

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Uso de azul de toluidina para identificar alterações na cromatina espermática bovina provocadas por antígenos de *Toxoplasma gondii* e sua influência no desenvolvimento embrionário inicial.

Kamila Alves Fontoura

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Uso de azul de toluidina para identificar alterações na cromatina espermática bovina provocadas por antígenos de *Toxoplasma gondii* e sua influência no desenvolvimento embrionário inicial.

Kamila Alves Fontoura

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Uso de azul de toluidina para identificar alterações na cromatina espermática bovina provocadas por antígenos de *Toxoplasma gondii* e sua influência no desenvolvimento embrionário inicial.

Kamila Alves Fontoura

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Homologado pela coordenação do Curso
de Biotecnologia em __/__/__

Prof. Dr. Nilson Nicolau Junior

Uberlândia
2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Uso de azul de toluidina para identificar alterações na cromatina espermática bovina provocadas por antígenos de *Toxoplasma gondii* e sua influência no desenvolvimento embrionário inicial.

Kamila Alves Fontoura

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: _____

Nome e assinatura do Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, de de

*Dedico esse trabalho aos meus queridos pais
Reginaldo e Dilma e ao meu irmão Roniery,
meus maiores exemplos de caráter e amor.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por me conceder a oportunidade desta vida, pelo amparo sempre presente nas escolhas que faço e por colocar em meu caminho as pessoas que me auxiliaram chegar até aqui.

Agradeço os meus queridos pais Reginaldo e Dilma, que durante toda minha vida se fizeram presentes, torcendo pelas minhas vitórias e me amparando nas dificuldades. Sem vocês eu não seria nada.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Marcelo Emílio Beletti, por todos os ensinamentos e pela oportunidade e confiança depositada em mim para colaborar neste projeto.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, Laura, Tarsila, Yulizabeth, Maria Júlia, Marcela, Muller e, especialmente, a Luisa Míglio, que me ensinou todos os procedimentos desde o princípio e que sempre foi muito prestativa.

Agradeço ao Kelvin por acreditar nesse projeto e por toda ajuda. Serei eternamente grata.

Agradeço aos meus amigos de graduação, Maria Paula, Lucas e Emanuelle, por todo companheirismo, carinho e amizade. A convivência com vocês tornou todo esse processo mais leve e prazeroso. Levarei vocês no meu coração com muito carinho.

Por fim, agradeço ao meu irmão Roniery, que embora não esteja mais presente entre nós tenho certeza que torceu muito pelo sucesso na realização deste trabalho.

A vocês, meu muito obrigada!

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*: vias de transmissão entre os hospedeiros intermediários e definitivos.....12
- Figura 2** - Efeito dos antígenos de *T. Gondii* na descompactação da cromatina espermática.....21
- Figura 3** - Taxa de clivagem (A) e de blastocistos (B) de espermatozoides contaminados com *T. gondii* em relação ao controle (sem contaminação).....22

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Dinâmica da produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos, onde todo dia 0 ocorre a fertilização <i>in vitro</i> (FIV).....	17
---	----

RESUMO

Toxoplasma gondii é um parasita distribuído mundialmente causador da doença toxoplasmose, ele pode ser transmitido através da ingestão de alimentos contaminados ou por via congênita. A infecção por *T. gondii* na pecuária causa grandes perdas econômicas em todo o mundo devido principalmente aos abortos e morte fetal. Sabe-se que o *T. gondii* influencia negativamente a qualidade do sêmen, portanto, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos *in vitro* de antígenos de *T. gondii* na qualidade do sêmen bovino. Os espermatozoides foram tratados com antígenos de *T. gondii*, em três concentrações, alta, média e baixa (8, 4, 2µg/ml). O resultado obtido através do uso do método de Azul de Toulidina, demonstra que o tratamento com os antígenos causa alterações na integridade da cromatina espermática. Além disso, foi avaliada a taxa de fertilização com a utilização da dose média de antígenos, e os resultados obtidos mostraram que tanto a taxa de clivagem quanto a taxa de blastocisto foram afetadas. Considerando todos os resultados fica evidente a importância do controle do *T. gondii* para evitar perdas econômicas e consequências sanitárias.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*; azul de toluidina; cromatina espermática.

SUMÁRIO

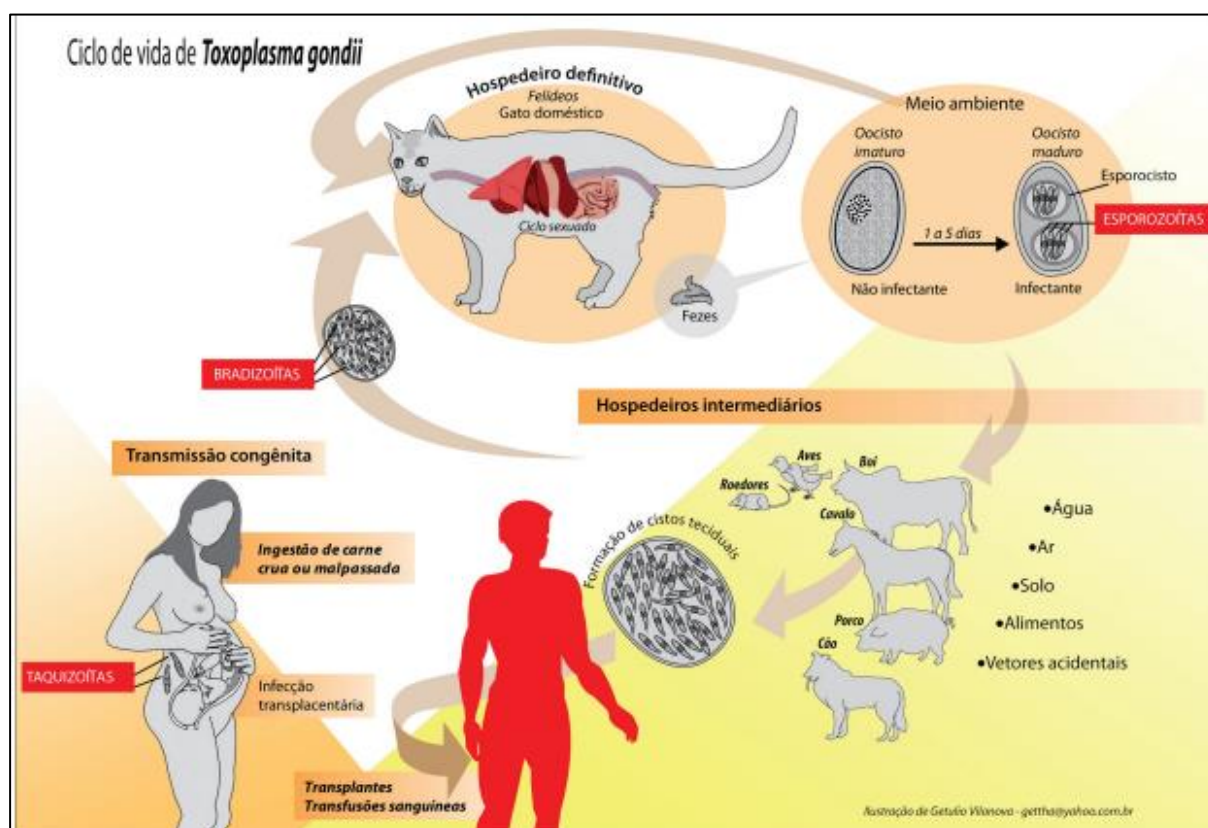
1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVO GERAL	14
2.1 Objetivos específicos	14
3 METODOLOGIA	14
3.1 Obtenção das amostras de sêmen	14
3.2 Produção do antígeno de <i>T. gondii</i>	14
3.3 Meios de diluição do sêmen	15
3.4 Técnica de coloração de Azul de Toluidina para análise da integridade da cromatina espermática	15
3.5 Análise de imagem computacional dos espermatozoides	15
3.6 Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVES)	16
3.6.1 Obtenção e seleção de ovócitos	16
3.6.2 Maturação <i>in vitro</i> (MIV)	17
3.6.3 Seleção espermática	17
3.6.4 Fertilização <i>in vitro</i> (FIV)	18
3.6.5 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	18
3.6.6 Análises estatísticas	19
4 RESULTADOS	19
4.1 Descompactação da cromatina espermática	19
4.2 Taxas de clivagem e de blastocistos na produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE)	20
5 DISCUSSÃO	20
6 CONCLUSÃO	22
REFERÊNCIAS	22

1. INTRODUÇÃO

O *Toxoplasma gondii* é um parasita do filo Apicomplexa, eucarioto intracelular obrigatório causador da doença toxoplasmose, que pode infectar praticamente todos os animais de sangue quente, incluindo humanos, gado e mamíferos marinhos (DUBEY *et al.*, 2020). Por volta de um terço da população mundial está infectada com *T. gondii*, embora a maioria das infecções seja assintomáticas existem aquelas que se desenvolvem para um quadro grave com risco de vida, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, ou quando contraídas de forma congênita (LOURIDO, 2019). As principais formas de transmissões da toxoplasmose são através da via oral, a partir do consumo de alimentos, vegetais e água contaminados com oocistos esporulados de felinos infectados ou consumindo carne crua ou malcozida contendo cistos de animais cronicamente infectados com *T. gondii*, além da forma de transmissão vertical de uma mãe infectada para o feto (MARU *et al.*, 2022).

Este parasita apresenta um ciclo de vida complexo, em que, a fase sexuada, ocorre em hospedeiros definitivos, os felinos, a partir da ingestão de cistos contendo bradizoítos levando a liberação de parasitos na mucosa gástrica que migram para o epitélio intestinal, onde se replicam por esquizogônica e formam esquizontes. O núcleo dos esquizontes inicia lentamente sua individualização através da divisão da membrana plasmática, originando os merozoítos. Estes, por sua vez, dão origem aos gametas, e havendo fecundação, formam-se oocistos. Após cair no lúmen intestinal, os oocistos são liberados para o meio ambiente juntamente com as fezes destes animais. A ingestão de alimentos contaminados, tanto com cistos quanto com oocistos, pode levar a infecção de hospedeiros intermediários, pois estes liberam bradizoítos e esporozoítos, respectivamente, que em seguida vão se transformar em taquizoítos capazes de invadir e se disseminar pelas células do indivíduo, ocorrendo a fase assexuada como descrito na figura 1 (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; ROBERT-GANGNEUX, 2014; AL-MALKI, 2021).

Figura 1 - Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*: vias de transmissão entre os hospedeiros intermediários e definitivos.



Fonte: (MOURA; AMENDOEIRA ; BARBOSA, 2009).

Os ruminantes têm um papel muito importância na epidemiologia da infecção por *T. gondii* em todo o mundo, visto que, o consumo de carne de animais infectados é uma fonte direta de infecção para humanos e felinos (MARU *et al.*, 2022). A infecção por *T. gondii* é comum em animais produtores de carne pelo mundo todo, e representa um risco para a saúde pública e para a economia das sociedades humanas, pois a indústria de carne é muito importante economicamente em todo o mundo (FAZEL *et al.*, 2021).

Abdoli, Dalimi e Movahedin (2011), observaram que as infecções por toxoplasma alteram os parâmetros reprodutivos nos hospedeiros, apresentando um impacto negativo nas funções reprodutivas masculina, de forma direta ou indiretamente, induzindo a apoptose das células espermatógonias, resultando em uma redução da qualidade do espermatozoide e consequentemente, diminuição da fertilidade. Na Etiópia central foi relatado uma associação significativa entre a soropositividade de *T. gondii* e aborto em pequenos ruminantes. Além disso, em ovinos, é possível que uma infecção cause morte embrionária precoce, morte fetal, mumificação, aborto e natimortos (OMONIJO; KALINDA; MUKARATIRWA, 2022), impactando perdas econômicas severas na indústria pecuária.

O *T. gondii* pode ser eliminado na forma viável e degradado no sêmen de animais infectados. No entanto, pouco se sabe sobre o efeito direto ou indireto de antígenos de *T. gondii* sobre os espermatozoides ejaculados, em especial sobre como esses antígenos influenciam a cromatina espermática. As alterações na cromatina espermática podem interferir na fecundação do oócito, e no desenvolvimento embrionário, causando uma clivagem mais lenta, um blastocisto com o embrioblasto irregular, uma tendência a desenvolver zigotos triploides e conseqüentemente, reabsorção fetal, aborto precoce ou mais raramente, abortos tardios, e essas alterações não são identificadas pelas técnicas rotineiramente utilizadas na avaliação reprodutiva de touros (SHAMSI; IMAM; DADA, 2011; DADA, 2017).

Um dos métodos utilizados para identificação de alterações na cromatina espermática é a coloração de esfregaços de sêmen com azul de toluidina (AT). Este é um corante catiônico que pode apresentar o fenômeno da metacromasia quando muitas de suas moléculas estão próximas, permitindo a ressonância de elétrons entre elas, fazendo com que ocorra uma mudança da cor azul para magenta (BELETTI; MELLO, 1996). Esta propriedade é útil para avaliar anormalidade na condensação da cromatina espermática, pois as moléculas de corante se ligam aos fosfatos ionizados do DNA. Os espermatozoides com a cromatina normal possuem a maioria dos fosfatos bloqueados por protamina e, conseqüentemente, poucas moléculas de corante se ligam ao DNA. Essa menor interação reflete uma coloração que varia do verde ao azul claro. Os espermatozoides com a cromatina menos compactada possuem muitos sítios de ligações para as moléculas de corante, resultando em uma coloração que varia do azul escuro ao magenta. Este método identifica apenas os graus mais graves de alteração da cromatina, além disso, a sensibilidade da técnica pode ser aumentada por hidrólise ácida antes da coloração, pois os espermatozoides normais, com alta compactação da cromatina, dificilmente são afetados pela hidrólise, diferente daqueles espermatozoides que possuem a cromatina espermática com baixo grau de alteração, que teriam suas protaminas parcialmente extraída por hidrólise, permitindo assim que as moléculas de AT se liguem aos fosfatos de DNA. Desta forma, a hidrólise aumenta a sensibilidade do método. A avaliação dos espermatozoides corados com AT realizada por avaliação visual possui alto grau de subjetividade, o que pode ser minimizado pela avaliação computacional de imagens digitais, tornando o método muito mais objetivo e com alta repetibilidade (BELETTI; COSTA; GUARDIEIRO, 2005).

A possibilidade de transmissão de antígeno de *T. gondii* através do sêmen pode implicar profundas repercussões no comércio de sêmen bovino. A inseminação artificial é um procedimento importante para o melhoramento genético e para a produção bovina, milhões de doses de sêmen bovino congelado são trocadas anualmente em todo o mundo, o que aumenta a

possibilidade de espalhar diferentes doenças entre as populações de gado (PHILPOTT, 1993). Pensando nisso, é necessário ampliar os estudos sobre a toxoplasmose em bovinos, com o objetivo de melhorar a compreensão da infecção na espécie, assim como, suas implicações para a saúde pública.

Dessa forma, seria importante verificar como antígenos solúveis de *T. gondii* eventualmente encontrados no sêmen de touros infectados interferem na cromatina espermática e como essas possíveis alterações cromatínicas podem influenciar a produção *in vitro* de embriões.

2. OBJETIVO GERAL

Objetiva-se com o presente trabalho avaliar como a contaminação de *Toxoplasma gondii* provoca alterações na cromatina dos espermatozoides bovinos, utilizando-se o método de coloração de esfregaços de sêmen corados com azul de toluidina e sua influência nos processos de fecundação e desenvolvimento embrionário inicial *in vitro*.

2.1. Objetivos específicos

- 1- Avaliar possíveis alterações na cromatina de espermatozoides de touro que entraram em contato com antígenos solúveis de *T. gondii*;
- 2- Avaliar como espermatozoides que entraram em contato com antígenos solúveis de *T. gondii* se comportam no processo de produção *in vitro* de embriões bovinos.

3. METODOLOGIA

3.1 Obtenção das amostras de sêmen

Foram utilizadas amostras congeladas de uma partida de sêmen de touro Nelore adquirida em central de processamento de sêmen. Essa partida já foi testada no laboratório de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), demonstrando excelentes resultados na produção *in vitro* de embriões.

3.2 Produção do antígeno de *T. gondii*

O antígeno solúvel do *Toxoplasma* (STAg) foi produzido conforme descrito em estudos anteriores, com pequenas modificações. Resumidamente, suspensões de *T. gondii*, cepa RH, obtidas de cultura de células foram ajustadas para 1×10^8 taquizoítos/mL, submetidas a ciclos de congelamento-descongelamento e sonicação na presença de inibidores de protease. A preparação foi centrifugada a 10.000 g por 30 min a 4°C; os sobrenadantes foram coletados e as alíquotas foram armazenadas a -20 °C até serem usadas como STAg (SANTANA et al., 2021).

3.3 Meios de diluição do sêmen

A diluição e manutenção dos espermatozoides foi feita com meio TALP-Sperm (Tyrode-albumina-lactato-piruvato, acrescido de 0,2 mM piruvato sódico e 83 µg/mL amicacina), rotineiramente utilizado em laboratórios de produção *in vitro* de embriões bovinos. Para verificar os efeitos dos antígenos sobre os espermatozoides, as amostras de sêmen bovino foram descongeladas e diluídas em meio TALP-Sperm por uma hora, a 37 °C, 5% de CO₂, com três concentrações de antígenos de *T. gondii*: alta (8 µg/ml), média (4 µg/ml), baixa (2 µg/ml) e como controle, as amostras também foram tratadas apenas com o meio (sem antígeno).

3.4 Técnica de coloração de Azul de Toluidina para análise da integridade da cromatina espermática

Foram realizados esfregaços de sêmen tratados com as diferentes concentrações de antígeno (8, 4, 2 µg/ml e controle), os quais foram fixados em etanol-ácido acético 3:1 (v/v) por um minuto e posteriormente em etanol 70% por três minutos. Após a fixação, os esfregaços passaram por hidrólise ácida em ácido clorídrico 4N por 25 minutos e posteriormente lavados em água destilada. Após secagem, os esfregaços foram corados colocando-se uma gota de solução de Azul de Toluidina (AT) 0,025%, em tampão ácido cítrico-fosfato (tampão McIlvaine) pH 4,0. Imediatamente foi colocada uma lamínula sobre a lâmina e selada com esmalte e três minutos mais tarde, uma média de 100 imagens digitais de cada esfregaço foi capturada utilizando um microscópio Olympus BX51 com uma câmera Olympus DP70 ligada a um microcomputador PC pelo sistema de captura DP Controller.

3.5 Análise de imagem computacional dos espermatozoides.

As análises de imagens computadorizadas foram divididas em duas etapas: segmentação das cabeças e análise quantitativa da descompactação porcentual média da cromatina de cada cabeça. Para a segmentação das cabeças foi utilizado um *software* desenvolvido em ambiente de programação *MATLAB* e executado pelo programa Octave (HIRAIWA, 2015). E para avaliação da descompactação porcentual média da cromatina foi utilizado um *software* desenvolvido em ambiente de programação *SCILAB* (BELETTI; COSTA; GUARDIEIRO, 2005).

3.6 Produção *in vitro* de embriões (PIVES).

Foram realizadas 8 rotinas de produção *in vitro* de embrião denominando-se os dias como -1, zero, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 onde no dia zero realizou-se a contaminação dos espermatozoides com antígenos solúveis de *T. gondii* (Tab. 1). As rotinas foram realizadas de acordo com o protocolo do Laboratório de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Uberlândia (LUCIO et al., 2016).

Tabela 1 - Dinâmica da produção *in vitro* de embriões bovinos, onde todo dia 0 ocorre a fertilização *in vitro* (FIV).

DIAS	ATIVIDADES
-1	Aspiração folicular <i>pós-mortem</i> Seleção e maturação <i>in vitro</i> (MIV) de ovócitos
zero	Fertilização <i>in vitro</i> (FIV) de ovócitos maturados (após 22h de maturação)
1	Desnudamento (de 18 à 22h após a fecundação) e início do cultivo <i>in vitro</i> dos prováveis zigotos
2	Observação da taxa de clivagem (48h após a FIV) Embriões com \cong 2 células
3	Embriões com \cong 4 células
4	Embriões com \cong 8 células
5	Mórula
6	Blastocisto inicial
7	Contagem dos blastocistos (iniciais, expandidos, eclodidos)

Fonte: autoria própria.

3.6.1 Obtenção e seleção de ovócitos

Os ovários foram obtidos a partir de vacas abatidas e doados pelo abatedouro comercial da cidade de Araguari (MG) e foram transportados para o Laboratório de Biologia da Reprodução em uma garrafa térmica com soro fisiológico a 37°C. Em seguida, os ovários foram lavados em solução fisiológica e mantidos em banho maria a 37°C para a aspiração folicular.

Os folículos antrais ovarianos foram aspirados com o auxílio de seringas de 10mL e agulha 18G. O fluido ovariano foi transferido para tubos de 50mL, onde passaram por um processo de sedimentação por aproximadamente 15 minutos. O sedimento foi depositado em placas de poliestireno de 90 x 15 mm e foi realizado, com o auxílio de microscópio estereoscópico, o rastreamento de complexos ovócitos cúmulo (COCs) de grau I, que são aqueles que possuem ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e com coloração escura, com ausência de vacúolos, e células do cúmulo compactadas e com várias camadas, e COCs grau II, que são aqueles com ooplasma minimamente heterogêneo, com ausência de vacúolos, e com células do cúmulo compactadas com mais de três camadas (STOJKOVIC et al., 2001).

3.6.2 Maturação *in vitro* (MIV)

Os ovócitos de grau I e II selecionados, foram lavados em meio TCM - 199 HEPES (0,2 mM piruvato sódico, 10 mM HEPES ácido, 10 mM de HEPES sódico, 5 mM bicarbonato de sódio, 83 µg/mL de amicacina, suplementado com 10% de soro fetal bovino) e uma vez em meio de maturação TCM 199 com bicarbonato (0,2 mM piruvato sódico, 26 mM bicarbonato de sódio, 83 µg/mL de amicacina, 1 µg/mL de FSH, 5 µg/mL de LH, suplementado com 10% de soro fetal bovino). Foram transferidos de 15 a 20 ovócitos por gota de 100 µL de meio de maturação, cobertas com óleo mineral em placas de petri de poliestireno de 60 x 15 mm, e foram mantidos por cerca de 22 horas em estufa na temperatura de 38,5°C, com 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

3.6.3 Seleção espermática

Para selecionar os espermatozoides viáveis, após uma hora de incubação no meio com antígenos de *T. gondii*, o conteúdo foi depositado sobre gradientes de Percoll preparado previamente em um tubo Falcon de 15 mL, composto pela camada superior de Percoll 45% (500 µL de Percoll 90% e 500 µL de meio TALP-Sperm (Tyrode-albumina-lactato-piruvato, acrescido de 0,2 mM piruvato sódico e 83 µg/mL amicacina)) e a camada inferior de 1 mL de

Percoll 90% (Percoll, solução 10x, solução estoque 2mM CaCl₂, solução estoque 0,4 mM MgCl₂, 0,1 mM DL-ácido láctico e 20 mM bicarbonato de sódio). O gradiente contendo o sêmen foi centrifugado por 30 minutos a 2400 rpm, apresentando um sedimento viável que foi reservado.

3.6.4 Fertilização *in vitro* (FIV)

Os ovócitos maturados foram lavados três vezes em meio Fert-TALP e foram transferidos para gotas de 100 µL do mesmo meio, cobertas com óleo mineral em placas de petri de poliestireno de 60 x 15 mm. As gotas foram distribuídas aleatoriamente a fim de compor os grupos experimentais, que é o touro do experimento contaminados com *T. gondii* e o mesmo touro sem a contaminação como controle.

Do sedimento previamente separado, a partir da seleção espermática, foram retiradas duas alíquotas de 5 µL para determinar a motilidade progressiva e a concentração em câmara de Neubauer. A concentração foi ajustada para 25 mil espermatozoides viáveis/µL e foram utilizados 8µL para fecundar cada gota, que em seguida foram incubados por 18 a 20 horas em atmosfera de 5% de CO₂, com a umidade de 100% e temperatura de 38,5°C.

3.6.5 Cultivo *in vitro* (CIV)

Aproximadamente 24 horas após a fertilização *in vitro*, os prováveis zigotos foram desnudados mecanicamente por pipetações sucessivas e foram lavados por três vezes em gotas de 100 µL de meio SOF (acrescido de 0,2 mM piruvato sódico, 5 mg/mL BSA, 2,5% de soro fetal bovino e 83 µg/mL de sulfato de amicacina) em seguida, foram transferidos para gotas de 100 µL do mesmo meio e cobertas com óleo mineral em placas de poliestireno de 60 x 15 mm, onde foram cultivados por 6 dias em estufa, com atmosfera de 5% de CO₂, temperatura de 38,5°C e 100% de umidade.

A taxa de clivagem foi determinada 48 horas após a fertilização *in vitro* através da contagem dos zigotos que apresentavam duas ou mais células com o auxílio de microscópio estereoscópico.

A contagem dos blastocistos foi realizada no sétimo dia após a fecundação. A taxa de blastocisto foi determinada em relação ao número de embriões que iniciaram a clivagem e chegaram a esse estágio de desenvolvimento.

3.6.6 Análise estatística

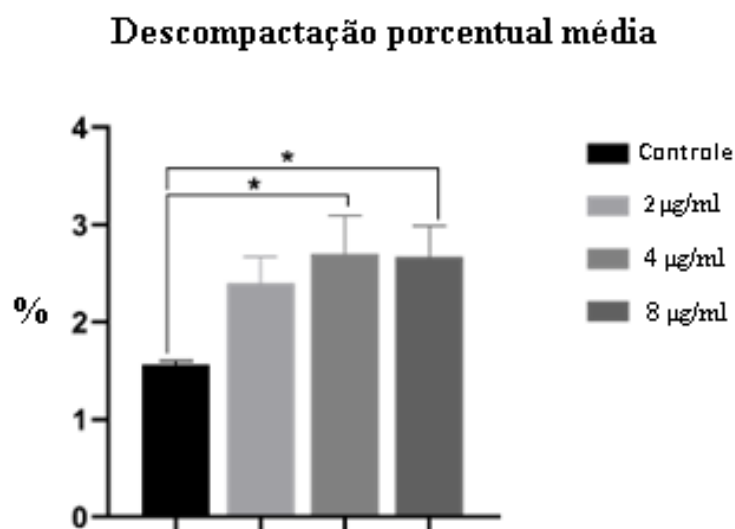
Para identificar as possíveis diferenças entre as condições testadas, foi realizado o teste Kolmogorov-Smirnov para verificar a distribuição dos dados. Posteriormente foi utilizado o teste “One-way ANOVA” e como pós teste foi utilizado o teste exato de Fisher para comparação entre os três tratamentos. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Descompactação da cromatina espermática

Foi avaliado a descompactação da cromatina espermática provocada pela presença de antígenos solúveis de *T. gondii* no sêmen de touros. Para esta avaliação foi feita a análise de imagem computacional de esfregaços de sêmen corados com azul de toluidina pH 4.0, após hidrólise ácida. A avaliação demonstrou que os tratamentos com dose média e alta (4 e 8 $\mu\text{g/ml}$) apresentaram maior quantidade de alterações cromatínicas espermáticas em comparação ao controle ($*p < 0,05$) (Fig.2).

Figura 2 - Efeito dos antígenos de *T. Gondii* na descompactação da cromatina espermática. * $p < 0,05$.

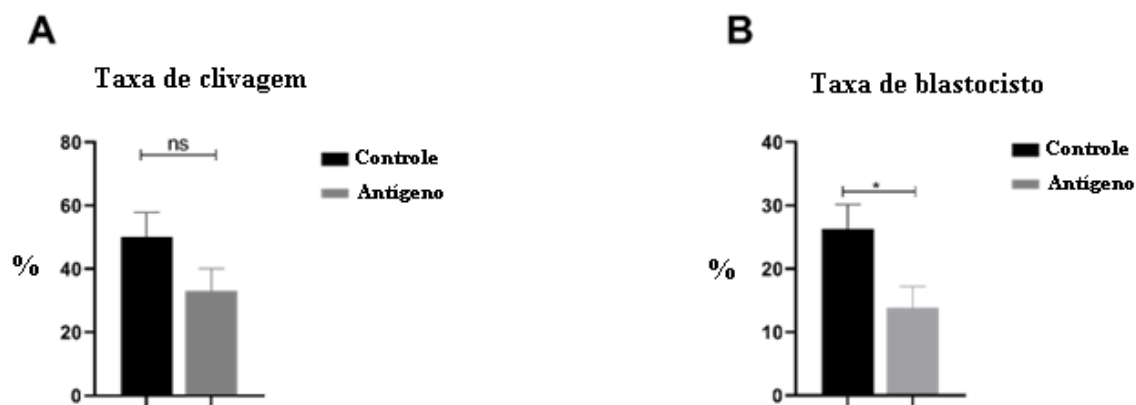


Fonte: Autoria própria.

4.2 Taxas de clivagem e de blastocistos na produção *in vitro* de embriões (PIVE).

Foram avaliados os efeitos da dose média (4 $\mu\text{g/ml}$) de antígenos solúveis de *T. gondii* na taxa de clivagem e de blastocisto na PIVE. Os resultados mostraram que os espermatozoides tratados com os antígenos solúveis não apresentaram alterações significativas na taxa de clivagem em relação ao controle (NS) (* $p > 0,05$) (Fig. 3A). Já a taxa de blastocisto teve uma redução em comparação ao controle (* $p < 0,05$) (Fig. 3B).

Figura 3 - Taxa de clivagem (A) e de blastocistos (B) de espermatozoides contaminados com *T. gondii* em relação ao controle (sem contaminação).



Fonte: Autoria própria.

5 DISCUSSÃO

A partir dos resultados do presente trabalho, pode-se observar que os antígenos solúveis de *T. gondii*, quando em contato com espermatozoides ejaculados normais, podem levar a alterações da cromatina espermática (descompactação cromatínica), dependendo da concentração destes antígenos. (Figura 2).

A utilização de espermatozoides tratados com antígenos na concentração de 4 $\mu\text{g/ml}$ mostrou que estes espermatozoides pouco são prejudicados na sua capacidade fecundante, o que foi verificado pela não alteração da taxa de clivagem, mas interfere de forma expressiva no desenvolvimento embrionário, o que foi verificado pela diminuição da taxa de blastocisto (Figura 3). A piora nos resultados da produção *in vitro* de embriões pode ser devido a diversos

problemas causados nos espermatozoides pelos antígenos solúveis de *T gondii* e não identificados neste trabalho. Contudo, já foi comprovado que alterações cromatínicas leves podem não interferir na capacidade fecundante dos espermatozoides, mas quando estes espermatozoides conseguem fecundar um ovócito, isso pode interferir no desenvolvimento embrionário (BELETTI, 2013; SHAMSI; IMAM; DADA, 2011). Portanto, a descompactação cromatínica provocada pelo tratamento com os antígenos na concentração de 4 µg/ml são totalmente compatíveis com os resultados obtidos na produção *in vitro* de embriões.

A toxoplasmose é uma doença considerada um problema de saúde global com aproximadamente um bilhão de pessoas infectadas, (AHMADPOUR et al., 2019). De acordo com Saki (2020) existe uma relação entre a toxoplasmose e espermatozoides morfologicamente anormais, mas isso seria por ação direta deste parasita na espermatogênese. Este parasita gera perdas econômicas na pecuária devido a diversos distúrbios reprodutivos, como morte embrionária precoce, aborto, natimorto e morte neonatal, principalmente em pequenos ruminantes e geralmente atribuídas à ação do *T gondii* no trato reprodutor feminino (BUXTON et al., 2007; DUBEY; JONES, 2008). Os resultados do presente trabalho demonstraram que essas perdas (morte embrionária precoce, aborto, natimorto e morte neonatal) podem não ser somente provocadas por ação do *T. gondii* na fêmea durante a gestação, mas também podem ser causadas pelas alterações cromatínicas espermáticas provocadas pelos antígenos solúveis deste protozoário quando entram em contato com os espermatozoides ejaculados.

A descompactação intensa da cromatina espermática pode gerar graves consequências, como anormalidade da cabeça do espermatozoide causando problemas em sua hidrodinâmica, e com isso, levando a uma motilidade inadequada que interfere diretamente no processo de fertilização, enquanto as alterações espermáticas menos graves podem conter danos ao DNA que não interferem na capacidade fecundante do espermatozoide, mas impossibilitam a união dos pró-núcleos masculino e feminino, e conseqüentemente, inviabilizam a formação do zigoto. Além disso, pequenas alterações na cromatina podem interferir em etapas posteriores do desenvolvimento embrionário, o que pode levar a problemas genéticos e até mesmo a morte fetal (BELETTI, 2013). No presente trabalho, as PIVEs realizadas com espermatozoides tratados com antígenos apresentaram falhas no desenvolvimento embrionário. Essas consequências podem estar relacionadas às alterações leves da cromatina espermática, que pode não interferir na fecundação e no desenvolvimento embrionário inicial, mas podem interferir em etapas futuras do desenvolvimento embrionário e causar a morte embrionária (BELETTI, 2013). Portanto, fica entendível que a integridade da cromatina do espermatozoide é de extrema

importância para o sucesso embrionário e para a manutenção da boa saúde da prole (ARRUDA *et al.*, 2015).

Enfim, fica evidente que a presença de antígenos de *T. gondii* no sêmen de touros infectados pode interferir diretamente na fertilidade do touro e aumentar as perdas embrionárias provocadas por alterações cromatínicas espermáticas.

6 CONCLUSÃO

Os antígenos solúveis de *Toxoplasma gondii* são capazes de promover alterações na cromatina espermática bovina, e essas alterações podem interferir na taxa de prenhez e perdas embrionárias de rebanhos bovinos.

REFERÊNCIAS

AHMADPOUR, E. *et al.* Diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women using automated chemiluminescence and quantitative real time PCR. **Asian Pacific Journal Of Tropical Medicine**, [s.l.], v. 12, n. 1, p. 26, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.4103/1995-7645.250341>.

ABDOLI, A.; DALIMI, A.; MOVAHEDIN, M. Impaired reproductive function of male rats infected with *Toxoplasma gondii*. **Andrologia**, [s.l.], v. 44, p. 679-687, 18 nov. 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0272.2011.01249.x>.

AL-MALKI, E. S. Toxoplasmosis: stages of the protozoan life cycle and risk assessment in humans and animals for an enhanced awareness and an improved socio-economic status. **Saudi Journal Of Biological Sciences**, [s.l.], v. 28, n. 1, p. 962-969, jan. 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.007>.

ARRUDA, R. *et al.* Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, [s.l.], v.39, n.1, p. 47-60, 2015. Disponível em: [http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v39n1/pag47-60%20\(RB572\).pdf](http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v39n1/pag47-60%20(RB572).pdf).

BELETTI, M. E. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, [s.l.], v. 37, n. 2, p. 92-96, 2013. Disponível em: [http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v37n2/pag92-96%20\(RB465\).pdf](http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v37n2/pag92-96%20(RB465).pdf).

BELETTI, M. E.; COSTA, L. F.; GUARDIEIRO, M. M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. **Brazilian Journal of Morphological Science**, [s.l.], v.22, n.2, p. 85-90, 2005.

BELETTI, M. E.; MELLO, M. L. S. Comparison between the toluidine blue stain and the Feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology. *Theriogenology*, [s.l.], v. 62, n. 3-4, p. 398-402, ago. 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.10.016>.

BUXTON, D. *et al.* *Toxoplasma gondii* and ovine toxoplasmosis: new aspects of an old story. *Veterinary Parasitology*, [s.l.], v. 149, n. 1-2, p. 25-28, out. 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.07.003>.

DADA, R. Sperm DNA damage diagnostics: when and why. ***Translational Andrology And Urology***, [s.l.], v. 6, n. 4, p. 691-694, set. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.21037/tau.2017.05.26>.

DUBEY, J; JONES, J. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *International Journal For Parasitology*, [s.l.], v. 38, n. 11, p. 1257-1278, set. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.03.007>.

DUBEY, J.P. *et al.* Public health and economic importance of *Toxoplasma gondii* infections in goats: the last decade. *Research In Veterinary Science*, [s.l.], v. 132, p. 292-307, out. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.06.014>.

FAZEL, R. *et al.* PCR-based detection of *Toxoplasma gondii* from cattle in southern Iran. ***Comparative Immunology, Microbiology And Infectious Diseases***, [s.l.], v. 77, p. 101677, ago. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2021.101677>.

HIRAIWA, SH. **Classificação das alterações cromatínicas de espermatozoides bovinos e sua correlação com a eficiência na produção in vitro de embriões**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Uberlândia, 2015.

LOURIDO, S. *Toxoplasma gondii*. ***Trends In Parasitology***, [s.l.], v. 35, n. 11, p. 944-945, nov. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2019.07.001>.

LUCIO, A. C. *et al.* Selected sperm traits are simultaneously altered after scrotal heat stress and play specific roles in in vitro fertilization and embryonic development. ***Theriogenology***, [s.l.], v. 86, n. 4, p. 924-933, set. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.03.015>.

MARU, M. *et al.* *Toxoplasma gondii* infection in slaughtered domestic ruminants in Northwest Ethiopia: occurrence, bioassay and virulence assessment. ***Journal Of Parasitic Diseases***, [s.l.], v. 46, n. 2, p. 429-439, 22 jan. 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12639-022-01466-6>.

MELLO, M. L. S. Induced metachromasia in bull spermatozoa. *Histochemistry*, [s.l.], v. 74, n. 3, p. 387-392, 1982. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/bf00493438>.

MILLER, D.J. Review: the epic journey of sperm through the female reproductive tract. ***Animal***, [s.l.], v. 12, p. 110-120, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/s1751731118000526>.

MONTOYA, Jg; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. ***The Lancet***, [s.l.], v. 363, n. 9425, p. 1965-1976, jun. 2004. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(04\)16412-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(04)16412-x).

MOURA, M. A.; AMENDOEIRA, M. R. R.; BARBOSA, H. S. Primary culture of intestinal epithelial cells as a potential model for *Toxoplasma gondii* enteric cycle studies. ***Memórias do Instituto Oswaldo Cruz***, [s.l.], v. 104, n. 6, p. 862-864, set. 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762009000600007>.

OMONIJO, A. O.; KALINDA, C.; MUKARATIRWA, S. *Toxoplasma gondii* Infections in Animals and Humans in Southern Africa: a systematic review and meta-analysis. ***Pathogens***, [s.l.], v. 11, n. 2, p. 183, 28 jan. 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens11020183>.

PHILPOTT, M. The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. **British Veterinary Journal**, [s.l.], v. 149, n. 4, p. 339-369, jan. 1993. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0007-1935\(05\)80075-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0007-1935(05)80075-2).

ROBERT-GANGNEUX, F. It is not only the cat that did it: how to prevent and treat congenital toxoplasmosis. **Journal Of Infection**, [s.l.], v. 68, p. 125-133, jan. 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2013.09.023>.

SANTANA, S. S. et al. A peptide originated from *Toxoplasma gondii* microneme 8 displaying serological evidence to differentiate recent from chronic human infection. **Parasitology International**, [s.l.], v. 84, p. 102394, out. 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2021.102394>.

SHAMSI, M. B.; IMAM, S. N.; DADA, R. Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. **Journal Of Assisted Reproduction And Genetics**, [s.l.], v. 28, n. 11, p. 1073-1085, 9 set. 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10815-011-9631-8>.

SPANÒ, M. et al. Sperm chromatin damage impairs human fertility. *Fertility And Sterility*, [s.l.], v. 73, n. 1, p. 43-50, jan. 2000. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0015-0282\(99\)00462-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0015-0282(99)00462-8).

STOJKOVIC, M. et al. Mitochondrial Distribution and Adenosine Triphosphate Content of Bovine Oocytes Before and After In Vitro Maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture1. **Biology Of Reproduction**, [s.l.], v. 64, n. 3, p. 904-909, 1 mar. 2001. DOI: <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod64.3.904>.