZY, R.; HAMPL, V.; SEDINOVA, M.; VANACOVA, S.; VRLIK, M.; VAN RANST, M.; FLEGR, J.; KULDA, A.J. Cattle pathogen *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller, 1928) and pig commensal *Tritrichomonas suis* (Gruby & Delafond, 1843) belong to the same species. *J. Eukaryot. Microbiol.*, v.49, n.2, p.154-163, 2002.

TALBOT, J.A.; NIELSEN, K.; CORBEIL, L.B. Cleavage of proteins of reproductive secretions by extracellular proteinases of *Tritrichomonas foetus*. *Can. J. Microbiol.*, v.37, n.5, p.384-90, 1991.

THOMFORD, J.W.; TALBOT, J.A.; IKEDA, J.S.; CORBEIL, L.B. Characterization of extracellular proteinases of *Tritrichomonas foetus*. *J. Parasitol.*, v.82, n.1, p.112-117, 1996.

TUTTLE, J.P.; HOLBROOK, T.W.; DERRICK, F.C. Interference of human spermatozoal motility by *Trichomonas vaginalis*. *J. Urol.*, v.118, n.6, p.1024-1025, 1977.

URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; DUNN, A.M.; JENNINGS, F.W. *Parasitologia Veterinária*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p.304.

VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C.P.M. A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescence labelled annexin V. *J. Immunol. Methods*, v.180, p.39-52, 1995.

VEZNIK, Z.; SVECOVA, D.; ZAJICOVA, A.; RECKOVA, Z.; RUBES, J. The interrelationship between quality parameters of sperm before and after separation by gradient centrifugation. *Vet. Med.*, v.52, n.10, p.423-429, 2007.

YULE, A.; SKIRROW, S.Z.; BONDURANT, R.H. Bovine trichomoniasis. *Parasitol. Today*, v.5, p.373-377, 1989.

ZAR, J. H. *Biostatistical analysis*. 4. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1999. p.663.

Trabalho Científico

Trabalho a ser enviado para a revista Theriogenology (ISSN: 0093-691X)

Preparation of manuscripts:

- 1)** Manuscripts should be written in clear, concise and grammatically correct English and formatted according to the instructions listed below (also consult additional notes regarding style at the end of this document).
- 2)** Pages must be numbered at the bottom right corner and each line must be numbered on the left side. Every page of the manuscript (including abstracts, footnotes and references) must be doubled-spaced, all margins <2.5 cm, and text left justified.
- 3)** Starting with the Introduction, sections are to be numbered (1. Introduction); subordinate numbering is allowed (e.g. 1.1.), to a maximum of about four levels (1.1.1.1.). Titles and subtitles should be typed on a separate line, without indentation. Capitalize only the first letter of the first word of the title and all subtitles. Leave one blank line before the first paragraph and after the last paragraph of a section, and indent each paragraph.
- 4)** Title, which should be clear, descriptive, not too long, with minimal abbreviations (capitalize only the first letter of the first word)
- 5)** Initials, surnames and professional affiliations of all author(s). Current and complete postal addresses of all authors and affiliate institutions
Corresponding Author with complete contact information including mailing address, complete telephone and fax numbers, and e-mail address
- 6)** Abstract: on a separate page, not to exceed 250 words. The abstract should include the objective, main findings and primary conclusion(s) of the paper.
- 7)** Five keywords (indexing terms): capitalize the first letter of each word or term and separate successive items with a semicolon.

8) Introduction: should provide a brief context for the research. There should be three parts: a clear, brief description of the nature and extent of the problem; a brief review of the essential literature; and a statement of how the present study challenges, expands or improves existing knowledge. The final paragraph should include the hypothesis or objective(s), but should not include a summary of the findings of the current study.

9) Materials and Methods: must contain enough information to allow a competent worker to duplicate the study. Materials and equipment should be named specifically, including the manufacturer/supplier, city, state/province (if applicable) and country. Descriptions of animals should include species, breed, sex, and age as well as (if appropriate) husbandry methods, climate, photoperiod, and geographic location. Experimental methods (including the experimental design) should be comprehensive and logical. The method of statistical evaluation must be clearly described (cite the software used). Indicate treatment and response variables, main effects and interactions, define experimental units and how they were allocated into groups.

10) Results: should fully describe the outcome, including all information described as collected in Materials and Methods. The use of tables and figures is encouraged, especially for data that cannot be easily described in the text. Emphasize important points in the text, but do not excessively repeat data in tables and figures. Avoid discussion and interpretation of the data in the Results section.

11) Discussion: includes principles, relationships, and general truths. First refer to the outcome of the present study, indicate how it is similar or different to that previously reported, and discuss your interpretation of the state of knowledge in the area. Theoretical or practical implications of the work should be discussed, and suggestions made regarding future studies. Major conclusions and implications should be stated in a brief, final paragraph.

12) Acknowledgements: cite sources of funds, materials and assistance.

13) Figure Legends: should not be excessively long and detailed but should provide sufficient context that the figure can be interpreted in the absence of the rest of the paper.

14) All tables should be referred to by consecutive Arabic numerals (e.g., Table 1) in the order in which they are first cited. Avoid excessively large tables and those without no or few significant differences. Each table should be on a separate page (at the end of the manuscript). Each table should have a brief, self-explanatory title. Column headings should be brief, self-explanatory and have minimal repetition. Standard abbreviations of units of measurement should be enclosed within parentheses. For column and row headings, capitalize only the first letter of the first word. Vertical lines should not be used to separate columns (leave extra space between columns). Information essential to interpreting the table should appear as a footnote below the table. .

15) All illustrations should be referred to by consecutive Arabic numerals (e.g., Fig. 1). Units should be indicated in the figures. Each illustration should be identified by its number. An indication of the top of the illustrations is required in all cases where it is not immediately apparent. Illustrations should be consistent with the layout and size of the journal page (illustrations can be placed in a single column or across the entire page). Illustrations should be large enough to allow a reduction of 50%. Ensure that the lettering is big enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible. The lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal. Capitalize only the first letter of the first word of all axis labels. Each illustration should have a caption (typed on a separate sheet). Explanations should be given in the legend. Text in the illustrations should be kept to a minimum.

16) All references cited in the text should be listed in a References section (after Acknowledgements). Ensure there is complete agreement between references cited in the text and those listed in the References section and that all information in the References section is accurate and complete. References in the text should be indicated by Arabic numerals in brackets (with multiple citations separated by a comma and no space between the comma and the

next citation); three or more consecutive citations should be separated by a hyphen, i.e. [1,2] [1-3] [1-3,5]. In the Reference section, references must be listed in numerical (NOT alphabetical) order, with reference number enclosed in brackets. References should use the following style:

a. For periodicals

Connor EE, Ashwell MS, Dahl GE. Characterization and expression of the bovine growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor. *Domest Anim Endocrinol* 2002;22:189-200.

b. For books

Betteridge KJ. Embryo Transfer. In: *Reproduction in Domesticated Animals*, King GJ (Ed.), World Animal Science B9, Elsevier B.V., 1993, pp. 413-418.

c. For multi-author books

Van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC. *Principles of Laboratory Animal Science*, Revised Edition. Elsevier B.V., 2001.

Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press". References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

***Tritrichomonas foetus* extracellular products decrease bull sperm progressive motility**

C.M. Ribeiro¹, M.B. Falleiros², S.D. Bicudo³, J.P. Araujo Júnior⁴, M.A. Golim⁵,
F.C. Silva Filho⁶, C.R. Padovani⁷, J.R. Modolo⁸

⁸Corresponding author: José Rafael Modolo

Department of Veterinary Hygiene and Public Health, Faculty of Veterinary
Medicine and Animal Science, São Paulo State University, Botucatu, São
Paulo, Brazil.

Mail box: 524, Botucatu, Zip code: 18.618-000, São Paulo, Brazil

Tel.: +55 14 3811 6270 Fax: +55 14 3811 6075

E-mail address: jrmodolo@fmvz.unesp.br

¹Claudia de Mello Ribeiro

Department of Veterinary Hygiene and Public Health, Faculty of Veterinary
Medicine and Animal Science, São Paulo State University, Botucatu, São
Paulo, Brazil.

E-mail address: clau.mribeiro@yahoo.com.br

²Marcel Barbosa Falleiros

Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, Faculty of
Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, Botucatu,
São Paulo, Brazil.

E-mail address: marcelbf@ufpr.br

³Sony Dimas Bicudo

Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, Botucatu, São Paulo, Brazil.

E-mail address: sony@fmvz.unesp.br

⁴João Pessoa Araújo Júnior

Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences, São Paulo State University, Botucatu, São Paulo, Brazil.

E-mail address: jpessoa@ibb.unesp.br

⁵Marjorie Assis Golim

Botucatu Blood Center, School of Medicine, São Paulo State University, Botucatu, São Paulo, Brazil.

E-mail address: marjorie@fmb.unesp.br

⁶Fernando Costa e Silva Filho

Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

E-mail address: fcsf@biof.ufrj.br

⁷Carlos Roberto Padovani

Department of Biostatistics, Bioscience Institute, São Paulo State University, Botucatu, São Paulo, Brazil.

E-mail address: bioestatistica@ibb.unesp.br

Abstract

Tritrichomonas foetus is the etiologic agent of bovine trichomoniasis, a contagious infectious disease of venereal transmission, which causes abortion and infertility in cattle. In bulls, the infection starts in the epithelial surface of the penis and prepuce. However, there is scarce information on bovine sperm susceptibility to such parasite. Thus, the aim of this work was to study, *in vitro*, the interaction between *T. foetus* and bovine sperm cells, as well as to evaluate the effect of extracellular products secreted by the parasite on these cells. Cryopreserved commercial semen was obtained from five fertile bulls (*Bos taurus taurus*, Holstein). Spermatozoa were selected through the Percoll gradient technique and kept for three hours with *T. foetus* or *T. foetus* culture extract containing extracellular products secreted by the parasite. At 0, 1, 2 and 3 h, the progressive motility and the viability of spermatozoa were assessed. Results were evaluated through non-parametric analysis of variance complemented with Dunn's test for multiple comparison. *T. foetus* adhered to the bovine spermatozoa, expressing its gene for cysteine peptidase. The extracellular products secreted by *T. foetus* were cytotoxic to the spermatozoa, decreasing their progressive motility although viability was not significantly decreased.

Keywords: *Tritrichomonas foetus*; Sperm motility; Sperm viability; Apoptosis; Necrosis.

1. Introduction

Trichomonas foetus is a protozoan parasite found in the surface of the urogenital mucosa of cattle, causing bovine trichomoniasis. This disease leads to economic damages due to its direct effects on the reproductive performance of infected herds, consequently affecting their productivity [1,2]. The clinical symptoms of trichomoniasis in females include infertility, vaginitis, pyometra, embryonic death, and abortion [3,4].

In bulls, *T. foetus* resides preferentially on the mucosa of the penis and prepuce, where it triggers a chronic and asymptomatic infection [5,6]. Transmission mainly occurs during the coitus between an asymptomatic infected bull and a susceptible female [2,7]; however, iatrogenic transmission may occur through gynecological instruments [8,9]. Besides, *T. foetus* has been suggested to survive in fresh and cryopreserved semen, as well as to be transmitted through artificial insemination [10], which can be considered a potential route for its introduction during *in vitro* fertilization. In a preliminary study, *T. foetus* did not prevent the *in vitro* fertilization and the development of bovine embryos [11].

However, *T. foetus* was already reported to adhere to and damage bovine reproductive cells *in vitro*. The parasite was capable of adhering to the bovine spermatozoa, leading to a decrease in their motility and agglutination after 2 h interaction [12]. Exposure of oocytes to *T. foetus* caused a rapid adhesion of parasites to the pellucid zone. After 6 h interaction, oocytes had morphological characteristics compatible with apoptosis [13]. However, *T. foetus* can also exert its cytopathic effects by secreting virulence factors into the

interaction medium. Cysteine peptidases (CPs), which are secreted by the parasite, have a cytopathic effect on the cells of the bovine reproductive tract. Also, CP8, obtained from *T. foetus* culture supernatant, induces apoptosis in vaginal epithelial and uterine cells of cows [14,15].

T. foetus infection may result in transitory or permanent infertility in cows. Such apparent infertility is probably due to embryonic death resultant of the infection by the parasite [4]. However, *T. foetus* may have cytopathic effects on spermatozoa, preventing the fertilization process. Therefore, further studies on the pathogenic mechanism of this parasite are needed to better understand the parasite-host interaction.

Thus, the present study aimed to improve the understanding of *T. foetus* action on the pathogeny of trichomoniasis, as there is scarce specific information on this subject.

2. Materials and methods

2.1. *Tritrichomonas foetus*

Tritrichomonas foetus K strain [16] was grown in Diamond TYM medium [17] supplemented with 10% fetal calf serum (Nutricell – Nutrientes celulares, Campinas, São Paulo State, Brazil) for 24 h, at 37°C, in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Then, the cells were collected by centrifugation, rinsed in serum-depleted Diamond TYM medium, counted in a hematimetric chamber, and suspended in modified synthetic oviductal fluid (SOF) [18] at 1x10⁶ parasites/mL.

2.2. *T. foetus* culture extract

After incubation of *T. foetus* (1x10⁶ parasites/mL) in SOF medium for 3 h at 37°C, the supernatant was obtained by centrifugation at 400 X g for 10 min and filtered through a sterile 0.2 µm membrane filter. The remnant was denominated *T. foetus* culture extract.

2.3. Spermatozoa

Cryopreserved semen was obtained from five fertile bulls (*Bos taurus taurus*, Holstein-Friesian) with fertility proven in commercial programs of artificial insemination. All semen samples (20 plastic straws of 250 µL) were of the same commercial batch. Thawing was performed by immersing straws for

20 s in a 40°C water bath. Then, the spermatozoa were selected through Percoll gradient, as previously described by Gorus and Pipeleers [19]. In brief, thawed semen was added to a gradient obtained with 1mL of 90% Percoll solution (Nutricell – Nutrientes celulares, Brazil) and 1mL of 45% Percoll solution (Nutricell – Nutrientes celulares, Brazil). After centrifugation at 900 X g for 30 min, the pellet containing the spermatozoa was resuspended in 3 mL X-Cell® medium (IMV Technologies, USA) and centrifuged at 400 X g for 5 min. The spermatozoa were then added to 200 µL SOF medium. To analyze the interaction sperm cell-*T. foetus* or sperm cell-*T. foetus* culture extract, the number of spermatozoa was standardized at 1×10^6 spermatozoa/mL. All studies were carried out separately for each bull.

2.4. Experimental design

For the analysis of sperm cell-*T. foetus* interaction, considering the expression of *T. foetus* CP8, the parasite at 1×10^6 /mL concentration was added to 1 mL SOF medium containing 1×10^6 spermatozoa/mL and incubated for until 3 h at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

To analyze the effect of *T. foetus* extracellular products on sperm cell motility and viability, 1×10^6 spermatozoa/mL were suspended in 1 mL *T. foetus* culture extract or 1mL SOF medium (control) for until 3 h at 37°C.

2.5. Expression analysis of the gene for CP8 during parasite-sperm cell interaction

2.5.1. Total RNA extraction

RNA expression concerning *T. foetus* CP8 (access number X87781) was followed at 0, 1, 2 and 3 h of parasite-sperm cell interaction carried out in 1mL SOF medium. Controls consisted of parasites before their interaction with spermatozoa. Total RNA from the parasites was obtained by using the Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corporation, USA) following the manufacturer's instructions. Both concentration and purity of the RNA samples were spectrophotometrically monitored by Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (NanoDrop, USA). Then, RNA samples were treated with RQ1 RNase-Free DNase Kit (Promega, USA).

2.5.2. Reverse Transcriptase – PCR

The respective cDNA was generated by using the ImProm-II™ Reverse Transcriptase Kit (Promega, USA) following the manufacturer's instructions. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of *T. foetus* cDNA was designed and performed as follows: forward primer (5'– TCT CAG CTA TCC AAG CTG CCG AAT) and reverse ones (5'– TGG TTG AAC CTT CAG CAC CGA AAC) were designed to amplify a 456bp band from a CP8 fragment using PrimerQuest (www.idtdna.com). The reaction was developed for a final volume of 25 µL using the kit Go Taq Green Master Mix (Promega, USA) with the

addition of 4 μ L cDNA for the reaction and 10 pmol of each primer. The amplification was performed in Eppendorf Mastercycler Gradient Thermocycler (Eppendorf Scientific, Inc., Westbury, NY, USA) and the adopted cycle conditions were: one cycle at 94°C for 5 min, forty cycles at 94°C for 1 min, one cycle at 60°C for 1 min, another cycle at 72°C for 1 min, and an additional cycle at 72°C for 5 min. Total DNA from *T. foetus* was used as positive control and water as negative control. The amplification efficiency was determined on 1.5% agarose gels in 1 x TBE buffer stained with SYBR Safe dye (Invitrogen, USA). The size of the amplified products was compared with 100kb standards (Norgen Biotek Corporation, USA) and the gels were photographed under UV transilluminator.

2.6. Analysis of sperm cell motility

To analyze sperm cell progressive motility (%) during incubation of spermatozoa in *T. foetus* culture extract or SOF medium (control), the Computer-Assisted Semen Analysis – CASA, version IVOS-12, Hamilton Thorne Biosciences (IMV Technologies, USA), was appropriately standardized with set-up for bovine semen. The analysis was carried out with 5 μ L semen aliquots incubated for different times and placed in a Makler Counting Chamber (Sefi-medical Instruments, Haifa, Israel). Objects incorrectly identified as spermatozoa were disregarded in the analysis. At 0, 1, 2, and 3 h incubation, the spermatozoa in supernatants or SOF medium were evaluated for progressive motility, and the result was expressed as percentage.

2.7. Flow cytometric analysis

At 0, 1, 2 and 3 h incubation, the spermatozoa in *T. foetus* culture extract or SOF medium (control) were analyzed for viability using flow cytometry with Annexin-V-FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen™, USA). Staining was conducted according to the protocol recommended by the manufacturer, with slight modifications. In brief, spermatozoa ($1 \times 10^5/\text{mL}$) were collected and suspended in 200 μL annexin-V binding buffer for 10 min. Then, the remaining product was centrifuged at 900 X g for 15 min, and aliquots of 100 μL were transferred to 5mL culture tubes supplemented with 5 μL annexin-V-FITC and 5 μL propidium iodide. The tubes were gently mixed and further incubated for 15 min in the dark. Additional 400 mL binding buffer was added to each tube prior to analysis. The samples were analyzed in a FACSCalibur™ flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) equipped with an argon-ion LASER 488 nm and CellQuest™ software. Acquisition gate was applied to the FSC/SSC two-dimensional histogram to restrict the analysis to spermatozoa and to eliminate small debris and other particles from other analyses. This method allows the identification of four distinct types of spermatozoa: viable spermatozoa (annexin-V-negative/PI-negative, AN-/PI-), apoptotic spermatozoa (annexin-V-positive/PI-negative, AN+/PI-), early necrotic spermatozoa (annexin-V-positive/PI-positive, AN+/PI+), and necrotic spermatozoa (annexin-V-negative/PI-positive, AN-/PI+) [20].

2.8. Statistical analysis

Nonparametric analysis and Dunn's nonparametric test for multiple comparisons were used [21]. Significance levels were set at 5%.

3. RESULTS

3.1. Bovine spermatozoa adhere to *T. foetus*

After 30 min incubation of the mixture containing 1×10^6 spermatozoa/mL, which were selected through centrifugation in Percoll gradient, with 1×10^6 /mL *T. foetus* in SOF medium at 37°C and 5% CO₂, bovine spermatozoa adhered by the head and tail to the cellular body of *T. foetus*, indicating interaction.

3.2. *T. foetus* expresses the gene for CP8 during the interaction with spermatozoa

Gene expression for *T. foetus* CP8 was evaluated at 0, 1, 2 and 3 h incubation of the parasite in SOF medium (control) or in SOF medium containing bovine spermatozoa. The gene for CP8 was continuously expressed by *T. foetus* incubated in SOF medium, independently of the presence of spermatozoa (Fig. 1).

3.3. Sperm cell progressive motility was changed by *T. foetus* extracellular products

The results of sperm cell progressive motility analysis using CASA are shown in Table 1. The progressive motility of spermatozoa kept in SOF medium (control) did not decrease over the three hours of the experiment. However, spermatozoa kept in *T. foetus* culture extract had reduced progressive motility

after 1 h. The percentage of spermatozoa with progressive motility after 3 h was lower in the culture extract than in the control group.

3.4. Sperm cell viability after interaction with *T. foetus* culture extract

The results of sperm viability assessed through flow cytometry using annexin-V-FITC (AN) and propidium iodide (PI) during incubation in *T. foetus* culture extract or SOF medium are summarized in Table 2. After 3 h, the percentage of viable spermatozoa (AN-/PI-) decreased in both evaluated groups. From 2 h, the percentage of viable spermatozoa in *T. foetus* culture extract was higher than in the control group.

At all evaluation times and in both groups, the percentage of positive annexin-V-FITC cells (AN+/PI-) decreased, indicating there were few spermatozoa in apoptosis. The semen of one bull had higher percentage of cells in apoptosis (10.6%) after 3 h interaction with *T. foetus* culture extract; however, this was not enough to cause a significant difference between the studied groups, which were different only at the initial period (Fig. 2). The spermatozoa kept in *T. foetus* culture extract presented higher percentage of apoptosis at the end of the experiment than at the initial period.

Most positive annexin-V-FITC cells were also positive for propidium iodide (AN+/PI+); these cells were spermatozoa in initial necrosis with compromised plasmatic membrane. The percentage of spermatozoa in initial necrosis was not significantly different between groups at any of the experimental periods and both groups had elevated spermatozoa of this class at the final period, relative to the initial one.

There was an increase in the number of spermatozoa in necrosis (AN-/PI+) during the experiment in both groups, which corresponded to a decrease in sperm cell viability throughout the incubation period.

4. Discussion

Although *T. foetus* is known to induce infertility in cattle, there are scarce studies on the mechanisms through which this process occur [22,4]. *T. foetus* infection probably prevents fertilization or interrupts gestation before maternal recognition and many of these cases are not notified.

The results of the present study presented in Table 1 indicate that after 2 h incubation of spermatozoa in *T. foetus* culture extract, the extracellular products secreted by the parasite significantly decreased the sperm cell progressive motility *in vitro*, relative to control. Such results agree with those obtained by Benchimol et al. [13], who detected a decrease in bovine sperm cell motility after 2 h interaction with *T. foetus*. The present data also corroborate the results reported by Han et al. [23], who investigated the *in vitro* effects of *T. vaginalis* metabolites on human spermatozoa and found that the decrease in the motility of sperm cells was proportional to their incubation time in the parasite culture supernatant.

Motility is essential for the transport of spermatozoa along the female reproductive tract, as well as for their penetration into the oocyte during fertilization [24]. Kathiravan et al. [25] found a positive correlation between sperm cell progressive motility and fertilization percentage. However, pathogenic microorganisms present in the bovine urogenital tract may decrease the motility of spermatozoa. Sylla et al. [26] reported that *Mycoplasma mycoides* ssp. *mycoides* destabilized the organization of axoneme microtubules of bovine spermatozoa and altered the transport mechanism of these cells, decreasing their fertilization capability *in vitro*.

Based on previous reports about the importance of sperm cell motility in the fertilization process, *T. foetus* is here suggested to reduce the conception rate by interfering with the motility of spermatozoa. The extracellular products secreted by the parasite decreased sperm cell motility and the direct contact of spermatozoa with the parasite caused intense agglutination, probably affecting their transport mechanism. To confirm such hypothesis, future investigations are needed.

Trichomonads produce a variety of virulence factors which can be important to invade and destroy the host tissue; these include adhesins [27], proteases [28], hemagglutinins [29], hemolysins [30] and cysteine peptidase (CP) [31]. *T. foetus* CPs have been observed in the cervical mucosa of heifers experimentally infected with this parasite [32].

Kania et al. [33] demonstrated that the transcription of the gene for CP8 can be detected through RT-PCR. Those authors noted that this gene was expressed inside the uterus of females experimentally infected with *T. foetus*. In the present study, after RT-PCR analysis of the transcription of the gene for CP8 shown in Fig. 1, *T. foetus* extracellular products present in the supernatant were suggested to constitute virulence factors of the parasite in the interaction medium. One of these virulence factors can be CP8 since the parasite continuously expressed the gene for this peptidase either in the presence or in the absence of bovine spermatozoa. However, the effects of *T. foetus* culture extract might have not been exclusively mediated by CP8; several other extracellular products secreted by *T. foetus* were probably present.

Singh et al. [14] and Singh et al. [15] demonstrated that CP8 may induce apoptosis in bovine uterine and vaginal epithelial cell cultures. Those authors

suggested that induction of apoptosis instead of necrosis may be beneficial to the parasite as the former limits the inflammatory response which could be harmful to the parasite.

Based on such reports, the present study analyzed whether the extracellular products secreted by *T. foetus* decrease sperm cell viability and induce apoptosis or necrosis in bovine spermatozoa. For this analysis, we employed flow cytometry using the fluorescent waves annexin-V-FITC and propidium iodide, which simultaneously detect spermatozoa in apoptosis and necrosis.

The protein annexin-V has affinity for phospholipids and when conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) presents higher affinity for phosphatidylserine, which is located in the outer part of the membrane of spermatozoa in apoptosis. Propidium iodide is capable of penetrating the sperm cell that had lost its membrane integrity [34]. The association of these fluorescent waves to analyze sperm cell viability was described by Januskauskas et al. [35]. These authors employed the flow cytometry technique associated with annexin-V-FITC and propidium iodide to demonstrate that, after thawing, cryopreserved semen of bulls has increased number of spermatozoa in necrosis, i.e. positive annexin-V-FITC and propidium iodide cells (AN+/IP+).

In the present study, considering the results in Table 2, there was no significant loss of viability after three hours incubation of spermatozoa with *T. foetus* culture extract, differently from the control group. These results differ from those obtained by Benchimol et al. [13], who showed that after 2 h interaction of *T. foetus* with bovine spermatozoa, the parasites caused a significant viability loss in sperm cells (>90%). However, those authors

demonstrated the direct effects of the sperm cell/parasite interaction, not involving the extracellular products secreted by *T. foetus*.

Such divergence of results may be due to the different procedures adopted for sperm cell preparation. In the present study, Percoll gradient technique was used to obtain free spermatozoa from the dilutive preservation medium and those with appropriate kinetics and higher percentage of intact plasma membrane [36]. However, Benchimol et al. [13] studied the effects of *T. foetus* on thawed cryopreserved semen, without sperm separation but using color techniques including eosin/nigrosine

In thawed cryopreserved semen, the number of spermatozoa in apoptosis with intact plasma membrane can reach up to 30-40% [20]. These spermatozoa may be not stained with eosin; thus, the percentage of viable sperm cells can be overestimated immediately after the semen thawing.

Spermatozoa in apoptosis represent a transitory phase between viable and necrosed cells. During the initial phase of membrane function disturbances, there is an asymmetry of phospholipids before the membrane integrity is lost [35]. Therefore, spermatozoa in apoptosis become rapidly necrosed after incubation at 37°C [20].

In the present experiment, spermatozoa was kept in SOF medium during interaction tests with *T. foetus* culture extract. Benchimol et al. [13] used TCM 199 as culture medium in its study. According to Martins et al. [37], TCM199 medium provides little protection to spermatozoa, causing great damages to the DNA, consequently decreasing spermatoc viability. This effect may have led to the low viability percentage of sperm cells after 2 h interaction with *T. foetus* observed by Benchimol et al. [13].

As shown in Table 2, there was no significant difference in the percentage of apoptosis or necrosis between spermatozoa incubated with *T. foetus* culture extract and those incubated in SOF medium. However, as indicated in Fig. 2, the semen of one bull presented higher percentage of spermatozoa in apoptosis after 3 h incubation with the extract. The sperm cells of this bull were probably more susceptible to the effects of *T. foetus* extracellular products. Similar results have not been reported in literature and require further investigation to elucidate their implications.

In conclusion, *Tritrichomonas foetus* survives and expresses its gene for CP8 either in the presence or in the absence of bovine spermatozoa in SOF medium. Although the extracellular products secreted by this parasite do not reduce the viability, they lead to a decrease in the progressive motility of spermatozoa which, associated with sperm cell/parasite agglutination, may affect the *in vitro* fertilization capability of these cells. As hypothesis, such process may also occur *in vivo* and can be implicated in the infertility of *T. foetus*-infected cattle.

5. Acknowledgements

This study has been supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, process 06/60514-5).

6. Rerefences

- [1] Anderson ML, Bondurant RH, Corbeil RR, Corbeil LB. Immune and inflammatory responses to reproductive tract infection with *Tritrichomonas foetus* in immunized and control heifers. J Parasitol 1996;82:594-600.
- [2] Bondurant RH. Pathogenesis, diagnosis, and management of trichomoniasis in cattle. Vet Clin North Am Food Anim Pract 1997;13:345-361.
- [3] Parsonson IM, Clark BL, Dufty JH. Early pathogenesis and pathology of *Tritrichomonas foetus* infection in virgin heifers. J Comp Pathol 1976;86:59-66.
- [4] Rhyan JC, Stackhouse LL, Quinn WJ. Fetal and placental lesions in bovine abortion due to *Tritrichomonas foetus*. Vet Pathol 1988;25:350-355.
- [5] Parsonson IM, Clark BL, Dufty J. The pathogenesis of *Tritrichomonas foetus* infection in the bull. Aust Vet J 1974;50:421-423.
- [6] Rhyan JC, Wilson KL, Wagner B, Anderson ML, Bondurant RH, Burgess DE, Mutwiri GK, Corbeil LB. Demonstration of *Tritrichomonas foetus* in the external genitalia and of specific antibodies in preputial secretions of naturally infected bulls. Vet Pathol 1999;36:406-411.

- [7] Mardones FO, Perez AM, Martinez A, Carpenter TE. Risk factors associated with *Tritrichomonas foetus* infection in beef herds in the Province of Buenos Aires, Argentina. *Vet Parasitol* 2008;153:231-237.
- [8] Yule A, Skirrow SZ, BonDurant RH. Bovine trichomoniasis. *Parasitol Today* 1989;5:373-377.
- [9] Rae DO, Crews JE. *Tritrichomonas foetus*. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2006;22:595-611.
- [10] Bartlett DW, Teeter KG, Underwood PC. Artificial insemination as a means of transmission of bovine venereal trichomoniasis. *J Am Vet Med Assoc* 1974;11:114-115.
- [11] Bielanski A, Ghazi DF, Phipps-Toodd B. Observations on the fertilization and development of preimplantation bovine embryos *in vitro* in the presence of *Tritrichomonas foetus*. *Theriogenology* 2004;61:821-829.
- [12] Benchimol M, De Andrade Rosa I, Da Silva Fontes R, Dias AJB. *Trichomonas* adhere and phagocytose sperm cells: adhesion seems to be a prominent stage during interaction. *Parasitol Res* 2008;102:597-604.
- [13] Benchimol M, Da Silva Fontes R, Dias AJB. *Tritrichomonas foetus* damages bovine oocytes *in vitro*. *Vet Res* 2007;38:399-408.

- [14] Singh BN, Lucas JJ, Hayes GR, Kumar I, Beach DH, Frajblat M, Gilbert O, Sommer U, Costello E. *Tritrichomonas foetus* induces apoptotic cell death in bovine vaginal epithelial cells. Infect Immun 2004;72:4151-4158.
- [15] Singh BN, Hayes GR, Lucas JJ, Beach DH, Gilbert RO. *In vitro* cytopathic effects of a cysteine protease of *Tritrichomonas foetus* on cultured bovine uterine epithelial cells. Am J Vet Res 2005;66:1181-1186.
- [16] Silva Filho FC, Elias CA, Souza W. Effect of far-ultraviolet radiation and near-ultraviolet radiation on the surface of the protozoan *Tritrichomonas foetus*. Photoch Photobiol 1986;43:505-507.
- [17] Diamond LS. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. J Parasitol 1957;43:488-490.
- [18] Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOF medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. Theriogenology 1999;52:683-700.
- [19] Gorus FK, Pipeleers DG. A rapid method for the fractionation of human spermatozoa according to their progressive motility. Fertil Steril 1981;35:662-665.

- [20] Anzar M, He L, Buhr MM, Kroetsch TG, Pauls KP. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biol Reprod* 2002;66:354-360.
- [21] Zar JH. Biostatistical analysis, 4th edition. Prentice Hall,1999.
- [22] Clark EH, Dufty JH, Parsonson IM. The frequency of infertility and abortion in cows infected with *Tritrichomonas foetus* var. brisbane. *Aust Vet J* 1986;63:31-32.
- [23] Han Q, Liu J, Wang T, Xiao H, Fang Z. Influence of the metabolite produced by *Trichomonas vaginalis* on human sperm motility in vitro. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2004;10:272-275.
- [24] Donnelly ET, Lewis SE, McNally JA, Thompson W. *In vitro* fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology in IVF outcome. *Fertil Steril* 1988;70:305-314.
- [25] Kathiravan P, Kalatharan J, Edwin JM, Veerapandian C. Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes. *Anim Reprod Sci* 2008;104:9-17.

- [26] Sylla L, Stradaoli G, Manuali E, Rota A, Zelli R, Vincenti L, Monaci M. The effect *Mycoplasma mycoides ssp. mycoides* LC of bovine origin on in vitro fertilizing ability of spermatozoa and embryo development. Anim Reprod Sci 2005;85:81-93.
- [27] Shaia CI, Voyich J, Gillis SJ, Singh BN, Burgess DE. Purification and expression of the Tf190 adhesin in *Tritrichomonas foetus*. Infect Immun 1998;66:1100-1105.
- [28] Thomford JW, Talbot JA, Ikeda JS, Corberil LB. Characterization of extracellular proteinases of *Tritrichomonas foetus*. J Parasitol 1996;82:112-117.
- [29] Nagao E, Yamamoto A, Igarashi T, Goto N, Sasa R. Two distinct hemolysins in *Tritrichomonas tenax* ATCC 30207. Oral Microbiol Immunol 200;15:355-359.
- [30] Burgess DE, Knoblock KF, Daugherty T, Robertson NP. Cytotoxic and hemolytic effects of *Tritrichomonas foetus* on mammalian cell. Infect Immun 1990;58:3627-3632.
- [31] Mallinson DJ, Livingstone J, Appleton KM, Lees SJ, Coombs HG, North MJ. Multiple cysteine proteases of the pathogenic protozoon *Tritrichomonas foetus*: identification of seven diverse and differentially expressed genes. Microbiology 1995;141:3077-3085.

- [32] Bastida-Corcuera F, Butler JE, Heyermann H, Thomford JW, Corbeil LB. *Trichomonas foetus* extracellular cysteine proteinase cleavage of bovine IgG2 allotypes. J Parasitol 2000;86:328-332.
- [33] Kania SA, Reed SL, Thomford JW, Bondurant RH, Hirata K, Corbeil RR, Northe MJ, Corbeil LB. Degradation of bovine complement C3 by trichomonad extracellular proteinase. Vet Immunol Immunopathol 2001;78:83-96.
- [34] Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger CPM. A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescence labelled annexin V. J Immunol Methods 1995;180:9-52.
- [35] Januskauskas A, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. Theriogenology 2003;60:743-758.
- [36] Veznik Z, Svecova D, Zajicova A, Reckova Z, Rubes J. The interrelationship between quality parameters of sperm before and after separation by gradient centrifugation. Vet Med 2007;52:423-429.
- [37] Martins CF, Dode MN, Báo SN, Rumpf R. The use of the acridine orange test and the TUNEL assay to assess the integrity of freeze-dried bovine spermatozoa DNA. Genet Mol Res 2007;6:94-104.

Table 1

Percentage of motile spermatozoa, assessed by CASA, during maintenance in SOF (control) or *T. foetus* incubation extract at 0, 1, 2 and 3 hours.

Table 2

Percentage of double negative (AN-/PI-), annexin-V positive (AN+/PI-), double positive (AN+/PI+) and propidium iodide positive (AN-/PI+) sperm cells maintained in SOF (control) or *T. foetus* incubation extract at 0, 1, 2 and 3 hours.

Table 1

Group	Time of maintenance (hours)			
	0	1	2	3
SOF (control)	65.0	63.0	60.0 ^a	50.0 ^a
(n=5)	(50.0-86.0)*	(58.0-67.0)	(42.0-64.0)	(38.0-57.0)
Extract	67.0 ^A	42.0 ^{AB}	38.0 ^{bAB}	20.0 ^{bB}
(n=5)	(50.0-80.0)	(20.0-54.0)	(23.0-42.0)	(17.0-33.0)

Values with different small letter in a given column or with different capital letter within of row differ significantly (P> 0.05).

SOF: modified synthetic oviductal fluid

()* range (min–max)

Table 2

Spermatozoa	Group	Time of maintenance (hours)			
		0	1	2	3
AN-/PI-	SOF (control)	64.8 ^A	52.6 ^A	38.1 ^{bAB}	28.1 ^{bB}
	(n=5)	(47.1-73.5)*	(41.1-54.8)	(34.5-49.5)	(21.0-34.8)
	Extract	69.4 ^A	66.0 ^A	51.4 ^{aAB}	33.2 ^{aB}
	(n=5)	(60.4-74.2)	(52.6-64.3)	(49.7-52.6)	(32.8-46.9)
AN+/PI-	SOF (control)	0.69 ^a	1.01	0.49	0.67
	(n=5)	(0.47-1.68)	(0.44-1.08)	(0.19-0.93)	(0.60-1.26)
	Extract	0.38 ^{bB}	0.57 ^{AB}	0.75 ^{AB}	0.99 ^A
	(n=5)	(0.15-0.76)	(0.51-1.43)	(0.48-1.88)	(0.53-10.60)
AN+/PI+	SOF (control)	28.7 ^B	36.0 ^{AB}	45.1 ^{AB}	55.5 ^A
	(n=5)	(20.5-44.8)	(34.7-47.7)	(38.9-50.5)	(39.3-62.1)
	Extract	24.6 ^B	34.4 ^{AB}	36.2 ^{AB}	45.2 ^A
	(n=5)	(20.1-33.4)	(25.9-36.0)	(32.4-52.6)	(39.2-51.3)
AN-/PI+	SOF (control)	6.1 ^B	10.1 ^{AB}	14.1 ^A	16.2 ^A
	(n=5)	(5.0-6.5)	(9.2-12.6)	(11.4-16.6)	(15.7-25.0)
	Extract	5.6 ^B	9.0 ^{AB}	11.0 ^{AB}	12.7 ^A
	(n=5)	(4.9-6.1)	(8.7-12.1)	(8.6-14.6)	(6.8-21.1)

Values with different small letter in a given column or with different capital letter within of row differ significantly (P> 0.05).

SOF: modified synthetic oviductal fluid

()* range (min–max)

Figure Legends:

Fig.1

RT-PCR analysis the CP8 gene expression of *T. foetus* corresponding to a 456 bp band (a) and the CP8 gene expression during *T. foetus*- sperm cell interaction (b) at 0 (h0), 1 (h1), 2 (h2) and 3 (h3) hours.

Fig. 2.

Flow cytometry contour plots of spermatozoa during maintenance in SOF (control) at 0 (I) and 3 hour (II) or *T. foetus* incubation extract at 0 (III) and 3 hour (IV). (a) Viable sperm cells (AN-/PI-). (b) Apoptotic sperm cells (AN+/PI-). (c) Early necrotic sperm cells (AN+/PI+). (d) Necrotic sperm cells (AN-/PI+). Note that there are more apoptotic sperm cells after 3 hours of maintenance in *T. foetus* incubation extract (IV).

Fig.1

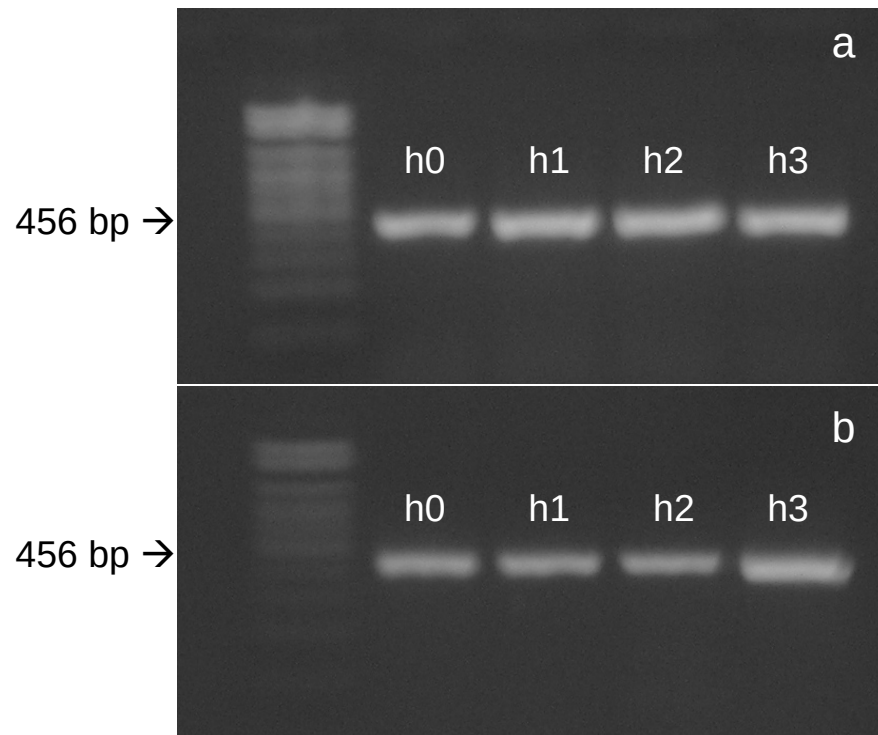


Fig.2

